

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 032**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/02** (2006.01)

**C07K 16/04** (2006.01)

**C07K 16/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2011 PCT/IB2011/002596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12023051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11793860 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2605791**

54 Título: **Preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico**

30 Prioridad:

**17.08.2010 US 374328 P**

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

**01.08.2017**

73 Titular/es:

**IMMURON LIMITED (100.0%)  
Level 1 39 Leveson Street  
North Melbourne, Victoria 3051, AU**

72 Inventor/es:

**ADAR, TOMER;  
MIZRAHI, MEIR;  
LALAZAR, GADI;  
ILAN, YARON y  
BEN-YA'ACOV, AMI**

74 Agente/Representante:

**CAMPello ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 628 032 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

Preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a preparaciones enriquecidas con anticuerpos dirigidos contra LPS, tales como las procedentes de calostro de mamífero, para su uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

10

**Antecedentes de la invención**

La hepatitis crónica es una inflamación del hígado que dura al menos seis meses. La hepatitis crónica, aunque es mucho menos común que la hepatitis aguda, puede persistir durante años, incluso décadas. En la mayoría de las personas, es muy leve y no causa daño hepático significativo. Sin embargo, en algunas personas, la inflamación continuada daña lentamente el hígado, produciendo eventualmente cirrosis (cicatrización grave del hígado), insuficiencia hepática y algunas veces cáncer de hígado. La hepatitis crónica normalmente la ocasiona el virus de la Hepatitis B (VHB), el virus de la Hepatitis C (VHC) y los fármacos.

15

La infección crónica del virus de la Hepatitis C (VHC), se caracteriza por la incapacidad del hospedador de establecer una respuesta inmunitaria eficaz. Al mismo tiempo, la infección crónica del VHC se asocia con niveles persistentes y anómalamente altos de activación inmunitaria. Esta activación contribuye a la progresión del daño y la enfermedad hepáticos. Los pacientes con infección crónica de VHC tienen diferentes cuadros clínicos, mientras que algunos desarrollan cirrosis, otros no muestran progresión de enfermedad hepática.

20

25

Diversos factores de riesgo, tal como el consumo concomitante de etanol, se han asociado al daño hepático acelerado y a la progresión a la cirrosis. Se ha descubierto que los pacientes con infección crónica de VHC y consumo de etanol presentan una progresión acelerada de la enfermedad hepática. Esto se ha asociado a niveles aumentados de LPS (Bedogni, G. Am. J. Gastroenterol. 103(9): 2248-53 (2008)). Curiosamente, un estudio reciente ha demostrado que la proteína no estructural NS5A del VHC activa el receptor de tipo Toll (TLR) 4, que también es activado por LPS (Machida, K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. ESTADOS UNIDOS, 106(5): 1548-53 (2009)).

30

El LPS no solo puede relacionarse con la progresión de la enfermedad hepática, sino también con la perpetuación de la infección crónica. En comparación con pacientes con infección autolimitante, los monocitos de pacientes con VHC crónica producen significativamente más IL-10 y TNF alfa en respuesta a la proteína principal del VHC o LPS (Martin-Blondel, G. et al. J. Viral. Hepatitis (11 de marzo de 2009)). Por tanto, aunque la translocación de productos microbianos intestinales, la activación inmunitaria y la progresión de la enfermedad hepática parecen estar muy relacionadas, no existe prueba de causalidad. Adicionalmente, parece que existe una conexión entre los niveles de LPS y la eliminación de virus, aunque esto ha de aclararse. Por lo tanto, se necesitan estudios destinados a esclarecer de estas relaciones. Si la translocación microbiana está impulsando la activación inmunitaria y la progresión de la enfermedad hepática, las estrategias que reducen o previenen la translocación microbiana pueden tener un impacto significativo sobre la activación inmunitaria y, por tanto, en la historia natural de la infección crónica del VHC.

35

40

La peritonitis bacteriana espontánea (PBE) es una complicación común y grave de enfermedades hepáticas crónicas, tales como cirrosis hepática, hipertensión portal y ascitis. La PBE tiene lugar en hasta un 30 % de los pacientes y se asocia a una tasa de mortalidad hospitalaria de hasta un 25 %. Se considera que la translocación bacteriana al líquido peritoneal empobrecido anquilosado e inmune es el principal mecanismo patogénico de la PBE. Mientras que la paracentesis y la terapia con antibióticos de amplio espectro constituyen un tratamiento eficaz para la infección aguda, muchos pacientes padecen episodios recurrentes de PBE con agentes patógenos que llegan a ser cada vez más resistentes a la terapia con antibióticos (Song, K.H. et al., BMC Infect. Dis. 9.1: 41 (2009)). Los métodos para la profilaxis de la PBE que utilizan antibióticos crónicos son controvertidos y se asocian a la aparición de especies resistentes a los antibióticos (Cohen, M.J. et al., Cochrane Database Syst Rev. 2: CD004791 (2009)).

50

Recientemente, se ha descubierto una asociación creciente entre la translocación bacteriana y la incidencia de complicaciones de la cirrosis. Los niveles de cualquiera de los productos bacterianos (ARN 16s ribosómico) en el suero o la endotoxemia (LPS o LBP) se han correlacionado con sangrados por varices, síndromes hepatorrenales y el estado circulatorio hiperdinámico encontrados en pacientes cirróticos (El-Naggar, M.M. et al., J. Med. Microbiol. 57 (Pt 12): 1533-8 (2008)).

55

60

Durante décadas, se han llevado a cabo varios intentos de obtener una secreción aumentada de anticuerpos específicos de inmunógeno a través de la glándula mamaria de animales de granja. Estos intentos están destinados a la producción de grandes cantidades de anticuerpos específicos de inmunógeno a través de la leche. Sin embargo, los niveles de anticuerpos en la leche madura siguen siendo bajos (aproximadamente de un orden de magnitud) cuando se comparan con los que se pueden obtener en el calostro.

65

El calostro (también conocido como primera leche) es una forma de leche producida por las glándulas mamarias en la última etapa del embarazo y los pocos días después del nacimiento. En los seres humanos, tiene altas concentraciones de nutrientes y anticuerpos, pero es pequeño en cantidad. El calostro tiene un alto contenido en hidratos de carbono, proteínas, sales minerales, vitaminas e inmunoglobulina. También contiene varias células flotantes, tales como células granulares y estromales, neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos, e incluye factores de crecimiento, hormonas y citocinas.

Los leucocitos también están presentes en el calostro en grandes cantidades que permiten la protección contra virus y bacterias. Los leucocitos del calostro potencian la inmunidad pasiva del ternero neonatal, especialmente con respecto a los anticuerpos y a las clases de inmunoglobulina que son esenciales para la inmunidad intestinal.

Las grandes cantidades de anticuerpos secretados encontrados en el calostro ayudan a proteger las membranas mucosas en la garganta, los pulmones y los intestinos del recién nacido. El calostro bovino (CB) contiene tres clases principales de inmunoglobulinas: IgG, IgM e IgA.

Como se ha indicado anteriormente, el calostro es un producto verdaderamente único que surge de un estado fisiológico y funcional distinto de la glándula mamaria. En los rumiantes, la principal diferencia de composición entre el calostro y la leche madura es el contenido muy alto de componentes bioactivos, tales como la lactoferrina y las inmunoglobulinas (Tarbell, K.V. et al. J. Exp. Med. 199:1467-77 (2004); Bluestone, J.A. y Tang, Q. J. Autoimmun 24:55-62 (2005); Putnam, A.I. et al., J. Autoimmun. (2005) 24:55-62), de las cuales, la clase IgG, constituye del 80 al 90 %.

La inmunización de un animal, como una vaca, con antígenos específicos permite la producción y recogida de anticuerpos específicos que pueden utilizarse para la modulación de una respuesta inmunitaria y, por lo tanto, en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario. Por consiguiente, este método sirve como un medio fácil y seguro para generar anticuerpos específicos de antígenos y adyuvantes inmunitarios.

Varias patentes y solicitudes de patente anteriores de algunos de los presentes inventores describieron el uso de anticuerpos patógenos bacterianos específicos, obtenidos de calostro bovino para el tratamiento pasivo de las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, el documento WO 04/078209 de algunos de los presentes inventores describe compuestos y composiciones para el tratamiento o la profilaxis de trastornos gastrointestinales preparados inmunizando a un animal hospedador con una vacuna que comprende uno o más antígenos de la pared celular de las bacterias entéricas, en particular, de bacterias gramnegativas. El material hiperinmunitario producido está en forma de comprimidos para administración oral. El documento WO 03/097094 describe el uso de un calostro hiperinmunitario en la producción de anticuerpos (IgG entera), o fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub>, conjugados con calostro y extracto de calostro de mamífero, para la administración intranasal para la prevención de los síntomas derivados de la presencia de bacterias patógenas transmitidas por el aire.

La tolerancia de la mucosa se considera como un enfoque atractivo para el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias debido a la falta de toxicidad, facilidad de administración y mecanismo de acción específico de antígeno (Wershil, B.K. y Furuta, G.T.J. Allergy Clin. Immunol. 121: S380-3; quiz S415 (2008); Faria, A.M. y Weiner, H.L. Clin. Dev. Immunol. 13:143-57 (2006)). Por consiguiente, se han llevado a cabo intentos importantes de generar productos estables procedentes de calostro adecuados para administración nasal y oral. Por ejemplo, el documento WO 95/08562 de algunos de los inventores describe el método de obtención de inmunoglobulinas de alta pureza de calostro rico en anticuerpos y la posibilidad de comprimir estos anticuerpos de calostro en forma de comprimido sin pérdida sustancial de actividad. Pueden obtenerse anticuerpos específicos inmunizando a un mamífero con antígenos específicos contra bacterias enterotóxicas, tales como *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*. El documento WO 06/053383 de algunos de los inventores describe un ácido carboxílico y restos alcalinizantes que confieren a una composición de agente bioactivo de un calostro hiperinmunitario, lactoferrina o lactoferracina, estabilidad en una amplia variedad de valores de pH gástrico. Finalmente, el documento WO 03/080082 de algunos de los inventores, describe un método para mejorar la viabilidad de una sustancia bioactiva lábil, preferentemente inmunoglobulinas o sus fragmentos o enzimas, en un entorno gástrico, que comprende formar una mezcla de la sustancia bioactiva y de calostro y extractos de calostro de mamífero. Esta conjugación protege los anticuerpos o los fragmentos de los anticuerpos de la proteólisis ocasionada por enzimas o por condiciones de pH bajo y conserva su función en el estómago o en el rumen, o en otro entorno hostil.

La mucosa del intestino es el órgano linfóide más grande del cuerpo. Se ocupa de la doble función de absorción de nutrientes, manteniendo al mismo tiempo una barrera física e inmunológica al contenido intestinal. A pesar de la estimulación antigénica constante, su misión es suprimir la inflamación. Dos conceptos clave están relacionados con el tratamiento de la enfermedad vírica y sus complicaciones con el calostro: la translocación microbiana a través de la mucosa y la regulación inmunitaria potenciada mediante alimentación por vía oral de antígenos de la enfermedad, denominada "tolerancia oral".

Translocación microbiana a través de la mucosa aumentada: se trata de un concepto emergente en la patogénesis de la enfermedad. Los niveles más altos de translocación microbiana, cuantificada por la presencia de LPS y de ADN bacteriano son fundamentales para un estado de activación inmunitaria crónica que causa agotamiento

inmunitario y daño autoinmunitario.

La estimulación a través de la mucosa intestinal tiende a provocar una respuesta inmunitaria tolerogénica. Esta característica puede utilizarse ventajosamente para inducir tolerancia contra autoantígenos y, de esta manera, para suprimir la autoinmunidad. De hecho, se ha demostrado que la "tolerancia oral" disminuye eficazmente la respuesta inmunitaria contra antígenos suministrados por vía oral en distintos modelos de enfermedades (Safadi, R. et al., *AM J. Gastroenterol.* 98(11): 2505-15 (2003)).

Maghraby Amany et al., *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 14, n.º 4:432 - 438 (2005) divulgan que la leche madura y el calostro de camellos pueden tener una respuesta neuroprotectora contra el parásito *Schistosoma mansoni*.

Se ha demostrado previamente que pueden utilizarse preparaciones de calostro procedentes de animales bovinos en el tratamiento de afecciones intestinales mediadas por toxinas. En un estudio con 10 voluntarios expuestos por vía oral a un concentrado de *E. coli* enterotoxigénica, la administración de un concentrado de anticuerpos de bovinos obtenido inmunizando vacas con las cepas de *E. coli* correspondientes impidió el desarrollo de la diarrea en los 10 participantes que recibieron el producto; por el contrario, 9 de cada 10 controles desarrollaron diarrea (Tacket, C.O. et al., *N. Engl. J. Med.* 318(19): 1240-3 (1988)). En otro estudio, la administración de anticuerpos procedentes de la leche contra el factor de colonización de *E. coli* enterotoxigénica protegió a 14 de cada 15 sujetos de la diarrea, en comparación con 7 de cada 10 sujetos que recibieron placebo (Freedman, D.J. et al., *J. Infec. Dis.* 177(3): 662-7 (1998)). El documento WO2004/078209 divulga el tratamiento de trastornos gastrointestinales administrando una vacuna en material hiperinmunitario que se cultiva contra antígenos asociados a lipopolisacárido (LPS).

Otra enfermedad con una patogénesis similar es la colitis pseudomembranosa. Un estudio evaluó el efecto de la proteína de suero inmunitaria, obtenida inmunizando vacas con toxinas inactivadas de *C. difficile* y células completas destruidas de *C. difficile* y mostró que previene la recaída de la enfermedad por *C. difficile*. Dieciséis pacientes recibieron el producto después de un tratamiento estándar para un episodio confirmado de colitis por *C. difficile* durante dos semanas. En todos salvo en un caso, la toxina de *C. difficile* desapareció de las heces, y no había ninguna recurrencia después de un seguimiento medio de 333 días (van Dissel, J.T. et al., *J. Med Microbiol.* 54(2): 197-205 (2005)).

El documento WO2009/113065 divulga composiciones inmunomoduladoras que comprenden preparaciones de inmunoglobulina procedente del calostro de mamíferos para el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario.

En su conjunto, estas observaciones sugieren que las preparaciones de calostro procedente de animales bovinos liberan concentraciones biológicamente activas de anticuerpos específicos a la luz intestinal cuando se ingieren por vía oral y podrían ser capaces de bloquear varias formas de toxinas bacterianas en el intestino mediante ese mecanismo.

Dado que la translocación microbiana está activando la activación inmunitaria y la progresión de la enfermedad hepática, las estrategias que reducen o previenen la translocación microbiana pueden tener un impacto significativo en la activación inmunitaria y, por tanto, en la historia natural de la infección crónica del VHC. La presente divulgación demuestra a continuación el uso de preparaciones de calostro bovino en polvo (CBP) de vacas inmunizadas, que contienen altos niveles de anticuerpos, como inmunomoduladores capaces de reducir la activación inmunitaria en respuesta a productos microbianos tales como LPS. Sin estar ligado a ninguna teoría, los inventores establecen la hipótesis de que la fijación de los anticuerpos de CBP a los antígenos microbianos puede prevenir su translocación hacia el torrente sanguíneo, restringiendo así la respuesta inmunitaria. Estos efectos sobre el sistema inmunitario permiten el uso de dichas preparaciones de calostro para el tratamiento de enfermedades infecciosas, que afectan al sistema inmunitario. Más específicamente, la presente divulgación proporciona el uso de una preparación procedente de calostro, que comprende altas concentraciones de anticuerpos anti-LPS, en el tratamiento y la mejora de enfermedades hepáticas crónicas.

La translocación microbiana también se asocia a una alteración de la inflamación hepática en diferentes trastornos hepáticos, incluyendo la esteatohepatitis no alcohólica mediada por fármacos, mediada por virus y cualquier otra enfermedad hepática. La translocación microbiana también puede asociarse a la resistencia a la insulina, a la diabetes de tipo 2, a la obesidad y al sobrepeso. Como se muestra con la divulgación, la prevención de dicha translocación puede lograrse utilizando el calostro enriquecido con anti-LPS de la divulgación, opcionalmente junto con la regulación de las células T reguladoras, o cualquier otro componente del sistema inmunitario, utilizando una combinación del calostro enriquecido con anti-LPS calostro con preparaciones de calostro enriquecido con anticuerpos que reconocen antígenos específicos de enfermedad, por ejemplo, calostro enriquecido con anti-insulina. Por tanto, la divulgación proporciona adicionalmente composiciones, composiciones combinadas y métodos para el tratamiento de cualquier enfermedad hepática aguda o crónica, la diabetes y cualquier complicación asociada a las mismas, el hígado graso, la esteatohepatitis no alcohólica y la obesidad.

Por ello, es un objeto de la invención proporcionar el uso de calostro, o de preparaciones de inmunoglobulina

enriquecida con anti-LPS procedente de huevo de aves en composiciones y métodos de tratamiento, retraso o prevención de la progresión de la enfermedad hepática crónica, la cirrosis y cualquier complicación o trastorno asociados a las mismas.

- 5 Otro objeto de la invención es proporcionar composiciones combinadas que comprenden una combinación de calostro enriquecido con anticuerpos anti-LPS y anticuerpos que reconocen al menos un antígeno específico para un trastorno patológico y sus usos en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario.

Estos y otros objetos de la invención serán más claros a medida que se vaya exponiendo la descripción.

10

### Breve explicación de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los sujetos que padecen esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) pueden tratarse utilizando una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS. Por tanto, en el presente documento se proporcionan composiciones para su uso en el tratamiento de dichos sujetos de acuerdo con las reivindicaciones.

15

En un primer aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS, por ejemplo, una preparación de calostro bovino, como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) en un sujeto que tiene uno o más de: un nivel de ALT por encima de 50 UI/dl, un nivel de AST por encima de 50 UI/dl, una AP mayor de 70 U/l y/o una GGT mayor de 60 U/l, en donde la composición se formula para administración oral y la forma de dosis oral comprende de 200 mg a 2000 mg de IgG de forma que la inmunoglobulina anti-LPS es al menos el 7 % en peso de la composición de IgG.

20

25

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para la selección de un tratamiento para mejorar la función hepática en un sujeto. Los métodos incluyen detectar la presencia en una muestra del sujeto de uno o más de: un nivel de ALT por encima de 50 UI/dl, un nivel de AST por encima de 50 UI/dl, una AP mayor de 70 U/l y/o una GGT mayor de 60 U/l; y la selección de un tratamiento que comprende la administración al sujeto de una composición que comprende una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS. En algunas realizaciones, los métodos incluyen adicionalmente administrar el tratamiento al sujeto.

30

En otro aspecto más, la divulgación proporciona composiciones que incluyen una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS como se describe en el presente documento para su uso en mejorar la resistencia a la insulina en un sujeto que tiene uno o más de un nivel de HbA1c por encima de 7 y/o un nivel de secreción de insulina por encima de 300 pg/ml.

35

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para la selección de un tratamiento para mejorar la resistencia a la insulina en un sujeto. Los métodos incluyen la detección de la presencia en una muestra del sujeto de uno o más de: un nivel de HbA1c por encima de 7 y/o un nivel de secreción de insulina por encima de 300 pg/ml, y la selección de un tratamiento que comprende la administración al sujeto de una composición que comprende una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS. En algunas realizaciones, los métodos incluyen adicionalmente administrar el tratamiento al sujeto.

40

En algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto tiene síndrome metabólico o diabetes. En algunas realizaciones de la divulgación, la composición reduce los niveles de insulina en suero, aumenta los niveles de insulina en suero, mejora los niveles de glucosa en ayunas, reduce los niveles de HbA1c, o ambos.

45

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones que incluyen una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS como se describe en este documento para su uso en mejorar los niveles de colesterol en suero en un sujeto que tiene uno o más de un nivel de colesterol total en suero por encima de 6 uM/dl; un nivel de LDL en suero por encima de 4 uM/dl; y/o un nivel de triglicéridos en suero por encima de 2 o 2,5 uM/dl.

50

En un aspecto adicional, la divulgación dispone de métodos para la selección de un tratamiento para mejorar los niveles de colesterol en suero de un sujeto. Los métodos incluyen la detección de la presencia en una muestra del sujeto de uno o más de: un nivel de colesterol total en suero por encima del límite superior de lo normal; un nivel de LDL en suero por encima del límite superior de lo normal; un nivel de triglicéridos en suero por encima del límite superior de lo normal; y la selección de un tratamiento que comprende la administración al sujeto de una composición que comprende una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS. En algunas realizaciones, los métodos incluyen adicionalmente administrar el tratamiento al sujeto.

55

60

En el presente documento también se proporcionan composiciones que incluyen una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS como se describe en el presente documento para su uso en aumentar los niveles de GLP-1 o de adiponectina en un sujeto.

65

En el presente documento también se proporcionan composiciones que incluyen una preparación de calostro

enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de septicemia en un sujeto.

5 En el presente documento también se proporcionan composiciones que incluyen una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto.

En algunas realizaciones, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS se prepara inmunizando a una vaca con LPS que comprende O6, O8, O15, O25, O27, O63, O78, O114, O115, O128, O148, O153 y O159.

10 La preparación de inmunoglobulina anti-LPS se administra a una dosis de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 2000 mg al día, por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 1800 mg al día.

15 Por tanto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS, por ejemplo, una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS, por ejemplo, una preparación de calostro bovino, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico. La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS puede proceder de calostro o de huevos de ave.

20 En algunas realizaciones, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS es una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS, por ejemplo, una preparación de calostro bovino, producida por un método descrito en este documento.

25 En una realización, el trastorno patológico es una enfermedad hepática aguda o crónica, cirrosis o cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas. En otra realización, la enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas se selecciona del grupo que consiste en encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado. En otra realización, el trastorno patológico es un daño hepático.

30 En otra realización, el trastorno patológico es un trastorno relacionado con el sistema inmunitario seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, las enfermedades infecciosas y el trastorno proliferativo.

35 Como alternativa, el trastorno patológico puede seleccionarse del grupo que consiste en peritonitis secundaria e infección después de cirugía, cardiomiopatía hepática e hipotensión, síndrome hepatoadrenal, carcinoma hepatocelular, la enfermedad de Alzheimer, cualquier tipo de pérdida de memoria, cualquier tipo de demencia, trastornos de déficit de atención (ADHA, *Attention deficit hyperactivity disorder*), cualquier tipo de discapacidad del aprendizaje, efecto de alcohol o drogas en el cerebro, cualquier tipo de enfermedad mediada por el sistema inmunitario, incluido el asma, y la peritonitis.

40 En otra realización, la composición comprende adicionalmente una preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a, al menos, un antígeno específico de dicho trastorno patológico. La preparación adicional de inmunoglobulina puede proceder de calostro o de huevos de ave.

45 En una realización, la composición modula células T reguladoras, lo que conduce a la modulación del equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 contra una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria o una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria, inhibiendo así o activando una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

50 En otra realización, la composición modula el equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 contra una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria, inhibiendo así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, seleccionado de diabetes de tipo 2, la resistencia a la insulina, la obesidad y el sobrepeso.

55 En otra realización de la divulgación, la composición es para el tratamiento y/o la profilaxis del síndrome metabólico o la esteatohepatitis no alcohólica, o ambos. En otra realización de la divulgación, la composición es para el tratamiento y/o la profilaxis de la diabetes, el tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa, tal como disminución de la tolerancia a la glucosa, disminución de los niveles de insulina, disminución de los niveles de triglicéridos hepáticos o disminución de los niveles de colesterol.

60 En una realización, la composición modula el equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 contra una respuesta

inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria, potenciando así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de enfermedades infecciosas y trastornos proliferativos.

- 5 La composición puede comprender además un agente terapéutico, un vehículo o un adyuvante y/o calostro no hiperinmunitario.

10 La composición puede formularse para administración por vía oral, por inhalación como un aerosol, o para administración parenteral, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica o rectal, o cualquier combinación de las mismas.

La preparación de calostro o de alguna de sus fracciones comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a LPS.

- 15 En algunas realizaciones, la composición inhibe la translocación microbiana. En algunas realizaciones, la composición inhibe la translocación microbiana y, de esa forma, modula la activación inmunitaria.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS para modular la tolerancia inmunitaria en un sujeto, o en otro aspecto, para modular la tolerancia oral en un sujeto.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación procedente de calostro de mamífero enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS para la inducción de células de T CD4+ CD25+ en el hígado, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP- en el hígado, inducción de células T CD45+ LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD3+ LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD45+ LAP+ en el bazo, la inducción de las células T CD8+ LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD3+ LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+ CD25+ en el bazo, la inducción de células T CD4+ CD25+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD3+ LAP+ en tejido adiposo, la inducción de células T CD4+ CD25+ en células vasculares del estroma, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP+ en células vasculares del estroma, la disminución de células CD3+ NK1.1+ en el hígado, la disminución de células T CD25+ LAP- en el hígado, el aumento de células T CD25+ LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP- en el bazo, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP- en tejido adiposo.

35 La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS que se describe como parte de la divulgación en el presente documento puede proceder de calostro o de huevos de ave. En algunas realizaciones, la preparación es una preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS, por ejemplo, una preparación de calostro bovino, producida por un método descrito en el presente documento.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico.

La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS de la divulgación puede proceder de calostro o de huevos de ave.

- 45 En una realización de la divulgación, el trastorno patológico es una enfermedad hepática aguda o crónica, cirrosis o cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas.

50 En otra realización, la enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas se selecciona del grupo que consiste en encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado.

55 En otra realización de la divulgación, el medicamento es para el tratamiento y/o la profilaxis del daño hepático.

60 En otra realización, el trastorno patológico es un trastorno relacionado con el sistema inmunitario seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, las enfermedades infecciosas y el trastorno proliferativo. Como alternativa, el trastorno patológico se selecciona del grupo que consiste en peritonitis secundaria e infección después de cirugía, la cardiomiopatía hepática e hipotensión, el síndrome hepatoadrenal, el carcinoma hepatocelular, la enfermedad de Alzheimer, cualquier tipo de pérdida de memoria, cualquier tipo de demencia, trastornos de déficit de atención (ADHA), cualquier tipo de discapacidad del aprendizaje, el efecto del alcohol o drogas en el cerebro, cualquier tipo de enfermedad mediada por el sistema inmunitario, incluido el asma, y la peritonitis.

65 El medicamento puede comprender además una preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas

que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico de dicho trastorno patológico. La preparación adicional de inmunoglobulina puede proceder de calostro o de huevos de ave.

5 En una realización, el medicamento modula células T reguladoras, lo que conduce a la modulación del equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 contra una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria o una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria, inhibiendo así o activando una respuesta inmunitaria dirigida específicamente contra dicho trastorno.

10 En otra realización, el medicamento modula el equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 contra una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria, inhibiendo así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, seleccionado de la diabetes de tipo 2, la resistencia a la insulina, la obesidad y el sobrepeso.

15 En otra realización, el medicamento es para el tratamiento y/o la profilaxis del síndrome metabólico o la esteatohepatitis no alcohólica, o ambos, el tratamiento y/o la profilaxis de la diabetes, el tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa, tal como la disminución de la tolerancia a la glucosa, la disminución de los niveles de insulina, la disminución de los niveles de triglicéridos hepáticos o la disminución de los niveles de colesterol.

20 En una realización, el medicamento modula el equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 contra una respuesta inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria, potenciando así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de enfermedades infecciosas y trastornos proliferativos.

25 El medicamento puede comprender además un agente terapéutico, un vehículo o un adyuvante y/o calostro no hiperinmunitario.

30 En algunas realizaciones, el medicamento se formula para la administración por vía oral, por inhalación como un aerosol, o para administración parenteral, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica o rectal, o cualquier combinación de las mismas.

35 En algunas realizaciones, la preparación de inmunoglobulina o de alguna de sus fracciones reconoce y se une a LPS o cualquiera de sus fragmentos.

En algunas realizaciones, la composición reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa y modula así la activación inmunitaria.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS en la fabricación de un medicamento para modular la tolerancia inmunitaria en un sujeto, o en otra realización, un medicamento para modular la tolerancia oral en un sujeto.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una preparación procedente de calostro de mamífero enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para la inducción de células de T CD4+ CD25+ en el hígado, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP- en el hígado, la inducción de células T CD45+ LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD3+ LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD45+ LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+ LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD3+ LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+ CD25+ en el bazo, la inducción de células T CD4+ CD25+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD3+ LAP+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD4+ CD25+ en células vasculares del estroma, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP+ en células vasculares del estroma, la disminución de células CD3+ NK1.1+ en el hígado, la disminución de células T CD25+ LAP- en el hígado, el aumento de células T CD25+ LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP- en el bazo, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP- en el tejido adiposo.

55 La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS de la divulgación puede proceder de calostro o de huevos de ave.

60 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS. La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS puede proceder de calostro o de huevos de ave.

En una realización, el trastorno patológico es enfermedad hepática aguda o crónica, cirrosis o cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas.

65 En otra realización, la enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación

asociada a las mismas se selecciona del grupo que consiste en encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado.

5 En otra realización, el trastorno patológico es un daño hepático.

10 En otra realización, el trastorno patológico es un trastorno relacionado con el sistema inmunitario seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, enfermedades infecciosas y trastorno proliferativo. Como alternativa, el trastorno patológico se selecciona del grupo que consiste en una peritonitis secundaria e infección después de la cirugía, cardiomiopatía hepática e hipotensión, un síndrome hepatoadrenal, carcinoma hepatocelular, la enfermedad de Alzheimer, cualquier tipo de pérdida de memoria, cualquier tipo de demencia, trastornos de déficit de atención (ADHA), cualquier tipo de discapacidad del aprendizaje, el efecto del alcohol o drogas en el cerebro, cualquier tipo de enfermedad mediada por el sistema inmunitario, incluido el asma, y la peritonitis.

15 En otra realización, la composición comprende adicionalmente una preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico para dicho trastorno patológico. La preparación de inmunoglobulina puede proceder de calostro o de huevos de ave.

20 En otra realización, la composición modula las células T reguladoras que conducen a la modulación del equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria o una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria, inhibiendo o activando de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

25 En otra realización, la composición modula el equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3, inhibiendo de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a estos, seleccionado de la diabetes de tipo 2, la resistencia a la insulina, la obesidad y el sobrepeso.

En otra realización, el trastorno patológico es un síndrome metabólico o una esteatohepatitis no alcohólica, o ambos.

30 En otra realización, el trastorno patológico es la diabetes. En otra realización, el trastorno patológico es la tolerancia alterada a la glucosa.

35 En otra realización, el método disminuye la tolerancia a la glucosa, disminuye los niveles de insulina en suero, disminuye los niveles de triglicéridos hepáticos o disminuye los niveles de colesterol.

40 En otra realización, el método modula el equilibrio de células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria, aumentando de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de enfermedades infecciosas y trastornos proliferativos.

45 En otra realización, la composición comprende adicionalmente calostro no hiperinmunitario y/o un agente, adyuvante o vehículo terapéutico.

50 La composición se puede administrar por vía oral, por inhalación como aerosol, o por administración parenteral, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica o rectal, o cualquier combinación de las mismas.

En otra realización, la preparación de inmunoglobulina o de cualquiera de sus fracciones reconoce y se une a LPS o a cualquiera de sus fragmentos.

55 En otra realización, el método reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa. En otra realización, el método reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa y modula así la activación inmunitaria.

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para modular la tolerancia inmunitaria en un sujeto que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS de mamífero. Como alternativa, el método puede ser para modular la tolerancia oral.

65 Un método para inducir células T CD4+ CD25+ en el hígado de un sujeto comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS de mamífero. En otra realización, como parte de la divulgación se proporciona un método que puede ser para inducir células T CD4+ CD25+ LAP- en el hígado, células

T CD45+ LAP+ en el hígado, inducir células T CD3+ LAP+ en el hígado, inducir células T CD45+ LAP+ en el bazo, inducir células T CD8 + LAP+ en el bazo, inducir células T CD3 + LAP+ en el bazo, inducir células T CD8 + CD25+ en el bazo, inducir células T CD4 + CD25+ en el tejido adiposo, inducir células T CD3 + LAP+ en el tejido adiposo, inducir células T CD4 + CD25+ en las células vasculares estromales, inducir células T CD4 + CD25 + LAP+ en las células vasculares estromales, disminuir las células CD3+ NK1.1+ en el hígado, disminuir las células T CD25+ LAP- en el hígado, disminuir las células T CD25 + LAP+ en el hígado, inducir células T CD4+ CD25+ LAP- en el bazo o inducir células T CD4+ CD25+ LAP- en el tejido adiposo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición para el tratamiento y la profilaxis de un trastorno patológico. La composición de la invención comprende, como principio activo, una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-lipopolisacárido (anti-LPS) de mamífero y además, opcionalmente, calostro, leche o uno o más componentes de productos lácteos y cualquier adyuvante/s. La preparación de inmunoglobulina o de cualquiera de sus fracciones reconoce y se une a LPS y a cualquiera de sus fragmentos. Según una realización opcional, la composición de la invención puede comprender además la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro que reconoce al menos un antígeno específico para dicho trastorno, activando o inhibiendo así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno. Dicha composición combinada puede comprender opcionalmente además un agente terapéutico adicional o cualquier vehículo y adyuvante.

Por tanto, según una realización específica, la divulgación proporciona una composición que comprende como principio activo una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-lipopolisacárido (LPS) de mamífero. En donde dicha composición es particularmente aplicable para el tratamiento, la prevención y la profilaxis de una enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas, comprendiendo opcionalmente dicha composición además un agente terapéutico adicional o cualquier vehículo y adyuvante.

Según otra realización opcional, la divulgación proporciona composiciones combinadas que comprenden una combinación de preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS con al menos una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro o de huevos de ave que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico para dicho trastorno patológico. Opcionalmente, dicha composición combinada puede comprender además un agente terapéutico adicional o cualquier vehículo y adyuvante. Estas composiciones combinadas pueden utilizarse para el tratamiento de cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado los mismos, tal como la diabetes de tipo 2, la resistencia a la insulina, la obesidad y el sobrepeso.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS de mamífero y, opcionalmente, una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro que reconoce a al menos un antígeno específico de un trastorno patológico en la fabricación de una composición para el tratamiento y la profilaxis de un trastorno patológico. Cabe señalar que la preparación de inmunoglobulina o de cualquiera de sus fracciones reconoce y se une a LPS y a cualquiera de sus fragmentos. Según una realización opcional, la divulgación proporciona el uso de la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS de la divulgación que favorece la combinación con al menos una preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas que reconocen a al menos un antígeno específico para dicho trastorno. Dicha composición combinada puede utilizarse como una composición inmunomoduladora que activa o inhibe la respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico. El método de la divulgación comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS procedente de calostro de mamífero o de una composición que comprende la misma. Cabe señalar que la preparación de inmunoglobulina o de cualquiera de sus fracciones reconoce y se une a LPS y a cualquiera de sus fragmentos. Dicho método puede utilizarse para el tratamiento, la prevención y la profilaxis de una enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas. Según una realización opcional, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS de la divulgación puede combinarse además con al menos una inmunoglobulina que reconozca al menos un antígeno específico para dicho trastorno, activando o inhibiendo de este modo una respuesta inmunitaria específicamente dirigida hacia dicho trastorno. Este método puede ser específicamente aplicable para el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario. Debe apreciarse particularmente que las composiciones y composiciones combinadas utilizadas por los métodos de la divulgación pueden ser también aplicables para el tratamiento de cualquiera de una esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado los mismos, tal como la diabetes de tipo 2, la resistencia a la insulina, la obesidad y el sobrepeso.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de un sujeto humano con una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertensión, un aumento del índice de masa corporal (IMC), un incremento de la circunferencia de la cintura, la dislipidemia, la resistencia a la insulina, niveles elevados de enzimas hepáticas e hígado graso, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que

comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un sujeto humano con una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertensión, aumento del índice de masa corporal (IMC), incremento de la circunferencia de la cintura, dislipidemia, resistencia a la insulina, niveles elevados de enzimas hepáticas e hígado graso.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un sujeto humano con una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertensión, un aumento del índice de masa corporal (IMC), un incremento de la circunferencia de la cintura, la dislipidemia, la resistencia a la insulina, niveles elevados de enzimas hepáticas y el hígado graso.

15 La hipertensión puede caracterizarse por una presión arterial > 120 mmHg/80 mmHg, una presión arterial > 130 mmHg/90 mmHg o por una presión arterial > 140 mmHg/90 mmHg.

20 El hígado graso puede caracterizarse por una esteatosis macrovesicular, esteatosis macrovesicular y una actividad necroinflamatoria, o por una puntuación NAS de al menos 4.

La preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede proceder de calostro o de huevos de ave.

25 La preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede administrarse a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25.000 mg diarios, de 10 mg a aproximadamente 20.000 mg diarios, de 25 mg a aproximadamente 15.000 mg diarios, de 100 mg a aproximadamente 2000 mg diarios, o de aproximadamente 1800 mg diarios. En una realización, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS no se administra a una dosis de aproximadamente 600 mg diarios.

30 La preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede formularse para su administración a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25.000 mg diarios, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20.000 mg diarios, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 15.000 mg diarios, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 2000 mg diarios o de aproximadamente 1800 mg diarios. En una realización, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS no está formulada para la administración a una dosis de aproximadamente 600 mg diarios.

35 La preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede prepararse para inmunizar a un mamífero o un ave con LPS de varias cepas de *E. coli*. El mamífero o el ave puede inmunizarse con LPS seleccionado del grupo que consiste en O6, O8, O15, O25, O27, O63, O78, O114, O115, O128, O148, O153, O159 y otros LPS asociados a *E. coli* enterotoxigénica.

40 El mamífero o el ave pueden inmunizarse con LPS seleccionado del grupo que consiste en O78, O6, O8, O129 y O153 LPS. El LPS puede comprender LPS O78.

En otra realización, la composición comprende adicionalmente una preparación de inmunoglobulina anti-insulina.

45 La preparación de inmunoglobulina anti-insulina se administra a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25.000 mg diarios, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20.000 mg diarios, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 15.000 mg diarios, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 10.000 mg diarios, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 4000 mg diarios, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 3000 mg diarios, de aproximadamente 1000 mg a aproximadamente 1400 mg diarios, o de aproximadamente 1200 mg diarios.

50 La preparación de inmunoglobulina anti-insulina puede formularse para su administración a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25.000 mg diarios, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20.000 mg diarios, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 15.000 mg diarios, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 10.000 mg diarios, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 4000 mg diarios, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 3000 mg diarios, de aproximadamente 1000 mg a aproximadamente 1400 mg diarios o de aproximadamente 1200 mg diarios.

60 La preparación de inmunoglobulina anti-insulina puede prepararse para inmunizar a un mamífero o un ave con insulina conjugada con hemocianina de lapa californiana (KLH, *keyhole limpet hemocyanin*).

65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir los niveles de glucosa en ayunas en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar el pico inicial de secreción de

insulina en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir la tolerancia oral a la glucosa en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulinas anti-LPS.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de HBA1C en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de triglicéridos en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de colesterol total en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de colesterol LDL en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de ALT en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de AST en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de ALP en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de GGT en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de GLP-1 en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de adiponectina en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la proporción de adiponectina/IL-6 en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar las células T reguladoras CD25+ en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir el peso corporal en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir la circunferencia de la cintura o la circunferencia del brazo en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

- 5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la reducción de niveles de glucosa en ayunas en un paciente humano que lo necesite
- 10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el aumento del pico inicial de secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite
- 15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el aumento de la secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite.
- 20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de HBA1C en un paciente humano que lo necesite
- 25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de triglicéridos en un paciente humano que lo necesite.
- 30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de colesterol total en un paciente humano que lo necesite.
- 35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de ALT en un paciente humano que lo necesite.
- 40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de AST en un paciente humano que lo necesite.
- 45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de ALP en un paciente humano que lo necesite.
- 50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de GGT en un paciente humano que lo necesite.
- 55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el aumento de los niveles de GLP-1 en un paciente humano que lo necesite.
- 60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el aumento de los niveles de adiponectina en un paciente humano que lo necesite.
- 65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el aumento de la proporción de adiponectina/IL-6 en un paciente humano que lo necesite.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el aumento de las células T reguladoras CD25+ en un paciente humano que lo necesite.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de

inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de peso corporal en un paciente humano que lo necesite.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de la circunferencia de la cintura o la circunferencia del brazo en un paciente humano que lo necesite.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de glucosa en ayunas en un paciente humano que lo necesite.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar el pico inicial de secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir la tolerancia oral a la glucosa en un paciente humano que lo necesite.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar la secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de HBA1C en un paciente humano que lo necesite.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de triglicéridos en un paciente humano que lo necesite.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de colesterol total en un paciente humano que lo necesite.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de colesterol LDL en un paciente humano que lo necesite.

50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de ALT en un paciente humano que lo necesite.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de AST en un paciente humano que lo necesite.

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de ALP en un paciente humano que lo necesite.

65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de GGT en un paciente humano que lo necesite.

70 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar los niveles de GLP-1 en un paciente humano que lo necesite.

75 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar los niveles de adiponectina en un paciente humano que lo necesite.

80 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar la proporción de adiponectina/IL-6 en un paciente humano que lo necesite.

85 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar las células T reguladoras CD25+ en un paciente humano que lo necesite.

90 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir el peso corporal en un paciente humano que lo necesite.

95 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir la circunferencia de la cintura o la circunferencia del brazo en un paciente humano que lo necesite.

100 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un ser humano que padece una

enfermedad mediada por células T que comprende administrar al ser humano una cantidad eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad mediada por células T.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un sujeto humano que padece una enfermedad mediada por células T

15 La enfermedad mediada por células T puede ser la resistencia a la insulina, la tolerancia alterada a la glucosa, la diabetes, el síndrome metabólico, o una enfermedad asociada a las mismas, o esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad seleccionada de la resistencia a la insulina o trastornos asociados que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad seleccionada de resistencia a la insulina o trastornos asociados.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad seleccionada de la resistencia a la insulina o trastornos asociados.

30 La resistencia a la insulina o un trastorno asociado puede ser la diabetes, el síndrome metabólico o la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

### Breve descripción de los dibujos

35 En las figuras, se denomina de diversas maneras, como Imm124-E, Travelan, anti-LPS, T-IgG (producida por la vacunación con cepas múltiples) y CBHI (producida por la vacunación con una cepa única), la preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS que se utiliza en algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento.

40 Figura 1: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye las enzimas hepáticas. Los valores son medias  $\pm$  DT. AST; aspártico transaminasa y ALT; alanina aminotransferasa.

45 Figura 2A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+ en el hígado. A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B; transferencia puntual procedente de análisis FACS.

50 Figura 3A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD25+CD4+LAP-, CD45+LAP+ y CD3+LAP+ en el hígado. Los valores son medias. A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. B; transferencia puntual procedente de análisis FACS.

55 Figura 4A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de las células T reguladoras CD45+LAP+ y CD8+LAP+ en el bazo. A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. B; Una transferencia puntual procedente de análisis FACS de los marcadores de los linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B; transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

Figura 5: El calostro con IgG-T oral disminuye la insulina en suero en ratones Ob/Ob. Los valores son medias  $\pm$  DT.

60 Figura 6: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye la tolerancia a la glucosa en ratones Ob/Ob.

65 Figura 7: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye la lesión hepática en ratones Ob/Ob. Los valores son medias  $\pm$  DT. AST; aspártico transaminasa y ALT; alanina aminotransferasa.

Figura 8: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye los triglicéridos (TG) hepáticos en ratones Ob/Ob. Los valores son medias  $\pm$  DT.

5 Figura 9A-B: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD3+LAP+ en el bazo. A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B; transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

10 Figura 10: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD8+CD25+ en el bazo. Los valores son medias  $\pm$  DT.

15 Figura 11: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD8+CD25+ en el bazo. Se muestra una transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

20 Figura 12A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+ en el tejido adiposo. A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B; transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

25 Figura 13A-B. La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD3+LAP+ en el tejido adiposo. A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B; transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

30 Figura 14A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+ en células vasculares estromales (que contienen preadipocitos). A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B; transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

35 Figura 15A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de linfocitos CD4+CD25+LAP+ en células vasculares estromales (que contienen preadipocitos). A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B; transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

40 Figura 16: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta las enzimas hepáticas en ratones Ob/Ob. Los valores son medias  $\pm$  DT. AST; aspártico transaminasa y ALT; alanina aminotransferasa.

Figura 17: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye el colesterol total en ratones Ob/Ob. Los valores son medias  $\pm$  DT.

45 Figura 18: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye los TG hepáticos en ratones Ob/Ob. La administración oral de calostros de preparaciones de inmunoglobulina con T-IgG y anti-LPS (indicada como CBHI) disminuye los TG hepáticos en ratones Ob/Ob. Los valores son medias  $\pm$  DT. La disminución fue significativa para el grupo A en comparación con los grupos D, E, F (\*  $p < 0,05$ ).

50 Figura 19A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuyó las células CD3+NK1.1+ en los hígados de ratones Ob/Ob. A. La administración oral de 1 ug, 1mg, 3 mg de T-IgG, junto con 100 ug de CBHI, disminuyó las células CD3+NK1.1+ en los hígados de ratones Ob/Ob. Expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B: La administración oral de 1 ug y 100 ug de T-IgG disminuyó las células CD3+NK1.1+ en los hígados de ratones Ob/Ob. Transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

55 Figura 20A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumentó las células CD4+CD25+LAP-/LAP+ en el hígado de ratones Ob/Ob. A; expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B; transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

60 Figura 21: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS induce cambios en linfocitos CD25+LAP- hepáticos. La administración oral de calostros de T-IgG y de CBHI induce cambios en los linfocitos CD25+LAP- hepáticos. Transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

65 Figura 22A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye los linfocitos CD25+LAP+ esplénicos. A. La administración oral de calostros de T-IgG y de CBHI

disminuye los linfocitos CD25+LAP+ esplénicos. Expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B: transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

5 Figura 23: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta los linfocitos CD4+CD25+LAP- esplénicos. La administración oral de 1 y 3 mg de calostros de T-IgG y de 100 mg de CBHI aumenta los linfocitos CD4+CD25+LAP- esplénicos.

10 Figura 24: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta CD4+CD25+ en el tejido adiposo. A. La administración oral de calostro de T-IgG aumenta CD4+CD25+ en el tejido adiposo. Expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT.

15 Figura 25A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta CD4+CD25+ en adipocitos. A. La administración oral de 100 mg de calostro de T-IgG aumenta CD4+CD25+ en adipocitos. Expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B. La administración oral de 1 ug, 100 mg y 1 mg de calostro de T-IgG aumenta CD4+CD25+ en adipocitos. Transferencia puntual procedente de análisis FACS.

20 Figura 26A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta CD3+LAP+ en adipocitos. A. La administración oral de calostro de T-IgG aumenta CD3+LAP+ en adipocitos. Expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B: transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

25 Figura 27A-B: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta CD4+CD25+ en adipocitos. A. La administración oral de calostro de T-IgG aumenta CD3+LAP+ en adipocitos. Expresión de superficie promedio de marcadores en linfocitos. Los valores son medias  $\pm$  DT. B: transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS.

30 Figura 28A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS disminuye la lesión hepática en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) disminuye la ALT; 54,5 frente a 43,16, u/l, ( $p < 0,04$ ).

35 Figura 29A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS disminuye la lesión hepática en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) disminuye la AST - 50,58 frente a 45,5 u/l, ( $p < 0,05$ ).

Figura 30A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS disminuye la lesión hepática en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) disminuye la fosfatasa alcalina (AP/ALP): 82,1 frente a 72,4 u/l, ( $p < 0,001$ ).

40 Figura 31A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS disminuye la lesión hepática en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) disminuye la GGT 84,3 frente a 58,6 u/l, ( $p < 0,05$ ).

45 Figura 32A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS disminuye los niveles de glucosa en ayunas en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) disminuye los niveles de glucosa (suero) en ayunas (6,9 frente a 6,05 mmol/l,  $p < 0,03$ ).

50 Figura 33A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS aumenta el pico inicial de secreción de insulina en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce una elevación en el pico inicial de secreción de insulina tras la administración de glucosa (278 frente a 470 pmol/l,  $p < 0,03$ ).

55 Figura 34A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS mejora la tolerancia oral a la glucosa en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce un OGTT mejorado (área bajo la curva (ABC) de 2492 frente a 2252,  $p < 0,05$ ).

60 Figura 35A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS aumenta la mejora de los niveles de HB1Ac en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce niveles de HBA1C mejorados (7,19 frente a 6,20,  $p < 0,001$ ).

Figura 36A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS mejora las puntuaciones HOMA en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce puntuaciones HOMA mejoradas (6,71 frente a 4,82,  $p < 0,06$ ).

65 Figura 37A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS aumenta los niveles GLP-1 en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce niveles de GLP-1

aumentados en el 60 % de los pacientes tratados, (58,816 frente a 62,828 pM,  $p<0,04$ ).

5 Figura 38A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS aumenta los niveles de adiponectina 1 en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce niveles de adiponectina aumentados en el 80 % de los pacientes tratados, (6181 frente a 7068, ng/ml,  $p<0,01$ ).

10 Figura 39A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS disminuye los niveles de colesterol total en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce niveles de colesterol total disminuidos (5,28 frente a 4,44  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p<0,04$ ).

15 Figura 40A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS disminuye los niveles de colesterol LDL en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce niveles de colesterol LDL disminuidos (3,7 frente a 2,49  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p<0,05$ ).

20 Figura 41A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS disminuye los niveles de triglicéridos en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce niveles de triglicéridos disminuidos (1,88 frente a 1,32  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p<0,05$ ).

25 Figura 42A-D: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS aumenta los niveles de células T reguladoras CD4+CD25+ en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce niveles aumentados de Tregs CD25+ (5,24 % frente a 7,12 %), como se muestra en 42A-B. Se observa un aumento significativo ( $p=0,002$ ) en células HLA-DR CD4+CD25+ en la figura 42C. La figura 42D muestra un aumento en células CD4+ CD62+.

30 Figura 43A-B: La preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS aumenta los niveles de células T reguladoras CD4+CD25+ en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) produce niveles de Tregs CD4+CD25+Foxp3+ aumentados (2 % frente a 2,26 %, respectivamente,  $p<0,002$ ).

35 Figura 44: La inmunoglobulina oral anti-insulina disminuye la lesión hepática en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) disminuye los niveles de ALT en suero en el 90 % de los pacientes (67 frente a 48 u/l, ( $p<0,01$ )).

40 Figura 45: La inmunoglobulina oral anti-insulina disminuye la lesión hepática en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) disminuye los niveles de AST en suero en el 80 % de los pacientes (59 frente a 48 u/l, ( $p<0,05$ )).

45 Figura 46: La inmunoglobulina oral anti-insulina disminuye la lesión hepática en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) disminuye los niveles de AP en suero en el 70 % de los pacientes (101 frente a 91 u/l, ( $p<0,004$ )).

50 Figura 47: La inmunoglobulina oral anti-insulina disminuye la lesión hepática en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) disminuye los niveles de GGT en suero en el 80 % de los pacientes (70 frente a 58 u/l, ( $p<0,004$ )).

55 Figura 48: La inmunoglobulina oral anti-insulina disminuye los niveles de glucosa en ayunas en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) disminuye los niveles de glucosa (suero) en ayunas en el 80 % de los pacientes (6,01 frente a 5,55 u/l, ( $p<0,008$ )).

60 Figura 49: La preparación oral de inmunoglobulina anti-insulina aumenta el pico inicial de secreción de insulina en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina ((CBHI) produce una elevación en el pico inicial de secreción de insulina después de la administración de glucosa en el 70 % de los pacientes (541 frente a 679 pmol/l,  $p<0,02$ ).

65 Figura 50: La preparación oral de inmunoglobulina anti-insulina mejora la tolerancia oral a la glucosa en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) produce un OGTT mejorado (área bajo la curva (ABC)) en el 80 % de los pacientes de 1515 frente a 1420,  $p<0,02$ ).

Figura 51: La preparación oral de inmunoglobulina anti-insulina disminuye los niveles de colesterol total en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) produce una disminución de los niveles de colesterol total en suero en el 70 % de los pacientes tratados (4,9 frente a 4,47,  $p<0,03$ ).

Figura 52: La preparación oral de inmunoglobulina anti-insulina aumenta los niveles de células T reguladoras CD4+CD25+ en seres humanos. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) produce un aumento de Tregs CD4+CD25+ en el 60 % de los pacientes (2,95 % frente a 4,27 %,  $p<0,003$ ).

Figuras 54 y 55: Resultados de un ensayo ELISA para la determinación específica del título de anticuerpos anti LPS en vacunas de una sola cepa (54) y en vacunas de cepas múltiples (55).

5 La Figura 56 es un gráfico que muestra la pérdida de peso (% de pérdida de peso de su peso inicial) en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal.

10 La Figura 57 es un gráfico que muestra que los ratones en un modelo animal de tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal con una preparación de calostro enriquecida con LPS Ig, en las dos dosis examinadas, mejoraron la clasificación histológica del colon en los cuatro parámetros ensayados.

15 La Figura 58 muestra los efectos observados en poblaciones de células T reguladoras en el bazo en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal después del tratamiento con una preparación de calostro enriquecida con Ig anti LPS. Las células CD4+CD25+ aumentaron debido al tratamiento de dosis de 500 mg de anti LPS y control de calostro, sin embargo, la dosis de 50 mg de anti LPS causó una disminución significativa en la expresión de este marcador en el bazo. Las células CD4+FOXP3+ aumentaron debido a una dosis más alta de la preparación de calostro enriquecida con Ig anti-LPS, en comparación con el control de calostro.

20 La Figura 59 muestra que, en el mismo modelo animal que se describe en la figura 58, en el hígado, no se observaron cambios significativos después del tratamiento con la preparación de calostro enriquecida con Ig anti-LPS.

25 La Figura 60 es un gráfico de barras que muestra que, en el mismo modelo animal que se describe en la Figura 58, la dosis más alta (500 ug) de la preparación de calostro enriquecida con Ig anti LPS indujo un aumento en los niveles en suero de IL-10, una citocina antiinflamatoria.

30 La Figura 61 muestra los resultados de un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) que demuestra una disminución dependiente de la dosis en la translocación bacteriana en un modelo de septicemia después del tratamiento con la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS durante 10 días. La septicemia se indujo por inyección IP de 1 mg de LPS y de 20 mg de Gal/N el último día del experimento, 5 horas antes de sacrificar a los ratones.

35 La Figura 62 muestra que, en el mismo modelo que el de la Figura 61, ambas dosis mejoraron la función hepática en comparación con el calostro de control (CBP).

### Descripción detallada de la invención

40 Una respuesta inmunitaria productiva resulta de la integración eficaz de señales positivas y negativas que tienen un impacto en las células inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Cuando dominan las señales positivas, se presentan respuestas proinflamatorias y activación celular, produciendo la eliminación de microorganismos patógenos, virus, así como una célula transformada. En ausencia de tal estímulo productivo, se bloquea la activación celular y pueden producirse respuestas antiinflamatorias activas. La modulación de este sistema binario se produce a través de la acción de citocinas, de rutas de señalización aguas abajo y del contacto entre células. La alteración de estos umbrales puede producir respuestas aberrantes que son insuficientes para lidiar con microorganismos patógenos o producir la pérdida de tolerancia y la inducción de respuestas autoinmunitarias. La presente divulgación muestra que un efecto inmunomodulador de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anticuerpos anti-lipopolisacárido (LPS) puede actuar de manera activa para el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario.

50 Las células T reguladoras (Tregs) cada vez se reconocen más como un componente inmunomodulador importante del sistema inmunitario adaptativo. La desregulación inmunitaria puede conducir a inflamación crónica como un desencadenante de insensibilidad crónica a la insulina. La presente divulgación muestra, en un ejemplo particular, que la administración oral de anticuerpos anti-LPS procedentes de calostro promueve las células Tregs en tejido adiposo y en tejido adiposo asociado a vasculatura estromal. Estas alteraciones están asociadas al alivio del síndrome metabólico y del daño hepático en el modelo de ratones ob/ob. Por lo tanto, la presente divulgación se proporciona como una novedosa composición terapéutica para el alivio y el tratamiento del síndrome metabólico.

60 Los presentes inventores han demostrado que los anticuerpos anti-LPS administrados por vía oral promueven las células Tregs en el hígado, el bazo, el tejido adiposo y la VE (células de la vasculatura estromal). Las células T CD25+LAP+, células T CD4+CD25+, células T CD4+CD25+ LAP-, células T CD45+LAP+ y CD3+LAP+ se inducen en el hígado. Las células T CD45+LAP+, células T CD8+LAP+, T CD3+LAP+, células T CD8+CD25+ se inducen en el bazo. Las células T CD4+CD25+, células T CD3+LAP+, células T CD4+CD25+LAP- se inducen en el tejido adiposo. Las células T CD4+CD25+ y las células T CD4+CD25+LAP+ se inducen en las células de la vasculatura estromal, las células CD3+NK1.1+ en el hígado y las células T CD25+LAP- están disminuidas en el hígado.

65 Diversos constituyentes del tejido adiposo, tales como los adipocitos maduros y las células vasculares estromales,

- 5 tienen distintas funciones. Expresan y secretan diferentes tipos de moléculas bioactivas, denominadas en su conjunto adipoquinas. Patrones alterados de secreción de adipoquinas caracterizan la obesidad y la resistencia a la insulina, que son factores de riesgo principales para la diabetes mellitus de tipo 2. Diferencias regionales y genotípicas están presentes en células vasculares estromales de ratas Zucker obesas y magras (Turkenkopf, I. J. et al., *Int. J. Obes.* 12:515-24 (1988)). El perfil de expresión génica utilizando micromatrices de DNA mostró diferencias entre el tejido adiposo, los adipocitos y las células vasculares estromales (Permana (2008) *ibid.*). La presente divulgación confirma adicionalmente esta idea, mostrando que la distribución de las Tregs en estos tejidos es importante en el síndrome metabólico y en las enfermedades hepáticas.
- 10 La divulgación muestra adicionalmente que la promoción de las células Tregs en el tejido adiposo y en la vasculatura estromal (VE) mediante la administración de anticuerpos anti-LPS está asociada al alivio de la resistencia a la insulina. Esto se demuestra mediante pruebas de tolerancia a la glucosa. Además, el daño inflamatorio hepático se alivia con la presente divulgación, como se pone de manifiesto por una disminución en las enzimas hepáticas.
- 15 Como se ha descrito anteriormente, la divulgación muestra que la administración oral de calostro enriquecido con anticuerpos anti-LPS puede servir como un medio para promover células Tregs en el tejido adiposo y en el tejido adiposo asociado a vasculatura estromal.
- 20 La divulgación también presenta sinergia entre componentes procedentes de calostro y anticuerpos anti-LPS por el efecto sobre la distribución de células Tregs. Se identificaron varias proteínas en la leche materna como implicadas en la defensa del hospedador (Kahn, S. E. et al., *Nature* 444:840-6 (2006)), incluidos los mediadores a altas concentraciones del sistema inmunitario innato (Poggi, M. et al., *Diabetologia* (2009)). Entre estos mediadores se encuentran múltiples proteínas defensinas, esfingolípidos, osteopontina, exosomas, TLR, catelicidina, una neurotoxina procedente de eosinófilos y proteína 1 box de grupo de alta movilidad y LL-37 (Poggi (2009) *ibid.*;
- 25 Nagatomo, T. et al., *Clin. Exp. Immunol.* 138:47-53 (2004); Admyre, C. et al., *J. Immunol.* 179:1969-78 (2007); Oppenheim, J. J. y Yang, D. *Curr. Opin. Immunol.* 17:359-65 (2005)). Estos pueden activar los sistemas inmunitarios innatos y adaptativos. Algunas de estas proteínas también se denominan "alarminas", en reconocimiento a su papel en la movilización del sistema inmunitario (Oppenheim (2005) *ibid.*). Las alarminas tienen efectos tanto quimiotácticos como activadores sobre las CPA y pueden así amplificar respuestas inmunitarias innatas y
- 30 específicas de Ag contra señales de peligro (Yang, D. et al., *J. Immunol.* 173:6134-42 (2004); Oppenheim, J. J. et al., *ADV. Exp. Med. Biol.* 601:185-94 (2007)). El BC (calostro bovino) contiene altos niveles de  $\beta$ -glicoesfingolípidos (BGS) (Martin, M.J. et al., *Lipids* 36:291-8 (2001); Sala-Vila, A. et al., *Nutrición* 21:467-73 (2005); Van, Y.H. et al., *Diabetes* 58:146-55 (2009); Nagatomo, T. et al. *Clin. Exp. Immunol.* 138:47-53 (2004)), cuya composición puede determinar el efecto de las células presentadoras de antígeno, CPA, o de otros componentes del sistema inmunitario
- 35 intestinal (Novak, J. et al. *Int. Rev. Immunol.* 26:49-72 (2007); Nowak, M. y Stein-Streilein, J. *Int. Rev. Immunol.* 26:95-119 (2007); Nikoopour, E. y Schwartz, J.A. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 7:203-10 (2008); Admyre, C. et al., *J. Immunol.* 179:1969-78 (2007); Oppenheim, J. J. y Yang, D. *Curr. Opin. Immunol.* 17:359-65 (2005); Yang, D. et al., *J. Immunol.* 173:6134-42 (2004); Oppenheim, J. J. et al. *Adv. Exp. Med. Biol.* 601:185-94 (2007)). Algunos de estos mediadores pueden servir como adyuvantes de la mucosa, potenciado de la interferencia entre subconjuntos
- 40 de CPA y Tregs en la mucosa intestinal (Vignali, D.A. et al. *Nat. Rev. Immunol.* 8:523-32 (2008); Margalit, M. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319:105-10 (2006); Godfrey, D.I. y Berzins, S.P. *Immunol.* 7:505-18 (2007); Margalit, M. y Ilan, Y. *Liver Int.* 25:501-4 (2005); Novak, J. et al. *Int. Rev. Immunol.* 26:49-72 (2007); Nowak, M. y Stein-Streilein, J. *Int. Rev. Immunol.* 26:95-119 (2007); Nikoopour, E. y Schwartz, J.A. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 7:203-10 (2008)). La inducción de células Treg puede producir una tolerancia duradera a antígenos de células  $\beta$  mediada por la
- 45 modulación inmunitaria local en los ganglios linfáticos de drenaje pancreático (PLN) (Homann, D. et al., *J. Immunol.* 163:1833-8 (1999); Homann, D. et al. *inmunidad* 11:463-72 (1999)). Esta intervención ha mostrado ser muy prometedora en modelos animales, pero ha tenido poca eficacia en ensayos clínicos en seres humanos. En el ensayo clínico de prevención de diabetes, sólo una sub-fracción de los pacientes tratados demostró un efecto beneficioso con inmunización con autoantígenos de los islotes pancreáticos (Skyler, J.S. et al., *Diabetes Care* 28:1068-76 (2005)). La prevención de la diabetes de tipo 1 se observó solo cuando los pacientes se inmunizaron durante la fase prediabética y la inmunización fue incapaz de revertir la diabetes de reciente aparición (Larche, M. y Wraith, D. C. *NAT Med* 11:S69-76 (2005)). Por lo tanto, las intervenciones específicas de antígeno pueden requerir adyuvantes adicionales para utilizar con éxito en seres humanos, especialmente en diabéticos de reciente aparición
- 50 (Harlan (2005) *ibid.*).
- 55 Los presentes inventores han demostrado efectos dependientes de la dosis en el sistema inmunitario.
- 60 En resumen, la divulgación demuestra claramente que los anticuerpos anti-LPS junto con los adyuvantes de calostro pueden promover la acumulación de células Treg y, por lo tanto, servir como un medio para aliviar la respuesta inflamatoria, mejorar el daño hepático y mejorar las complicaciones del síndrome metabólico. Además, según la divulgación, los linfocitos T reguladores en el tejido adiposo y en las células de la vasculatura estromal, VE, pueden servir como una nueva diana terapéutica en pacientes con síndrome metabólico. Además, las inmunoglobulinas en el calostro pueden promover las células T reguladoras o cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de manera específica y no específica de antígeno, dirigiéndose a antígenos espectadores, o dirigiéndose contra
- 65 antígenos no asociados.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico. La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS puede proceder de calostro o de huevos de ave.

5 En el presente documento, "tratamiento" se refiere a la reducción o eliminación de la gravedad de un síntoma de la enfermedad, la frecuencia con la que se presenta este síntoma o ambas cosas.

10 En el presente documento, "profilaxis" se refiere a prevenir o inhibir total o parcialmente un síntoma de la enfermedad o la frecuencia con la cual se presenta dicho síntoma.

15 En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición para el tratamiento y la profilaxis de un trastorno patológico como se describe en este documento. La composición de la divulgación comprende como principio activo una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con antilipopolisacárido (anti-LPS) o una preparación de inmunoglobulina anti-LPS y, opcionalmente, uno o más componentes adicionales de calostro, leche o producto lácteo y cualquier adyuvante/s. La preparación de inmunoglobulina o de cualquiera de sus fracciones reconoce y se une a LPS y cualquiera de sus fragmentos. Opcionalmente, la composición de la divulgación puede comprender una combinación de preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con LPS con al menos una preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas que reconocen al menos un antígeno específico para dicho trastorno, activando o inhibiendo de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente a dicho trastorno. Debe señalarse además que las preparaciones de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS de la invención pueden combinarse con cualquier otro fármaco inmunomodulador, incluyendo, pero no de forma limitativa, otros anticuerpos procedentes de calostro, otro antígeno, otros adyuvantes, otras citocinas o cualquier tipo de molécula que pueda modificar cualquier componente del sistema inmunitario. La combinación puede administrarse como un solo producto o en dos o más productos distintos. La combinación puede administrarse de forma conjunta o de forma separada entre sí.

20 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para seleccionar un tratamiento para un sujeto. Los métodos incluyen la detección de la presencia en una muestra del sujeto de uno o más de: un nivel de ALT por encima de 50 UI/dl (p. ej., por encima de 55, 60, 65 o 70, o como alternativa por encima de 40 o 45 UI/dl), un nivel de AST por encima de 50 UI/dl (p. ej., por encima de 55, 60, 65 o 70, o como alternativa por encima de 40 o 45 UI/dl), una AP de más de 70 U/l (p. ej., por encima de 75, 80, 85 o 90, o como alternativa por encima de 60 o 65 UI/dl), una GGT de más de 60 U/l (p. ej., por encima de 65, 70, 75 u 80, o como alternativa por encima de 50 o 55 UI/dl); un nivel de HbA1c por encima del 7 % (por ejemplo, por encima de 8, 9, 10, 11, 12 o 13 %, o como alternativa por encima del 6,5 %), un nivel secreción de insulina en ayunas por encima de 300 pg/ml (es decir, un nivel en ayunas por encima de aproximadamente 40 uUI/ml, por ejemplo, por encima de 45, 50, 55, 60, 65 o 70 uUI/ml, o como alternativa por encima de 10, 20, 25, 30 o 35 uUI/ml); un nivel de colesterol total en suero por encima de 6 uM/dl (230 mg/dl), (por ejemplo, por encima de 250, 300, 350 o 400); un nivel de LDL en suero por encima de 4 uM/dl (aprox. 150 mg/dl), (p. ej., por encima de 100, 125, 175, 200, mg/dl); y/o un nivel de triglicéridos en suero por encima de 2 o 2,5 uM/dl (aproximadamente 175 o 200 mg/dl), (p. ej., por encima de aproximadamente 225, 250, 275 y 300 uM/dl); seleccionar opcionalmente al sujeto en función de la presencia de dichos niveles y seleccionar un tratamiento que comprenda la administración de una composición que comprenda una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS para el sujeto. En algunas realizaciones, los métodos incluyen adicionalmente administrar el tratamiento al sujeto. En algunas realizaciones, los métodos incluyen la obtención de una muestra del sujeto y detectar un nivel de un analito mencionado anteriormente en la muestra utilizando métodos conocidos.

45 En algunas realizaciones, el sujeto tiene el síndrome metabólico o la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); síndrome metabólico o diabetes; o niveles de colesterol elevados. En algunas realizaciones, la composición reduce los niveles de AST o ALT; reduce los niveles de insulina en suero; aumenta los niveles de insulina en suero, mejora los niveles de glucosa en ayunas; y/o reduce los niveles de HbA1c; reduce los niveles de colesterol en suero, reduce los niveles de LDL en suero y/o reduce los niveles de triglicéridos en suero.

50 Según una realización específica, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS procedente de calostro o la preparación de inmunoglobulina anti-LPS pueden comprender inmunoglobulina monomérica, dimérica o multimérica seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA e IgM y cualquiera de sus fragmentos. Como se indicó anteriormente, la principal diferencia de composición entre el calostro y la leche madura es el muy alto contenido de inmunoglobulina de calostro, cuya clase IgG constituye del 80 al 90 %.

60 Por tanto, según una realización específica, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS enriquecida con calostro o la preparación de inmunoglobulina anti-LPS de la divulgación comprende principalmente IgG, específicamente, IgG1 e IgG2.

65 La inmunoglobulina G (IgG) como se usa en este documento, es una inmunoglobulina multimérica, construida con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada complejo tiene dos sitios de unión a antígeno. Esta es la

inmunoglobulina más abundante y se distribuye aproximadamente por igual en la sangre y en los líquidos tisulares, constituyendo el 75 % de las inmunoglobulinas de suero en los seres humanos. En general, el número de subclases de IgG varió ampliamente entre diferentes especies, que van desde una subclase en conejos hasta siete subclases en caballos, haciendo que sea difícil encontrar ortólogos. En los seres humanos, por ejemplo, la IgG1 y la IgG3 son las subclases de IgG más proinflamatorias. Sin embargo, en ratones, la IgG2a y la IgG2b son las moléculas de IgG más proinflamatorias que muestran una mayor actividad que la IgG1 y la IgG3 de ratón en muchos sistemas de modelos *in vivo*.

De manera opcional o adicional, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o la preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede comprender un anticuerpo secretor, en concreto, IgAs.

La IgA e IgM dimérica y multimérica se secretan en diversos tejidos exocrinos. La IgA es la inmunoglobulina secretora predominante presente en el calostro, la saliva, las lágrimas, las secreciones bronquiales, la mucosa nasal, el líquido prostático, las secreciones vaginales y las secreciones mucosas del intestino delgado. La producción de IgA supera a la de las otras inmunoglobulinas, lo que hace que sea el anticuerpo más importante producido diariamente por el organismo y que sea la principal inmunoglobulina encontrada en el ser humano, en la leche, el suero y el calostro. La secreción de IgM es menos abundante, pero puede aumentar para compensar las deficiencias en la secreción de IgA. La cadena J que contiene la IgA es producida y secretada por inmunocitos B en plasma localizados en la lámina propia localizada debajo de la membrana basal de las células exocrinas. La IgA tiene una estructura típica de cuatro cadenas de inmunoglobulina ( $M_r$  160.000) formada por dos cadenas pesadas ( $M_r$  55.000) y dos cadenas ligeras ( $M_r$  23.000). En los seres humanos, hay dos subclases de IgA. Estas son IgA1 e IgA2, que tienen una y dos cadenas pesadas, respectivamente. La IgA puede aparecer como monómeros, dímeros, trímeros o multímeros. En plasma, el 10 % de la IgA total es polimérico, mientras que el 90 % restante es monomérico. La IgA secretada se une a un receptor de poli-Ig  $M_r$  100.000 ubicado en la superficie basolateral de la mayoría de las células de la mucosa. El complejo receptor-IgA se desplaza después a la superficie apical donde se secreta la IgA. La unión de la IgA dimérica al receptor de poli-Ig es totalmente dependiente de la presencia de una cadena J. La IgA monomérica no se unirá al receptor.

La diferencia en cuanto a la función de la IgG e IgA obedece a la posición en la que operan las moléculas. La IgA se encuentra principalmente en superficies de la mucosa donde es escasa en cuanto a fluido tisular para transportar células inmunitarias y productos químicos. Por lo tanto, la IgA (a menudo como un dímero) se utilizará preferentemente para la neutralización física de patógenos y puede ser también eficaz en otras funciones inmunitarias. Las IgG que están presentes en la sangre y en el líquido tisular donde se encuentra la colección completa de leucocitos, sistema del complemento, macrófagos etc. pueden neutralizar físicamente un patógeno de manera eficaz y son también más eficaces en un papel de comunicación/presentación que la IgA, es decir, tienden a inducir mejor la opsonización por fagocitos (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos y macrófagos) y a activar mejor el sistema del complemento.

Más específicamente, las preparaciones de inmunoglobulina enriquecidas con anti-LPS o las preparaciones de inmunoglobulina anti-LPS de la divulgación pueden obtenerse de cualquiera del calostro, suero de calostro, la leche o el calostro hiperinmunizada(o), el suero de calostro (queso o caseína), el suero de queso o caseína, directamente de leche desnatada, leche entera, o una forma reconstituida de dichas tendencias.

Debe apreciarse que la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o la preparación de inmunoglobulina anti-LPS incluida en la composición de la invención puede ser cualquier fracción de calostro. Por lo tanto, cuando en el presente documento se usa el término calostro, este incluye la leche de calostro, la leche de calostro procesada, como la leche de calostro procesada para retirar parcial o totalmente uno o más de grasas, restos celulares, lactosa y caseína.

El calostro, o la leche, que contiene los anticuerpos anti-LPS y, opcionalmente, los anticuerpos específicos de antígeno, se pueden recoger preferentemente ordeñando el calostro o la leche de animales, por tanto, los anticuerpos específicos de antígeno recogidos pueden utilizarse directamente o pueden procesarse adicionalmente, por ejemplo, para purificar los anti-LPS. En la técnica existen métodos para la purificación (parcial) de anticuerpos (LPS y, opcionalmente, específicos de antígeno) del calostro o de la leche.

Debe apreciarse también que a las composiciones de la invención puede añadirse cualquier adyuvante. Por lo tanto, adyuvantes apropiados pueden ser cualquier antígeno, anticuerpo, glicoesfingolípidos, proteínas, citocinas, moléculas de adhesión y componentes que puedan activar o alterar la función de las células presentadoras de antígeno o de cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de una manera directa e indirecta.

Como alternativa, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o la preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede ser un anticuerpo purificado por afinidad o cualquier fragmento del mismo.

El término "anticuerpo" pretende incluir moléculas intactas, así como fragmentos, tales como, por ejemplo, Fab y  $F(ab')_2$ , que son capaces de unirse a un antígeno. Los fragmentos Fab y  $F(ab')_2$  carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener una unión tisular menos

inespecífica que un anticuerpo intacto. Se apreciará que los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden utilizarse para la inmunomodulación, según los métodos divulgados en el presente documento para moléculas de anticuerpo intactas. Dichos fragmentos se producen típicamente por escisión proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) y pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>)

Se dice que un anticuerpo es "capaz de reconocer específicamente" a un determinado antígeno si es capaz de reaccionar específicamente con un antígeno que, en este ejemplo en particular, es un antígeno o una mezcla de antígenos específicos para un determinado trastorno relacionado con el sistema inmunológico, para unir así la molécula al anticuerpo.

Un "antígeno" es una molécula o una parte de una molécula que puede unirse mediante un anticuerpo, que además puede inducir a un animal para producir anticuerpos que puedan unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. El término "epítipo" se refiere a aquella parte de cualquier molécula que puede unirse mediante un anticuerpo que también puede ser reconocido por ese anticuerpo. Los epítopos o "determinantes antigénicos" consisten normalmente en grupos de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga.

En otra realización más, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o preparación de inmunoglobulina anti-LPS, utilizada como principio activo para la composición de la invención, puede obtenerse de un mamífero inmunizado con LPS o con cualquiera de sus fragmentos. Opcionalmente, además de LPS, dicho mamífero, según determinadas realizaciones, puede inmunizarse adicionalmente con al menos un antígeno o una mezcla de al menos dos antígenos específicos para dicho trastorno, así como con una mezcla de al menos dos anticuerpos diferentes dirigidos contra al menos dos antígenos diferentes asociados a la enfermedad.

Según una realización, el LPS o cualquier antígeno utilizado para inmunizar a dicho mamífero, preferentemente, un animal bovino o a un ave, puede proporcionarse como cualquiera de un péptido aislado y purificado, una proteína recombinante purificada, una proteína de fusión, un lisado celular, una preparación de membrana, una preparación nuclear o una preparación citosólica de cualquiera de células de cultivo tisular, células primarias o muestras de tejido obtenidas de un sujeto que padece dicho trastorno.

Según otra realización, la composición de la invención puede comprender opcionalmente componente/s de calostro, tal como, por ejemplo, alarminas, defenensinas, colostrina, y cualquier otro componente de hidrato de carbono, glicolípido o cualquier otra molécula o componentes procedentes de calostro o leche, que puedan potenciar o inhibir adicionalmente la modulación de una respuesta inmunitaria, o cualquiera de sus preparaciones, mezclas o combinaciones. Por otra parte, la composición de la invención puede comprender cualquier adyuvante adicional. Por lo tanto, pueden ser adyuvantes apropiados cualquier antígeno, anticuerpo, glicoesfingolípidos, proteínas, citocinas, moléculas de adhesión y componentes que puedan activar o alterar la función de las células presentadoras de antígeno o de cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de manera directa e indirecta.

En algunas realizaciones de la composición, esta comprende un constituyente de huevo de ave, en el que el huevo de ave comprende IgY específica de LPS o un fragmento de la misma. La yema de huevo cruda puede utilizarse como fuente de anticuerpos, sin embargo, los anticuerpos de ave normalmente se purifican o concentran de la yema antes de su uso. El constituyente del huevo de ave puede concentrarse o purificarse según sea necesario, como entienden los expertos en la materia. En algunas realizaciones de la composición, dicha composición comprende la yema de huevo o cualquier fracción que contenga anticuerpos IgY. La yema de huevo es preferible a la clara de huevo, ya que la yema contiene típicamente concentraciones mucho más altas de IgY que la clara. Sin embargo, la clara puede contener concentraciones de IgY suficientes para algunas aplicaciones.

En algunas realizaciones de la composición de anticuerpo, la IgY se concentra, se aísla o se purifica del constituyente del huevo de ave. Esto puede realizarse mediante diversos métodos. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden purificarse por el método de dilución en agua. El precipitado puede después eliminarse por cualquier método convencional, incluida la centrifugación. Después, el sobrenadante puede conservarse congelado, por ejemplo, a -20 °C. La IgY puede aislarse después por precipitación con sulfato de amonio y diálisis posterior. Si se desea, el título de los anticuerpos IgY puede determinarse por inmunoensayo, por ejemplo, ELISA. El método de dilución en agua se describe más completamente en la bibliografía bien conocida, por ejemplo, por Akita y Nakai (1993), que enseñan este método. Se describen otros métodos útiles, por ejemplo, en las patentes US 4.550.019, US 4.748.018 y en la publicación US 2004/0161427, que proporcionan dichas enseñanzas. Se dispone de kits comerciales, por ejemplo, en Promega Corporation (Madison, Wisconsin).

Algunas realizaciones de la composición de anticuerpo están sustancialmente aisladas. En dichas realizaciones se ha retirado una fracción significativa de un componente de la yema que no es un anticuerpo.

El componente de la yema que no es un anticuerpo puede ser, por ejemplo, el componente lipídico de la yema, el componente de hidrato de carbono de la yema, los gránulos de la yema, el componente hidrófobo de la yema, el

componente esteroide de la yema y el componente de proteína no inmunoglobulina de la yema. La fracción retirada del componente representa al menos el 50 %. En algunas realizaciones, la fracción retirada representa al menos el 60 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 99,9 %. Las fracciones más grandes retiradas tienen la ventaja de producir una composición de anticuerpo más pura. Las fracciones más pequeñas retiradas tienen la ventaja de que se requiere menos procesamiento.

Algunas realizaciones de la composición de anticuerpo están substancialmente concentradas. En dichas realizaciones, la concentración de IgY será mayor en la composición que en la yema de huevo. Las composiciones de anticuerpo substancialmente concentradas comprenden IgY que está al menos dos veces tan concentrada como en la yema de huevo. Algunas realizaciones de la composición de anticuerpo substancialmente concentrada se concentran por al menos un factor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 1000, o 10.000. Las composiciones de anticuerpo más concentradas tienen la ventaja de proporcionar la misma masa de anticuerpos en menor volumen. Las composiciones de anticuerpo menos concentradas tienen la ventaja de que requieren menos procesamiento.

Las composiciones de anticuerpo de la presente divulgación pueden procesarse para retirar en gran medida todos los isotipos salvo el de IgG e IgY. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina puede proceder de numerosos donantes. Puede utilizarse cualquier número de donantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos proceden de un donante. En otras realizaciones, los anticuerpos proceden de 1 a 10 donantes. En otras realizaciones, los anticuerpos proceden de 10 a 100 donantes. En otras realizaciones, los anticuerpos proceden de 100 a 1000 donantes. En otras realizaciones adicionales, los anticuerpos proceden de más de 1000 donantes.

En algunas realizaciones de la composición de anticuerpo, la composición se prepara mediante el método que comprende obtener un huevo de una puesta de ave, previamente inmunizada contra la gripe, y separar la fracción de anticuerpo de la yema de huevo. En algunas realizaciones de la composición, el ave ha sido activamente inmunizada, por ejemplo, mediante vacunación. El ave es preferentemente un ave domesticada. El ave domesticada puede ser un pollo, pato, cisne, ganso, pavo, pavo real, gallina de guinea, avestruz, paloma, codorniz, faisán, tórtola y otra ave domesticada. El ave domesticada es preferentemente un pollo domesticado criado principalmente para la producción de huevos o de carne. El ave puede vacunarse contra cualquier cepa de gripe, cualquier subtipo de gripe, cualquier tipo de gripe o combinaciones de los mismos.

El uso de huevos de pollos criados para la producción de huevos o de carne, y que se vacunaron en virtud de ello, tiene la gran ventaja de utilizar como materia prima para el proceso huevos que están ampliamente disponibles en el comercio en grandes volúmenes y a precios muy asequibles. Previamente, los animales utilizados para la producción de anticuerpos se han criado exclusiva o principalmente para ese propósito y mantenido en una pequeña cantidad a un coste muy alto.

En algunas realizaciones de la composición de anticuerpo, dicha composición se prepara mediante un método que comprende inmunizar activamente a una gallina con el antígeno, recoger los huevos de la gallina después de un periodo de inmunización y separar la fracción de anticuerpo de la yema de huevo. Opcionalmente, la recogida de los huevos de la gallina puede realizarse ininterrumpidamente después del periodo de vacunación. La inmunización del ave puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, puede administrarse una vacuna a un ave que se sabe que provoca de un modo eficaz una respuesta inmunitaria en aves, o que se sabe que provoca de un modo eficaz una respuesta inmunitaria en mamíferos. Muchas de dichas vacunas contra la gripe están disponibles en el comercio y, habitualmente, pueden desarrollarlas los expertos en la técnica sin excesiva experimentación. Los expertos en la técnica conocen a otros métodos para producir IgY con un objetivo específico.

Dichos métodos pueden encontrarse, por ejemplo, en la patente US 4.550.019, en la patente US 4.748.018, en la publicación US 2004/0161427 y en la patente US 6.537.500.

En una realización, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para uso en tratamiento y/o profilaxis de un trastorno patológico en el que la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS se procede de huevos de ave y adicionalmente comprende calostro no hiperinmunitario.

En una realización, el trastorno patológico es una enfermedad hepática aguda o crónica, cirrosis o cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas. En otra realización, la enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas se selecciona del grupo que consiste en encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado. En otra realización, el trastorno patológico es un daño hepático.

En otra realización, el trastorno patológico es un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, enfermedades infecciosas y el trastorno proliferativo.

5 Como alternativa, el trastorno patológico puede seleccionarse del grupo que consiste en una peritonitis secundaria e infección después de cirugía, la cardiomiopatía hepática e hipotensión, el síndrome hepatoadrenal, el carcinoma hepatocelular, la enfermedad de Alzheimer, cualquier tipo de pérdida de memoria, cualquier tipo de demencia, trastornos de déficit de atención (ADHA), cualquier tipo de discapacidad del aprendizaje, el efecto del alcohol o de las drogas en el cerebro, cualquier tipo de enfermedad mediada por el sistema inmunitario, incluido el asma, y la peritonitis.

10 En una realización, la composición inmunomoduladora de la divulgación puede reducir, eliminar o inhibir la translocación microbiana a través de la mucosa, modulando de esta manera la activación inmunitaria. Cabe señalar que la activación crónica del sistema inmunitario es una característica de la infección vírica progresiva y predice el resultado de la enfermedad. Se ha demostrado previamente que los productos microbianos en circulación, probablemente procedentes del tracto gastrointestinal, en un proceso también conocido como "translocación microbiana a través de la mucosa" son una causa primaria de la activación inmunitaria sistémica relacionada con virus. Por tanto, según determinadas realizaciones, las composiciones de la divulgación pueden modular la función inmunitaria o, como alternativa, reducir o cambiar el número de bacterias o de productos relacionados con bacterias no relacionados con la alteración del sistema inmunitario.

20 Según una realización, la divulgación proporciona una composición que comprende como principio activo una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-lipopolisacárido (anti-LPS). En donde dicha composición es particularmente aplicable para el tratamiento, la prevención y la profilaxis de una enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas, de forma que, opcionalmente, dicha composición comprende además un agente terapéutico adicional o cualquier vehículo y adyuvante.

25 Concretamente, según la divulgación, la enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas puede ser, por ejemplo, al menos una de encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado

En una realización adicional, la composición de la divulgación puede utilizarse para el tratamiento de trastornos patológicos tales como cualquier tipo de enfermedad vírica, incluidas VHC, VHB, CMV y VEB.

35 Cabe señalar que dichas preparaciones procedentes de calostro pueden combinarse, por tanto, con cualquier fármaco utilizado para enfermedades hepáticas, como un agente terapéutico adicional.

40 El término "cirrosis", como se usa en el presente documento, se refiere al resultado histológico común final de una amplia variedad de enfermedades hepáticas crónicas, caracterizadas por el reemplazo de tejido hepático por tejido cicatricial fibroso y regeneración de nódulos, llevando a la pérdida progresiva de la función hepática. La cirrosis es causada normalmente por el virus de la Hepatitis B y C, el alcoholismo y la enfermedad del hígado graso.

45 El término "ascitis", como se usa en el presente documento, describe la afección de acumulación patológica de líquido en la cavidad abdominal, más comúnmente debido a la cirrosis y a enfermedad hepática grave.

50 Cabe señalar que dichas preparaciones procedentes de calostro pueden, por lo tanto, combinarse con cualquier agente(s) terapéutico(s) inmunomodulador(es) o con cualquier combinación o mezcla, creando una composición inmunomoduladora combinada para el tratamiento y/o la prevención de trastornos relacionados con el sistema inmunitario, una esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a estos, enfermedades infecciosas, enfermedades neoplásicas o infecciosas.

Cabe señalar que la composición procedente de calostro de la invención puede comprender adicionalmente cualquier adyuvante añadido.

55 Cabe señalar que, puesto que la translocación microbiana también se asocia a alteración de la inflamación hepática en muchos trastornos hepáticos, incluida la esteatohepatitis no alcohólica mediada por virus, por fármacos, y cualquier otro trastorno hepático, así como con la resistencia a la insulina, la diabetes de tipo 2, la obesidad y el sobrepeso, la prevención de esta translocación por la composición de la divulgación puede ser aplicable en el tratamiento de estos trastornos. Por lo tanto, la divulgación proporciona adicionalmente el uso de las composiciones anti-LPS de la divulgación, opcionalmente, combinadas con preparaciones de calostro enriquecidas para anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a una enfermedad, por ejemplo, anticuerpos anti-insulina, en el tratamiento de cualquier enfermedad hepática aguda o crónica, diabetes y cualquier complicación de la diabetes, el hígado graso, la esteatohepatitis no alcohólica y la obesidad.

65 En otra realización, la composición comprende adicionalmente una preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico para dicho trastorno patológico. La

preparación de inmunoglobulina adicional puede proceder de calostro o de huevos de ave.

Según una realización opcional, la divulgación proporciona composiciones combinadas que comprenden una combinación de preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS con al menos una preparación de  
 5 inmunoglobulina procedente de calostro que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico para dicho trastorno patológico y, por tanto, modulan las células inmunorreguladoras, específicamente, las células T reguladoras. Cabe señalar que dicha modulación puede dar como resultado, por ejemplo, la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria, inhibiendo por tanto una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

10 Las inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico para dicho trastorno patológico y, por lo tanto, modulan las células inmunoreguladoras, específicamente, las células T reguladoras son las siguientes:

15 anticuerpos contra la gripe para el tratamiento y/o la profilaxis de la gripe; anticuerpos contra el VHC para el tratamiento y/o la profilaxis de cualquier tipo de cáncer de hígado o trastornos hepáticos agudos y crónicos asociados a la infección por VHC; anticuerpos contra el VHB para el tratamiento y/o la profilaxis de cualquier tipo de cáncer de hígado o trastornos hepáticos agudos y crónicos asociados a la infección por VHB; anticuerpos contra la CMV para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos agudos y crónicos asociados a infección por CMV; anticuerpos amiloides para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Alzheimer, la encefalopatía hepática,  
 20 cualquier tipo de pérdida de memoria, trastornos de déficit de atención (ADHA), cualquier tipo de discapacidad del aprendizaje, el efecto de alcohol o las drogas en el cerebro, anticuerpos contra cualquier antígeno de virus, bacteriano, de espiroqueta, prion, parásito, espora o fúngico para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos agudos y crónicos asociados a la infección en cuestión; anticuerpos anti-insulina para el tratamiento y/o la profilaxis de cualquier trastorno asociado a la resistencia a la insulina; anticuerpos contra cualquier tipo de antígeno asociado al  
 25 cáncer para el tratamiento y/o la profilaxis de cualquier trastorno neoplásico, incluido el metastásico y el no metastásico, sólido y no sólido que esté asociado al antígeno diana; anticuerpos contra antígenos específicos de enfermedades y asociados a enfermedades para el tratamiento y/o profilaxis de cualquier tipo de enfermedad mediada por el sistema inmunitario o autoinmunitario; anti-HSV, virus JC, adenovirus, anticuerpos contra virus paragripales y contra el VRS para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades víricas; anticuerpos contra  
 30 *Mycoplasma/Legionella* para el tratamiento y/o la profilaxis de la neumonía; anticuerpos contra PTHrp, aldosterona, esteroides, GH y prolactina para el tratamiento y/o la profilaxis de tumores secretores; anticuerpos anti IL-12, omp C para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad inflamatoria intestinal, IBD; anticuerpos Anti Factor intrínseco para el tratamiento y/o la profilaxis de la anemia megaloblástica; anticuerpos contra *H. pylori* para el tratamiento y/o la profilaxis de la infección por *H. pylori*; anticuerpos contra VEB para el tratamiento y/o la profilaxis del linfoma de  
 35 Burkitt; y anticuerpos específicos para antígenos asociados a pancreatitis autoinmunitaria, enfermedades pulmonares crónicas tales como CF, asma, etc, cirrosis hepática, fibrosis hepática (CCL4) e hipercalcemia.

Según otra realización alternativa, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS de la invención puede comprender adicionalmente inmunoglobulinas dirigidas a antígenos que no son específicos del trastorno  
 40 tratado. Dichos antígenos pueden ser cualquiera de los componentes diana relacionados con el sistema inmunitario que tengan un efecto modulador sobre la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, el reconocimiento de dichos antígenos no específicos de enfermedad por la preparación de inmunoglobulina de la invención puede producir alteración de la respuesta inmunitaria. Dicha modulación puede producir, por ejemplo, la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria, inhibiendo por tanto una respuesta  
 45 inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno. Según otra realización, opcionalmente, la composición combinada de la invención puede comprender además un agente terapéutico adicional o cualquier vehículo y adyuvante.

De forma alternativa o adicional, la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de la invención, así como  
 50 la composición inmunomoduladora procedente de la misma, puede actuar de una manera indirecta por activación o promoción de subconjuntos específicos de las células reguladoras o células presentadoras de antígeno, o por cualquier tipo de contacto entre células. Dicha composición combinada enriquecida con anti-LPS puede dirigirse hacia diferentes componentes del sistema inmunitario. Por ejemplo, activación de células T reguladoras específicas, células B o células presentadora de antígeno u otras células que están asociadas a un efecto sobre el sistema  
 55 inmunitario, o que inducen la secreción de citocinas o quimiocinas o afectan al sistema inmunitario de cualquier otra manera. La alteración o la promoción de las células inmunitarias pueden implicar adicionalmente la inducción de cualquier tipo de células reguladoras, preferentemente, las células T reguladoras, por ejemplo, células Th3, Tr1, T17 o cualquier otro tipo de células reguladoras, efectoras o supresoras. Cabe señalar que las células Th17 son un subconjunto recientemente identificado de células T auxiliares CD4. Se encuentran en las interfaces entre el medio  
 60 externo y el medio interno, por ejemplo, la piel y el recubrimiento del tracto GI. Más específicamente, cabe señalar que las preparaciones de inmunoglobulina enriquecidas con anti-LPS procedentes de calostro de la invención pueden promover las células T reguladoras o cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de una manera específica y no específica de antígeno, direccionándose a antígenos espectadores o dirigiéndose a antígenos no asociados.

65 Por tanto, según otra realización, la invención proporciona una combinación de una preparación de inmunoglobulina

enriquecida con anti-LPS de la invención con al menos una preparación de inmunoglobulina adicional que comprende inmunoglobulinas dirigidas contra al menos un antígeno asociado a dicho trastorno, creando una composición combinada para el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario. Por lo tanto, dicha composición puede ser específica de antígeno o de enfermedad, o como alternativa, puede aumentar o inducir células específicas o partes del sistema inmunitario de una manera no específica de antígeno, incluyendo un efecto inmunitario espectador.

En una realización, la composición modula las células T reguladoras, lo que conduce a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 contra una respuesta inmunitaria Th2, Th1/Tr3 antiinflamatoria o una respuesta inmunitaria Th1 pro-inflamatoria, inhibiendo o activando así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

En otra realización, la composición modula el equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 contra una respuesta inmunitaria Th2, Th1/Tr3 antiinflamatoria, inhibiendo así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a estos, seleccionado de la diabetes de tipo 2, la resistencia a la insulina, la obesidad y el sobrepeso.

En otra realización, la composición es para el tratamiento y/o la profilaxis del síndrome metabólico o de la esteatohepatitis no alcohólica, o ambos. En otra realización, la composición es para el tratamiento y/o la profilaxis de la diabetes, para el tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa, tal como disminución de la tolerancia a la glucosa, la disminución de los niveles de insulina en suero, la disminución de los niveles de triglicéridos hepáticos o la disminución de los niveles de colesterol.

En una realización, la composición modula el equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 contra una respuesta inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria, potenciando así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de enfermedades infecciosas y trastornos proliferativos.

La composición puede comprender adicionalmente un agente terapéutico, un vehículo o adyuvante y/o un calostro no hiperinmunitario.

Se debe apreciar, además, que la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS de la invención puede utilizarse para un tratamiento activo o pasivo.

En una realización adicional de la composición inmunomoduladora de la divulgación, dicho trastorno relacionado con el sistema inmunitario es cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, un enfermedad infecciosa y un trastorno proliferativo.

Cabe señalar que la composición de la divulgación puede ser aplicable para el tratamiento de complicaciones agudas o la prevención del desarrollo o la recurrencia de estas complicaciones.

Según una realización, la composición combinada de la divulgación conduce a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 contra una respuesta inmunitaria Th2, Th1/Tr3 antiinflamatoria, inhibiendo así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno. Dicha regulación puede implicar células T reguladoras, células presentadoras de antígeno, cualquier tipo de célula T o célula B, la función de cualquier célula asociada directa o indirectamente al sistema inmunitario o cualquier tipo de citocina o quimiocina, o adyuvante. Según esta realización específica, dicha composición puede ser aplicable en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero de forma no limitativa, la alopecia areata, el lupus, la espondilitis anquilosante, la enfermedad de Meniere, el síndrome antifosfolípido, la enfermedad mixta del tejido conectivo, la enfermedad de Addison autoinmunitaria, la esclerosis múltiple, la anemia hemolítica autoinmunitaria, la miastenia grave, la hepatitis autoinmunitaria, el pénfigo vulgar, la enfermedad de Behcet, la anemia perniciosa, el pénfigoide ampolloso, la poliartritis nodular, la cardiomiopatía, la policondritis, la esprúe celíaco-dermatitis, los síndromes poliglandulares, el síndrome de fatiga crónica (SFC), la polimialgia reumática, la polimiositis y dermatomiositis desmielinizante inflamatoria crónica, la polineuropatía inflamatoria crónica, la agammaglobulinemia primaria, el síndrome de Churg-Strauss, la cirrosis biliar primaria, el pénfigoide cicatricial, la psoriasis, el síndrome de CREST, el fenómeno de Raynaud, la enfermedad de aglutinina fría, el síndrome de Reiter, la enfermedad de Crohn, la fiebre reumática, el lupus discoide, la artritis reumatoide, la crioglobulinemia mixta esencial, la sarcoidosis, la fibromialgia, la esclerodermia, la enfermedad de Graves, el síndrome de Sjögren, el síndrome de Guillain-Barre, el síndrome del hombre rígido, la tiroiditis de Hashimoto, la arteritis de Takayasu, la Fibrosis pulmonar idiopática, la arteritis temporal/arteritis de células gigantes, la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), la colitis ulcerosa, la nefropatía por IgA, la uveítis, la Diabetes dependiente de insulina (tipo I), la vasculitis, el liquen plano y vitíligo. Las composiciones combinadas descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto para tratar o prevenir trastornos asociados a una respuesta inmunitaria anómala o no deseada asociada a trasplante de células, tejidos u órganos, por ejemplo, trasplante renal, hepático y cardiaco, por ejemplo, enfermedad

de injerto contra huésped (EICH), o para prevenir el rechazo de aloinjerto.

En otra realización más, las composiciones combinadas de la divulgación pueden utilizarse para el tratamiento de cualquiera de una esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, por ejemplo, la diabetes de tipo 2, la resistencia a la insulina, la obesidad y el sobrepeso.

Como alternativa, la composición combinada de la divulgación puede conducir a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 hacia una respuesta inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria aumentando así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente contra dicho trastorno. Dicha regulación puede implicar células T reguladoras, células presentadoras de antígeno, cualquier tipo de células T o células B, la función de cualquier célula asociada directa o indirectamente con el sistema inmunitario o cualquier tipo de citocina o quimiocina, o adyuvante. Según esta realización específica, dicha composición puede ser aplicable en el tratamiento de enfermedades infecciosas y trastornos proliferativos.

Según una realización específica, un trastorno proliferativo neoplásico puede ser un tumor sólido o no sólido, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, melanoma, leucemia, mieloma o linfoma.

Según otra realización específica, la composición de la divulgación está diseñada para prevenir y/o tratar un carcinoma, tal como el carcinoma hepatocelular, el cáncer de próstata, el carcinoma de mama, el carcinoma de colon. En otra realización más, la composición de la divulgación puede utilizarse para prevenir y/o tratar la leucemia, más específicamente, leucemia aguda o crónica.

Como se utiliza en el presente documento para describir la presente divulgación, "cáncer", "tumor" y "neoplasia" se refieren todos equivalentemente a una hiperplasia de un tejido u órgano. Si el tejido es parte del sistema inmunitario o linfático, las células neoplásicas pueden incluir tumores no sólidos de células circulantes. Las neoplasias de otros tejidos u órganos pueden producir tumores sólidos. En general, los métodos y las composiciones de la presente divulgación pueden utilizarse en el tratamiento de tumores no sólidos y sólidos.

La neoplasia, según lo contemplado en la presente divulgación, puede seleccionarse del grupo que consiste en carcinomas, melanomas, linfomas y sarcomas. Las neoplasias que pueden encontrar utilidad en la presente divulgación pueden comprender, pero de forma no limitativa, neoplasias hematológicas (incluyendo leucemia, linfoma y trastornos mieloproliferativos), anemia hipoplásica y aplásica (inducida por virus e idiopática), síndromes mielodisplásicos, todos los tipos de síndromes paraneoplásicos (tanto mediados por el sistema inmunitario como idiopáticos) y tumores sólidos (incluyendo de pulmón, hígado, mama, colon, próstata, tracto GI, páncreas y sarcoma de Kaposi). Más concretamente, el trastorno neoplásico puede ser un carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, melanoma, mieloma y leucemia aguda o crónica.

Según otra realización, la composición inmunomoduladora de la divulgación puede ser específicamente aplicable al tratamiento de enfermedades infecciosas, por ejemplo, afecciones causadas por patógenos víricos, tales como VHC, VHB, CMV y VEB.

Según una realización particular, la composición inmunomoduladora combinada de la divulgación puede conducir a una respuesta antiinflamatoria Th2, Th1/Tr3. Más específicamente, dicha respuesta antiinflamatoria puede acompañarse de una disminución o reducción en la cantidad o la expresión de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-2, IL-17, IL-23, IFN- $\gamma$  e IL-6. Dicha disminución o reducción según la divulgación puede ser una reducción de aproximadamente 5 a 99 %, específicamente, una reducción de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con el control sin tratar. En otra realización específica más, la composición de la divulgación puede elevar y aumentar la cantidad o la expresión de citocinas antiinflamatorias tales como TGF- $\beta$ , IL-10 y IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Más específicamente, el aumento, la inducción o la elevación de las citocinas antiinflamatorias puede ser un aumento de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con el control sin tratar.

Debe apreciarse que el efecto antiinflamatorio de la composición inmunomoduladora combinada de la divulgación podrá lograrse mediante la activación o promoción de subconjuntos específicos de células reguladoras, células presentadoras de antígeno o de cualquier tipo de contacto entre células, o mediante la activación directa o indirecta de citocinas y/o quimiocinas. Cabe señalar, además, que puede estar implicada cualquier tipo de célula reguladora o efectora, específicamente, células T reguladoras, incluidas las células Th3 y Tr1. Por tanto, las preparaciones de inmunoglobulina enriquecidas con anti-LPS procedentes de calostro de la divulgación pueden promover células T reguladoras o cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de una manera específica y no específica de antígeno, direccionándose a antígenos espectadores o dirigiéndose a antígenos no asociados.

Más específicamente, una célula relacionada con el sistema inmunitario activada o promovida por la composición de la divulgación puede ser una célula CPA (tal como una CD), una célula Treg o cualquier otra célula asociada directa o indirectamente al sistema inmunitario incluyendo, pero no de forma limitativa, plaquetas, macrófagos, cualquier tipo

de célula B, célula T (incluidas las células negativas dobles) y cualquier tipo de célula presentadora de antígeno no profesional, adipocitos, células endoteliales, cualquier tipo de célula que forme parte de un órgano, en concreto, un órgano relacionado con el trastorno inmunológico a tratar y cualquier tipo de célula que tenga propiedades potenciadoras o supresoras reguladoras. Más particularmente, las composiciones de la divulgación demuestran un efecto antiinflamatorio sobre las células relacionadas con el sistema inmunitario, tales como células T reguladoras específicas, por ejemplo, adipocitos y células presentadoras de antígeno (CPA, acrónimo de *Antigen Presenting Cells*), tales como CD. Por lo tanto, según una realización, la composición de la divulgación puede utilizarse para inducir, en un sujeto que padece un trastorno hepático, al menos una de células T reguladoras (Treg) o cualquier célula que tenga propiedades reguladoras, supresoras o inductoras, adipocitos y células presentadoras de antígeno (CPA).

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones o las composiciones combinadas opcionales de la divulgación están diseñadas para prevenir y/o tratar un trastorno patológico, específicamente, trastornos hepáticos o un trastorno relacionado con el sistema inmunitario. Como se utiliza en este documento, el término "trastorno" se refiere a una afección en la que hay una alteración del funcionamiento normal. Una "enfermedad" es cualquier afección anómala del cuerpo o la mente que provoca malestar, disfunción o tensión a la persona afectada o a las personas que están en contacto con ella. A veces, el término se utiliza ampliamente para incluir lesiones, discapacidades, síndromes, síntomas, conductas desviadas y variaciones atípicas de la función y estructura, mientras que en otros contextos estas pueden considerarse categorías distinguibles. Cabe señalar que los términos "enfermedad", "trastorno", "afección" y "dolencia" se utilizan por igual en este documento. Cabe señalar además que un "trastorno o una enfermedad relacionado(a) con el sistema inmunitario" o un "trastorno hepático" puede ser cualquier trastorno asociado a, causado por, relacionado con, una respuesta inmunitaria no normal. Estos trastornos normalmente pueden suceder junto con una respuesta inmunitaria alterada o se considera que tienen un impacto sobre o por una respuesta inmunitaria no normal.

La composición puede formularse para administración por vía oral, por inhalación como un aerosol o por administración parenteral, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica o rectal, o cualquier combinación de las mismas.

En una realización, la preparación de inmunoglobulina o de alguna de sus fracciones reconoce y se une a LPS o a cualquiera de sus fragmentos.

En otra realización, la composición inhibe la translocación microbiana. En otra realización, la composición inhibe la translocación microbiana y, por tanto, modula la activación inmunitaria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS para modular la tolerancia inmunitaria en un sujeto o, en otro aspecto, para modular la tolerancia oral en un sujeto.

Según una realización preferida, cualquiera de las composiciones de la divulgación puede administrarse por vía oral o por inhalación como un aerosol, o por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, transdérmica, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica, rectal o subcutánea, o cualquier combinación de las mismas. Se espera que los anticuerpos administrados por vía oral se degraden en el tracto gastrointestinal debido al bajo pH gástrico y a la presencia de proteasas gástricas e intestinales. Sin embargo, la IgG de calostro bovino (IgCB) se ha citado como particularmente resistente a la destrucción GI en relación con otras inmunoglobulinas. Los primeros estudios de la IgCB citan una notable "resistencia a la digestión proteolítica en el intestino de un hospedador heterólogo". También hay pruebas de que la IgG1 de bovino es algo más resistente a la proteólisis por tripsina, quimotripsina y pepsina que las otras Ig. Estos resultados condujeron en gran medida al desarrollo temprano de la terapia oral de anticuerpos. Más específicamente, la composición de la divulgación puede ser adecuada para la administración mucosa, por ejemplo, administración pulmonar, bucal, nasal, intranasal, sublingual, rectal, vaginal y cualquier combinación de las mismas.

Como se ha indicado anteriormente, aunque se prefiere la administración oral y nasal, se debe apreciar que puede aplicarse cualquier otra vía de administración, por ejemplo, administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica, rectal o subcutánea, o cualquier combinación de las mismas.

Además, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS utilizada por las composiciones de la invención puede prepararse en preparaciones tales como aditivos alimentarios, soluciones acuosas, preparaciones oleaginosas, emulsiones, geles, etc., y estas preparaciones pueden administrarse por vía oral, tópica, rectal, nasal, bucal o vaginal. Las preparaciones pueden administrarse en formulaciones de dosificación que contengan vehículos aceptables no tóxicos convencionales y también pueden incluir uno o más aditivos aceptables, incluidas las sales, los polímeros, los disolventes, los tampones, los excipientes, los formadores de volumen, los diluyentes, los agentes de suspensión, los agentes lubricantes, los adyuvantes, los vehículos, los sistemas de liberación, los emulsionantes, los disgregantes, los absorbentes, los conservantes, los tensioactivos, los colorantes, los aromatizantes o edulcorantes. Una forma de dosificación opcional de la presente invención puede ser un polvo para su incorporación

en bebidas, pastillas, jarabe, cápsulas, comprimidos, gránulos, perlas, pastillas masticables o aditivos alimentarios, que utilice técnicas conocidas en la materia. Por lo tanto, la composición inmunomoduladora de la invención puede administrarse en una forma seleccionada del grupo que consiste en polvos activos por vía oral, píldoras, cápsulas, tés, extractos, extractos secos, sublinguales, aerosoles, dispersiones, soluciones, suspensiones, emulsiones, espumas, jarabes, lociones, pomadas, geles, pastas, parches cutáneos, inyectables, cremas vaginales y supositorios.

Las formulaciones terapéuticas pueden administrarse en cualquier formulación de dosificación convencional. Las formulaciones comprenden típicamente al menos un principio activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables de las mismas.

Cada vehículo debe ser farmacéutica y fisiológicamente aceptable, en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes y no perjudicial para el paciente. Las formulaciones incluyen las que son adecuadas para la administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluida la subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica o por inhalación). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. En la técnica se conoce bien la naturaleza, la disponibilidad, las fuentes y la administración de todos estos compuestos, incluidas las cantidades eficaces necesarias para producir efectos deseables en un sujeto, y no será necesario realizar una descripción adicional en el presente documento.

La preparación de las composiciones farmacéuticas es conocida en la técnica y se ha descrito en numerosos artículos y libros de texto. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R. ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 y especialmente en la págs. 1521-1712 de este documento.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse y dosificarse según la buena práctica médica.

La composición de la invención puede comprender la sustancia activa en forma libre y administrarse directamente al sujeto que tratar. Las formulaciones comprenden típicamente al menos un principio activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo. Cada vehículo debe ser farmacéutica y fisiológicamente aceptable, en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes y no perjudicial para el paciente.

Las formulaciones incluyen las que son adecuadas para la administración oral, nasal o parenteral (incluyendo subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intravenosa (i.v.) e intradérmica, o por inhalación a la mucosa del pulmón). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. En la técnica se conoce bien la naturaleza, la disponibilidad, las fuentes y la administración de todos estos compuestos, incluidas las cantidades eficaces necesarias para producir efectos deseables en un sujeto, y no será necesario realizar una descripción adicional en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente comprenden un agente tampón, un agente que regula la osmolaridad del mismo y, opcionalmente, uno o más vehículos, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables, como se conoce en la técnica. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos complementarios. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas convenientes de los mismos y aceites vegetales. Se puede conservar la fluidez adecuada, por ejemplo, utilizando un recubrimiento, tal como lecitina, conservando el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y utilizando tensioactivos.

Como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y similares. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. Salvo que algún medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, su uso se contempla en la composición terapéutica.

En casos en los que la administración oral sea en forma de un comprimido o cápsula, los componentes farmacológicos activos (preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o una combinación con otra preparación de inmunoglobulina) pueden combinarse con un vehículo inerte no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como la lactosa, el almidón, la sacarosa, la glucosa, los azúcares modificados, los almidones modificados, la metilcelulosa y sus derivados, el fosfato dicálcico, el sulfato de calcio, el manitol, el sorbitol y otros azúcares reductores y no reductores, el estearato de magnesio, el ácido esteárico, el estearil fumarato de sodio, el gliceril behenato, el estearato de calcio y similares. Para la administración oral en forma líquida, los componentes activos del fármaco pueden combinarse con vehículos inertes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, tales como el etanol, el glicerol, el agua y similares. Cuando se desee o sea necesario, en la mezcla también pueden incorporarse aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes, colorantes y aromatizantes adecuados. También pueden añadirse agentes estabilizantes, tales como antioxidantes, propil galato, ascorbato de sodio, ácido cítrico, metabisulfito de calcio, hidroquinona y 7-hidroxycoumarina para estabilizar las formas de dosificación.

Otros compuestos adecuados pueden incluir la gelatina, edulcorantes, gomas naturales y sintéticas como tales como la goma arábica, el tragacanto, o alginatos, la carboximetilcelulosa, el polietilenglicol, ceras y similares.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS y, opcionalmente, de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro que reconoce al menos un antígeno específico para un trastorno patológico en la fabricación de una composición inmunomoduladora para el tratamiento y la profilaxis de un trastorno patológico. Cabe señalar que la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o cualquiera de sus fracciones reconocen y se unen a LPS y a cualquiera de sus fragmentos. Opcionalmente, la composición preparada por el uso de la invención puede comprender una combinación de la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS de la invención y, al menos, la preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas que reconocen al menos un antígeno específico para dicho trastorno. Dicho reconocimiento conduce a la alteración de células T reguladoras y, como resultado, causa la modulación del equilibrio de células Th1/Th2, Th1/Tr3, bien hacia una respuesta inmunitaria Th2, Th1/Tr3 antiinflamatoria, o bien hacia una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria. Creando así una composición inmunomoduladora combinada que inhibe o activa una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

20 Debe señalarse que pueden estar implicado cualquier tipo de células efectoras o reguladoras, específicamente células T reguladoras, incluidas Th3 y Tr1 (T<sub>H</sub>3, las células T están preferentemente inducidas en las superficies mucosas y secretan factor de crecimiento transformante (TGF-β). Por otra parte, debe señalarse que las preparaciones de inmunoglobulina procedentes de calostro enriquecidas con anti-LPS de la invención pueden promover a células T reguladoras o a cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de una manera específica y no específica de antígeno, por direccionamiento a antígenos espectadores, o dirigiéndose contra antígenos no asociados.

30 Según una realización, la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS utilizada para la invención comprende inmunoglobulina monomérica, dimérica o multimérica, seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA e IgM y en fragmentos, mezclas o combinaciones de las mismas.

35 En otra realización más, el uso según la invención de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro, leche o productos lácteos enriquecida con anti-LPS es para la fabricación de una composición o composición combinada que, opcionalmente, puede comprender además uno o más componentes de calostro, leche o productos lácteos y cualquier adyuvante(s), preferentemente, alarminas, defensinas, colostrina y cualquier preparación, mezcla o combinación de los mismos. Se debe apreciar, además, que la composición de la invención puede comprender cualquier adyuvante adicional. Por lo tanto adyuvantes apropiados pueden ser cualquier antígeno, anticuerpo, glicoesfingolípidos, proteínas, citocinas, moléculas de adhesión y componentes que puedan activar o alterar la función de la célula presentadora de antígeno o de cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de una manera directa e indirecta. Cabe señalar que, según ciertas realizaciones, la presente invención proporciona además el uso del calostro o de cualquiera de las preparaciones procedentes de calostro en las composiciones combinadas de la invención para potenciar un efecto inmunomodulador de un agente terapéutico inmunomodulador.

45 El término alarmina significa una matriz de proteínas hospedadoras multifuncionales estructuralmente diversas que se liberan rápidamente durante la infección o el daño tisular y que tienen efectos movilizadores y activadores sobre las células que expresan receptores dedicados a la reparación tisular y a la defensa del hospedador. Los mediadores inmunitarios innatos que tienen función alarmina incluyen defensinas, neurotoxina procedente de eosinófilos, catelicidinas y HMGB1.

50 Las defensinas son proteínas catiónicas pequeñas (de 15 a 20 restos) ricas en cisteína que se encuentran tanto en vertebrados como en invertebrados. Son activas contra bacterias, hongos y virus con envoltura. Consisten en 15 a 20 aminoácidos, incluidos de seis a ocho restos de cisteína conservados. Las células del sistema inmunitario contienen estos péptidos para ayudar a destruir bacterias fagocitadas, por ejemplo, en granulocitos de neutrófilos y casi en todas las células epiteliales. La mayoría de las defensinas actúan atravesando la membrana celular microbiana mediante atracción eléctrica, y una vez embebidas, formando un poro en la membrana que permite la salida.

60 El término "Colostrina", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que, en su forma natural, se obtiene del calostro de mamífero. El Colostrina se conoce a veces como "colostrina" y tiene un peso molecular en el intervalo de 16.000 a 26.000 Daltons. El Colostrina puede formar un dímero o trímero de subunidades (cada uno con un peso molecular en el intervalo de 5.000 a 10.000 Daltons, preferentemente 6.000 Daltons) y contiene sobre todo prolina (la cantidad de prolina es mayor que la cantidad de cualquier otro aminoácido sencillo).

65 El Colostrina se caracteriza por que estimula la producción de citocinas, especialmente el interferón gamma (IFN-γ), el factor de necrosis tumoral (TNF-α), las interleucinas (IL-6 e IL-10) y varios factores de crecimiento.

5 Como se ha indicado anteriormente, debe señalarse que la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS y otras preparaciones de inmunoglobulina opcionales utilizadas por la invención pueden obtenerse de un mamífero, inmunizado con LPS o con cualquiera de sus fragmentos, y de forma opcional, además, con al menos un antígeno o una mezcla de al menos dos antígenos específicos para el trastorno que tratar. Los medios y métodos de la invención se adaptan para obtener una producción alta y prolongada de un anticuerpo específico de antígeno en el calostro, la leche o los productos lácteos de cualquier mamífero lactante. Preferentemente, dicho animal es un animal de granja. Los animales de granja son animales que el hombre utiliza con fines comerciales, ya sea para la producción de leche, carne o incluso anticuerpos. Para la presente invención, se prefieren animales de granja ya utilizados para la producción de leche a escala comercial, ya que para estos animales existen líneas y/o razas especiales optimizadas para la producción de leche. Preferentemente, dicho animal de granja es una vaca o una cabra. Más preferentemente, dicho animal de granja es una vaca.

15 En una realización de dicho uso de la invención, la composición reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa. En una realización de dicho uso de la invención, la composición reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa y, por tanto, modula la activación inmunitaria.

20 Según una realización, la divulgación se relaciona con el uso de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamíferos enriquecida con anti-LPS para la fabricación de una composición para el tratamiento, la prevención y la profilaxis de una enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas, de forma que, opcionalmente, dicha composición comprende además un agente terapéutico adicional o cualquier vehículo y adyuvante.

25 Según una realización de la utilización de la divulgación, esta composición particular reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa y, por tanto, altera el efecto directo de bacterias o de cualquier otro agente infeccioso en la patogénesis de complicaciones asociada a enfermedades hepáticas agudas o crónicas, ya sea por hipertensión portal o por cualquier otra causa.

30 Más específicamente, como se utiliza en el presente documento, una enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas, es al menos una de una encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, un síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado.

35 Cabe señalar que estas complicaciones pueden ser a consecuencia de una infección crónica por el VHC, la hepatitis alcohólica, el VHB crónico, la esteatohepatitis no alcohólica, la lesión hepática inducida por fármacos o por cualquier otra causa de enfermedad hepática aguda o crónica.

40 Según una realización opcional, la divulgación proporciona el uso de una combinación de una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS con al menos una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico para dicho trastorno patológico. Según esta realización particular, el uso de dicha combinación es para preparar una composición inmunomoduladora que modula células T reguladoras que conduce a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Th1/Tr3 antiinflamatoria o a una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria, inhibiendo o activando por lo tanto una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno. Opcionalmente, dicha composición combinada comprende adicionalmente un agente terapéutico adicional o cualquier vehículo y adyuvante. Dicha composición modula las células T reguladoras, lo que conduce a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Th1/Tr3 antiinflamatoria o a una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria, inhibiendo o activando de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

55 En una realización adicional, el trastorno relacionado con el sistema inmunitario puede ser cualquier enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, enfermedades infecciosas y el trastorno proliferativo.

Según una realización de la utilización de la divulgación, la composición de la divulgación puede utilizarse para el tratamiento de una complicación aguda o para prevenir el desarrollo o la recurrencia de estas complicaciones.

60 Según otra realización, la composición combinada de la divulgación conduce a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Th1/Tr3 antiinflamatoria, inhibiendo por lo tanto una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno. Según esta realización específica, dicha composición puede ser aplicable en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

65 Como alternativa, la composición combinada de la divulgación puede conducir a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Th1/Tr3 hacia una respuesta inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria, inhibiendo por lo tanto una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno. Según esta realización específica, dicha

composición puede ser aplicable en el tratamiento de enfermedades infecciosas y trastornos proliferativos.

En una realización incluso adicional de dicho uso de la presente divulgación, la composición de la divulgación puede administrarse por vía oral o por inhalación como un aerosol, o por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, transdérmica, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica, rectal o subcutánea o cualquier combinación de las mismas.

La tolerancia se ha definido como una falta de respuesta a sí misma o a cualquier mecanismo mediante el cual se impide, suprime o modifica una posible respuesta inmunitaria perjudicial a una clase de respuesta inmunitaria no perjudicial. De este modo, la tolerancia se relaciona con un auto reconocimiento productivo, en lugar de con una ceguera del sistema inmunitario a sus propios componentes. Los presentes inventores han demostrado que la exposición a antígenos asociados a enfermedad, ya sean auto-antígenos o no, puede activar algunas partes del sistema inmunitario y suprimir al mismo tiempo la inmunidad no deseada de una manera específica de antígeno. Sin desear ligarse a la teoría, la administración oral de antígenos, por un lado, activa subconjuntos específicos de células, suprime células específicas y alivia la autoinmunidad no deseada y, por otro lado, promueve respuestas inmunitarias antigénicas anti-tumorales o anti-víricas asociadas. Para muchas enfermedades o trastornos mediados por el sistema inmunitario, en los que el sistema inmunitario desempeña un papel, el equilibrio entre diferentes tipos de señales/células que se promueven en el sistema inmunitario sistémico determinará el efecto inmunológico final.

La tolerancia oral es un proceso inmunológico natural activado por la presencia de un antígeno exógeno que se cree que ha evolucionado para tratar agentes externos que acceden al organismo a través de una vía natural y después forman parte del mismo. Con el entendimiento de que la exposición oral a los antígenos en el tracto gastrointestinal, tal como el intestino, produce una respuesta inmunitaria activa, la terapia específica de antígeno parece un enfoque atractivo para la inmunoterapia contra antígenos presentes en la mucosa intestinal, donde pueden abordarse en un entorno inmunológico no dañino o no inflamatorio. Por consiguiente, las células inmunitarias específicas pueden activarse y la terapia específica de antígeno puede servir como un agente inmunoterapéutico para la hepatitis crónica, los agentes infecciosos, el síndrome metabólico y otros trastornos patológicos comentados en este documento.

Los mecanismos responsables de la homeostasis gastrointestinal implican una interacción compleja entre los diferentes tipos de células T, incluidas las células T reguladoras, células dendríticas (CD), los linfocitos T citotóxicos naturales (NKT) y el microambiente intestinal.

El epitelio asociado a folículo (EAF) juega un papel clave en la absorción del antígeno y en la posterior inducción de la inmunidad mucosa. Las células M del EAF, por direccionamiento de suministro del antígeno (Ag), facilitan la tolerancia oral a través de la reducción de células T CD4+ específicas de Ag y los niveles aumentados de células T reguladoras (Tregs) CD25+CD4+ productoras de factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$  y de interleucina (IL)-10 en tejidos linfoides tanto sistémicos como mucosos.

Las CD intestinales son reguladores clave de la inmunidad patogénica, la tolerancia oral y la inflamación intestinal. Las CD relevantes pueden encontrarse en el PP, MLN o LP de las vellosidades de la mucosa. Todos estos tejidos contienen diversos subconjuntos de CD distintivos, incluidos algunos que preferentemente pueden inducir la diferenciación de células Tregs.

Las células NKT son un linaje único de células T que comparten propiedades con células NK y con células T de memoria. Este subconjunto de linfocitos puede ser CD4+ o doble negativo y es reactivo a CD1d. Estas células son únicas en su cadena  $\alpha$  TCR V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 invariante, y su cadena  $\beta$  receptora de células T (RCT) está sesgada hacia V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 2 y V $\beta$ 7. Las células NKT son únicas en su reactividad antigénica glucolípida y su producción marcada de citocinas. La capacidad de las células NKT de generar respuestas Th1 y Th2 indica su importancia como células inmunorreguladoras. El uso de ligandos de NKT induce un intenso efecto inmunomodulador alterando la plasticidad de estas células.

Los presentes inventores han demostrado un papel de las células NKT en la inducción de la tolerancia oral y pruebas recientes han proporcionado pruebas de interferencia entre células Tregs y NKT. Sin querer ligarse a la teoría, se piensa que las células NKT producen citocinas inmediatamente después de la exposición a señales de activación y pueden determinar la diferenciación de las Tregs.

Se considera que el hígado es importante para la tolerancia oral. El hígado es un lugar en el que se acumulan células T CD8+ apoptóticas durante la fase de eliminación de respuestas inmunitarias periféricas. El hígado de ratón normal contiene una mezcla inusual de linfocitos, en la que también son abundantes los linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*) y los linfocitos T citotóxicos (NKT), y también están presentes células T apoptóticas. Estas células son relevantes para atrapar y destruir células T intrahepáticas. Se piensa que la exposición continua de diversos tipos de células hepáticas a LPS procedentes de bacterias intestinales promueve la expresión de citocinas, moléculas presentadoras de antígeno, y señales coestimuladoras que imponen la inactivación de células T. Otras explicaciones posibles para el ambiente tolerogénico en el hígado implican la supresión clonal, la presentación de antígeno específico por células endoteliales o células de Kupffer y la capacidad para inducir a las células T

reguladoras.

Diferentes estímulos en el microambiente hepático están asociados a la sensibilización de células T y la generación de una respuesta inmunitaria eficaz, mientras que otros producen tolerancia. La presentación de antígeno en hígado por células dendríticas y su migración en el hígado representan parte de la interacción en el eje hígado-intestino. Las CD que proceden del hígado son intrínsecamente tolerogénicas comparadas con las CD de la piel, producen IL-10 y expresan bajos niveles de moléculas coestimuladoras. La secreción local de IL-10 y TGF- $\beta$  por las células de Kupffer y los hepatocitos puede sesgar la función de las CD hacia la generación de rutas reguladoras en lugar de rutas efectoras. Las células endoteliales sinusoidales del hígado (CESH) son capaces de transportar antígenos a un compartimento endosomal temprano comprometido con la presentación en el MHC de clase I, explicando su capacidad de presentarse en cruzado a las células T CD8+. El resultado de la presentación de antígeno por las CESH es normalmente la tolerancia, con apoptosis de células T CD8+ y secreción de IL-4 e IL-10 por células T CD8+. Las células T activadas también son atrapadas por mecanismos dependientes de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en los sinusoides como un mecanismo de regulación de rutas apoptóticas durante el control de las respuestas sistémicas de CD8. Los propios hepatocitos pueden funcionar como CPA para activar a las células T vírgenes. En la mayoría de los casos, la activación por los hepatocitos conduce a tolerancia específica de antígeno, pero este proceso puede implicar también la activación de Tregs. Las Tregs periféricas se generan por la activación de células T vírgenes por CD inmaduras o en presencia de IL-10 y TGF- $\beta$ , las cuales están presentes en el entorno hepático.

Las Tregs son importantes en el eje inmunitario hígado-intestino. Las Tregs CD4+CD25+ suprimen la activación de células T CD4+ por las CESH (células endoteliales sinusoidales del hígado), las células de Kupffer o los hepatocitos. Dado que este proceso puede ser superado por la activación de TLR4, la interacción entre Tregs, patógenos y otras células del hígado determina el resultado de la activación inmunitaria en el hígado. Las Tregs pueden refrenar respuestas inmunitarias no deseadas y regular respuestas en la microflora, y pueden desempeñar un papel en una serie de enfermedades inflamatorias crónicas del intestino. Las Tregs pueden evitar respuestas inflamatorias perjudiciales contra microorganismos comensales en el intestino inferior, protegiendo así contra enfermedades inflamatorias del intestino. Se han sugerido varios subconjuntos de linfocitos T que exhiben funciones reguladoras, incluyendo Tregs natural, Tregs inducidas y células Tr1 y Th3. Estas células pueden activarse por citocinas y su fase inductiva puede ser activada por el antígeno. Se cree que la mayoría de las células T CD4+ reguladoras (Th1, Th3 y CD4+ CD25+) interactúan con células dendríticas. Otros subconjuntos de Tregs, como las células TrE CD8+, pueden reconocer antígenos que presentan las células epiteliales intestinales.

Se considera que las Tregs CD4+CD25+ son el instrumental en la regulación de la respuesta inmunitaria en la mucosa. El TGF- $\beta$  ha emergido como una de las citocinas más importantes producidas en el intestino y su interacción con las Tregs CD4 + CD25 + es clave en el mantenimiento de un equilibrio entre la inmunidad y la tolerancia de las células T. La expresión de una forma estable de  $\beta$ -catenina en Tregs CD4+CD25+ produce una marcada mejora de la supervivencia de estas células. El número de Tregs necesario para la protección contra la enfermedad inflamatoria intestinal podría reducirse sustancialmente cuando se utilizan células Tregs CD4+CD25+ que expresan  $\beta$ -catenina. La IL-35 es una citocina inhibidora producida por las células Treg y se requiere para una máxima actividad supresora. Como se indica a continuación, los presentes inventores han demostrado la modulación de células Treg CD4+CD25+ con composiciones según la presente invención.

Las Tregs que expresan Foxp3+ (*transcription factor forkhead box P3*) son importantes para el establecimiento y el mantenimiento de la tolerancia en la mucosa. La apoptosis inducida por privación de citocinas es un mecanismo prominente mediante el cual las Tregs inhiben el TCR efector. Como tal, las Tregs CD4+CD25+Foxp3+ inducen la apoptosis en células T efectoras CD4+.

La secreción de TGF- $\beta$  por Th3 u otras células Treg se considera que es un factor clave en la tolerancia oral. Las células productoras de TGF- $\beta$  son cruciales para la tolerancia oral y pueden ser los reguladores principales de la mayoría de los mecanismos desencadenados por el suministro de antígenos. El péptido asociado a latencia (PAL, *latency-associated peptide*) es el dominio amino terminal del péptido precursor de TGF- $\beta$  y permanece asociado de manera no covalente con el péptido TGF- $\beta$  después de la escisión, y forma el complejo latente. La presencia de TGF- $\beta$  o de LAP unido a la membrana en la superficie de las células Tregs ha relacionado al TGF- $\beta$  con la función supresora de las Tregs. Las células Th3 que secretan TGF- $\beta$  y las células CD8+ reguladoras se han asociado a la tolerancia oral y dependen de TGF- $\beta$ . Como se indica a continuación, los presentes inventores han demostrado modulación de células Treg LAP+ y LAP- con composiciones según la presente invención.

Se ha descrito una forma de LAP que contiene TGF- $\beta$  unida a la membrana. Las células LAP+CD4+ median la supresión en el intestino por un mecanismo dependiente de TGF- $\beta$ . Los presentes inventores han demostrado que las Tregs dependientes de TGF- $\beta$  que expresan LAP en la superficie se inducen/promueven mediante la administración oral de anticuerpos anti-LPS. El TGF- $\beta$  puede inducir la diferenciación de células productoras de IL-10, indicando que puede existir interferencia entre las diferentes Tregs productoras de citocinas en la inducción de la tolerancia oral, induciendo, por ejemplo, Tregs CD4+CD25-LAP+, que suprimen la autoinmunidad.

Subconjuntos de linfocitos CD8+ también participan en la inducción de la tolerancia. Las células epiteliales

intestinales (CEI) pueden promover a las Tregs CD8+ para procesar y presentar antígeno a las células T. Las células T activadas por las CEI son supresoras en función, mientras que las CEI pueden inducir la proliferación de una pequeña fracción de células T CD8+ periféricas. El subconjunto CD8+CD28- de células T CD8+ activadas por CEI expresa CD101 y CD103, interacciona con las CEI a través de gp180 y posee una función reguladora. Las células T CD8+ con actividad reguladora están presentes en el LP de individuos normales sanos, pero no en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), lo que indica que estas células desempeñan un papel activo en la tolerancia en la mucosa. La "presentación cruzada de antígeno" o la posibilidad de que las moléculas presentadas por CPA profesionales puedan filtrarse en la ruta del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y se presenten a células T CD8+ es un mecanismo posible. Como alternativa, la "sensibilización cruzada" de CD8+ por las CPA asociado a la activación de células T CD4+ puede ser un mecanismo responsable de la supresión. Las células T CD8+ desempeñan un papel regulador mediante la vía de secreción de TGF- $\beta$ . Las poblaciones de células T CD8+ sensibilizadas por antígeno producen IL-4 o IL-10 y pueden estar asociadas a la inducción de la tolerancia.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina procedente calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS para la inducción de células T CD4+CD25+ en el hígado, para la inducción de células T CD4+CD25+LAP- en el hígado, para la inducción de células T CD45+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD3+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD45+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD3+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+CD25+ en el bazo, la inducción de células T CD4+CD25+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD3+LAP+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD4+CD25+ en las células vasculares estromales, la inducción de células T CD4+CD25+LAP+ en las células vasculares estromales, la disminución de células CD3+NK1.1+ en el hígado, la disminución de células T CD25+LAP- en el hígado, el aumento de células T CD25+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD4+CD25+LAP- en el bazo, la inducción de células T CD4+ CD25+ LAP- en el tejido adiposo.

Los adipocitos son las células que componen principalmente el tejido adiposo, especializados en almacenar energía como grasa. Hay dos tipos de tejido adiposo, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM), que también se conocen como grasa blanca y grasa marrón, respectivamente, y comprenden los dos tipos de células grasas. Las células grasas blancas o células monovaculares contienen una gotita de lípido grande rodeada por una capa de citoplasma. El núcleo es aplanado y se localiza en la periferia. Una célula grasa típica tiene un diámetro de 0,1 mm, teniendo algunas un tamaño doble y otras la mitad. La grasa almacenada está en un estado semilíquido y está compuesta principalmente de triglicéridos y colesterol éster. Las células grasas blancas secretan resistina, adiponectina y leptina. Las células grasas marrones o células plurivacuolares tienen forma poligonal. A diferencia de las células grasas blancas, estas células tienen un citoplasma considerable, con gotitas de lípido dispersas a lo largo. El núcleo es redondo, y, aunque se localiza excéntricamente, no está en la periferia de la célula. El color marrón se atribuye a la gran cantidad de mitocondrias.

Como se muestra con los Ejemplos, las composiciones de la invención disminuyen significativamente los niveles en suero de triglicéridos, ALT, AST y glucosa. Por lo tanto, según una realización, la composición farmacéutica de la invención conduce a al menos uno de: una disminución en los niveles en suero de colesterol, triglicéridos, ALT, AST y glucosa y a una disminución en la resistencia a la insulina en un sujeto que padece un trastorno hepático o un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, por ejemplo, síndrome metabólico. Cuando se indica disminución, reducción, inhibición, se entiende que la composición de la invención conduce a una reducción de aproximadamente 5 % a 99 % del nivel en suero de uno cualquiera de triglicéridos, ALT, AST y glucosa en un sujeto que padece un trastorno relacionado con el sistema inmunitario. Más específicamente, dicha reducción puede ser una reducción de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % y mayor de 99 % en comparación con los niveles antes del tratamiento o con los niveles de control sin tratar. Cuando se indica aumento, elevación, potenciación, inducción, significa que la composición de la invención conduce a una inducción o a un aumento de aproximadamente 5 % a 99 %. Más específicamente, dicho aumento puede ser un aumento de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % y mayor de 99 % en comparación con los niveles antes del tratamiento, o con los niveles de control sin tratar.

Según una realización específica, la composición de la divulgación puede utilizarse para prevenir y/o tratar una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, un síndrome metabólico o cualquiera de las afecciones que la comprenden, cualquier afección asociada a ella, causada por ella, vinculada a ella o que se cree que tiene un impacto sobre el síndrome metabólico, por ejemplo, al menos uno de dislipoproteinemia (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, colesterol HDL bajo), obesidad, NIDDM (diabetes mellitus no insulino dependiente), IGT (tolerancia alterada a la glucosa), coagulabilidad sanguínea, defectos de fibrinólisis en sangre e hipertensión.

El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos en una persona, que incluyen:

\* Obesidad abdominal (tejido graso excesivo en y alrededor del abdomen);

\* Dislipidemia aterogénica (trastornos de la grasa de la sangre - triglicéridos altos, colesterol HDL bajo y colesterol LDL alto - que fomenta la acumulación de placa en las paredes arteriales);

\* Hipertensión;

\* Resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa;

\* Estado protrombótico (p. ej., fibrinógeno o inhibidor de activador de plasminógeno 1 alto en sangre); y

\* Estado proinflamatorio (por ejemplo, elevada proteína reactiva con C en sangre). Las personas con síndrome metabólico están en mayor riesgo de padecer cardiopatía coronaria y otras enfermedades relacionadas con acumulaciones de placa en las paredes arteriales (p. ej., ictus y enfermedad vascular periférica) y diabetes tipo 2.

Más en particular, la composición de la divulgación está diseñada para el tratamiento de la dislipoproteinemia, que puede incluir hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y colesterol HDL bajo, obesidad, NIDDM (diabetes mellitus no insulino dependiente de tipo 2), IGT (tolerancia alterada a la glucosa), coagulabilidad sanguínea, defectos de fibrinólisis en sangre e hipertensión.

Según una realización específica, la composición inmunomoduladora de la divulgación puede utilizarse para tratar la diabetes, especialmente la diabetes de tipo 2. La diabetes mellitus, a menudo simplemente diabetes, es un síndrome caracterizado por trastornos en el metabolismo y niveles de azúcar en sangre inapropiadamente altos (hiperglucemia) como resultado de niveles bajos de la hormona insulina o de resistencia anómala a los efectos de la insulina junto con niveles inadecuados de la secreción de insulina que compensar. Los síntomas característicos son la producción excesiva de orina (poliuria), sed excesiva y mayor ingesta de líquidos (polidipsia), y visión borrosa. Estos síntomas no suelen presentarse si los niveles de azúcar en la sangre solo son ligeramente elevados.

La Organización Mundial de la Salud reconoce tres formas principales de diabetes mellitus: el tipo 1, el tipo 2 y la diabetes gestacional (que se produce durante el embarazo), que tienen diferentes causas y distribución poblacional. Aunque en última instancia, todas las formas son debidas a las células beta del páncreas que no producen suficiente insulina para prevenir la hiperglucemia, las causas son diferentes. La diabetes de tipo 1 se debe normalmente a la destrucción autoinmunitaria de las células beta pancreáticas. La diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina en tejidos diana, lo que provoca una necesidad de cantidades anómalamente altas de insulina y que la diabetes se desarrolle cuando las células beta no pueden satisfacer esta demanda. La diabetes gestacional es similar a la diabetes de tipo 2, ya que está implicada en la resistencia a la insulina, las hormonas en el embarazo pueden provocar resistencia a la insulina en mujeres genéticamente predispuestas a desarrollar esta afección.

La complicación aguda de la diabetes (hipoglucemia, cetoacidosis o coma hiperosmolar no cetónico) puede producirse si la enfermedad no se controla adecuadamente. Graves complicaciones a largo plazo incluyen enfermedad cardiovascular (doble riesgo), insuficiencia renal crónica, daño retiniano (que puede conducir a la ceguera), daño en los nervios (de varias clases) y daño microvascular, que puede causar impotencia y mala cicatrización. La mala cicatrización de las heridas, especialmente de los pies, puede conducir a gangrena, que puede requerir la amputación.

Según otra realización, la composición inmunomoduladora de la divulgación puede utilizarse para el tratamiento de la diabetes de tipo 1. La diabetes mellitus de tipo 1 se caracteriza por la pérdida de células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas, productoras de insulina, lo que conlleva a una deficiencia de insulina. La principal causa de esta pérdida de células beta es un ataque autoinmunitario mediado por células T.

En otra realización adicional, la composición farmacéutica de la divulgación puede utilizarse para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario. Como ejemplos de trastornos autoinmunitarios se incluyen, pero no de forma limitativa, alopecia areata, lupus, espondilitis anquilosante, enfermedad de Meniere, síndrome antifosfolípido, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad de Addison autoinmunitaria, esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmunitaria, miastenia grave, hepatitis autoinmunitaria, pénfigo vulgar, enfermedad de Behcet, anemia perniciosa, penfigoide ampuloso, poliartritis nodular, cardiomiopatía, policondritis, esprúe celíaco-dermatitis, síndromes poliglandulares, síndrome de fatiga crónica (SFC), polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, agammaglobulinemia primaria, síndrome de Churg-Strauss, cirrosis biliar primaria, penfigoide cicatricial, psoriasis, síndrome de CREST, fenómeno de Raynaud, enfermedad de aglutinina fría, síndrome de Reiter, enfermedad de Crohn, fiebre reumática, lupus discoide, artritis reumatoide, crioglobulinemia mixta esencial, sarcoidosis, fibromialgia, esclerodermia, enfermedad de Graves, síndrome de Sjögren, síndrome de Guillain-Barre, síndrome del hombre rígido, tiroiditis de Hashimoto, arteritis de Takayasu, Fibrosis pulmonar idiopática, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), colitis ulcerosa, nefropatía por IgA, uveítis, diabetes dependiente de insulina (tipo I), vasculitis, liquen plano y vitíligo. Las composiciones orales descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto para tratar o prevenir trastornos asociados a una respuesta inmunitaria anómala o no deseada asociada a un trasplante de células, tejidos u órganos, por ejemplo, trasplante renal, hepático y cardíaco, por ejemplo, la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), o para prevenir el rechazo del aloinjerto.

Según una realización especialmente preferida, una enfermedad autoinmunitaria tratada con la composición de la divulgación puede ser una cualquiera de artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, aterosclerosis, asma, aguda y crónica, enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, uveítis, tiroiditis y hepatitis mediada por el sistema inmunitario.

Según otra realización, la composición de la divulgación puede utilizarse para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM). La EM normalmente se caracteriza clínicamente por disfunción necrológica progresiva crónica o recurrente, causada por lesiones en el SNC. Patológicamente, las lesiones incluyen múltiples áreas de desmielinización que afectan al cerebro, a los nervios ópticos y a la médula espinal. La etiología subyacente es incierta, pero hay una creencia generalizada de que la EM es, al menos en parte, una enfermedad autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario.

Por tanto, la divulgación incluye composiciones y métodos de tratamiento, retraso o prevención de la aparición de la EM, mediante la administración por vía oral o mucosa de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de la divulgación. Se incluyen métodos en los que a un sujeto que tiene, o que está en riesgo de tener EM, se le administra por vía oral la composición de la divulgación.

Según otra realización preferida, la composición de la divulgación puede utilizarse para el tratamiento de la Artritis Reumatoide (AR). La AR es la artritis inflamatoria crónica más común y afecta aproximadamente 1 % de los adultos, es de dos a tres veces más frecuente en mujeres que en hombres. La AR puede comenzar tan pronto como en la infancia, pero su aparición se produce típicamente en la quinta o sexta década.

El diagnóstico puede hacerse según los Criterios de la Asociación Americana de Reumatismo para tal clasificación de la artritis reumatoide. Una cantidad terapéuticamente eficaz provocará una mejora en uno o más de los siguientes: el número de articulaciones inflamadas, el grado de inflamación y el intervalo de movimiento articular. También pueden hacerse mediciones de laboratorio (por ejemplo, valor de ESR y hematocrito) y evaluaciones de características subjetivas (p. ej., dolor y rigidez matinal). La divulgación también incluye métodos de tratamiento de la artritis autoinmunitaria, por ejemplo AR, en un sujeto administrándole una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la divulgación que comprende preparaciones de inmunoglobulina procedentes de calostro.

Las composiciones de la divulgación descritas en el presente documento también pueden utilizarse para tratar o prevenir el rechazo de injerto en un receptor del trasplante. Por ejemplo, las composiciones pueden utilizarse en una amplia variedad de procedimientos de trasplante de órganos y tejidos, por ejemplo, las composiciones pueden utilizarse para inducir tolerancia central en un receptor de un injerto de células, por ejemplo, células madre tales como de médula ósea y/o de un tejido u órgano tal como islotes pancreáticos, hígado, riñón, corazón, pulmón, piel, músculo, tejido neuronal, estómago e intestino. Por tanto, los nuevos métodos pueden aplicarse en tratamientos de enfermedades o afecciones que impliquen el trasplante de la célula, tejido u órgano (por ejemplo, trasplante de hígado para tratar hipercolesterolemia, trasplante de células musculares para tratar la distrofia muscular o el trasplante de tejido neuronal para tratar la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Parkinson).

Según otra realización, la composición de la divulgación puede modular el equilibrio de las células Th1/Th2, Th3 hacia una respuesta anti-Th2, Tr1/Th3 en un sujeto que padece enfermedad inflamatoria intestinal, EII. Por lo tanto, según esta realización, la composición de la divulgación está diseñada para el tratamiento de las EII. Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son trastornos gastrointestinales comunes que pueden percibirse como el resultado de un desequilibrio entre subtipos de respuestas inmunitarias de tipo Th1 proinflamatoria y Th2 antiinflamatoria.

Los pacientes con EII tienen anticuerpos contra componentes de las células del colon y varios antígenos bacterianos diferentes. Estos antígenos acceden al sistema inmunitario como consecuencia de daño epitelial. También se han descrito anomalías de la inmunidad mediada por células T, incluida la anergia cutánea y la sensibilidad disminuida frente a estímulos de células T, en estos pacientes. Además, se identificaron cambios en la inmunidad mediada por células de la mucosa, incluidos el aumento de las concentraciones de IgG en células de la mucosa y cambios en subconjuntos de células T, que sugieren una estimulación antigénica.

En otra realización preferida adicional, la composición de la divulgación puede utilizarse para el tratamiento de la aterosclerosis. La aterosclerosis es una enfermedad lentamente progresiva caracterizada por la acumulación de colesterol dentro de la pared arterial. El proceso aterosclerótico empieza cuando el C-LDL queda atrapado dentro de la pared vascular. La oxidación del C-LDL produce la adhesión de monocitos a las células endoteliales que recubren la pared del vaso. Estos monocitos se activan y migran al espacio endotelial donde se transforman en macrófagos, lo que conduce a una oxidación adicional del C-LDL. El C-LDL oxidado es captado por el receptor eliminador en los macrófagos, lo que conduce a la formación de monocitos espumosos. Una cubierta fibrosa se genera a través de la proliferación y migración de células de músculo liso arterial, creando así una placa aterosclerótica. Los lípidos que se depositan en regiones ateroscleróticas proceden principalmente de las lipoproteínas que contienen apo B plasmática. Estos incluyen quilomicrones, C-LDL, IDL VLDL. Esta acumulación forma placas voluminosas que inhiben el flujo de sangre hasta que se forma un coágulo de forma eventual, obstruyendo una arteria y causando un infarto o un ictus.

Como alternativa, la preparación de inmunoglobulina utilizada por la composición de la divulgación puede reconocer y unir al menos un antígeno específico para el trastorno tratado y puede modular a las células reguladoras inmunitarias, específicamente, a las células T reguladoras. Dicha modulación puede dar como resultado, por ejemplo, la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2 hacia una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria,

activando de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

Debe apreciarse que el efecto proinflamatorio de la composición inmunomoduladora de la divulgación podrá lograrse mediante la activación o promoción de subconjuntos específicos de células reguladoras, células presentadoras de antígeno o cualquier tipo de contacto entre células a través de la activación directa o indirecta, de citocinas y/o quimiocinas.

Según esta realización específica, la modulación del equilibrio de células Th1/Th2, Th3 contra una respuesta Th1 proinflamatoria puede ser particularmente aplicable en trastornos relacionados con el sistema inmunitario que tienen una respuesta Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria no equilibrada indeseable, por ejemplo, un trastorno proliferativo neoplásico y no neoplásico, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas y trastornos neurodegenerativos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico. La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS puede proceder de calostro o de huevos de ave.

En una realización, el trastorno patológico es enfermedad hepática aguda o crónica, cirrosis o cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas.

En otra realización, la enfermedad hepática aguda o crónica, cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas se selecciona del grupo que consiste en encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado.

En otra realización, el medicamento es para el tratamiento y/o la profilaxis del daño hepático.

En otra realización, el trastorno patológico es un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, las enfermedades infecciosas y el trastorno proliferativo. Como alternativa, el trastorno patológico se selecciona del grupo que consiste en una peritonitis secundaria e infección después de cirugía, una cardiomiopatía hepática e hipotensión, el síndrome hepatoadrenal, el carcinoma hepatocelular, la enfermedad de Alzheimer, cualquier tipo de pérdida de memoria, cualquier tipo de demencia, trastornos de déficit de atención (ADHA), cualquier tipo de discapacidad, el efecto del alcohol o drogas en el cerebro, cualquier tipo de enfermedad mediada por el sistema inmunitario, incluido el asma, y la peritonitis.

El medicamento puede comprender adicionalmente una preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico para dicho trastorno patológico. La preparación de inmunoglobulina adicional puede proceder de calostro de o de huevos de ave.

En una realización, el medicamento modula las células T reguladoras, lo que conduce a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Tr3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria o una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria, inhibiendo o activando de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

En otra realización, el medicamento modula el equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria, inhibiendo de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, la aterosclerosis, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a estos, seleccionado de la diabetes de tipo 2, la resistencia a la insulina, la obesidad y el sobrepeso.

En otra realización, el medicamento es para el tratamiento y/o la profilaxis del síndrome metabólico o la esteatohepatitis no alcohólica, o ambos, para el tratamiento y/o la profilaxis de la diabetes, para el tratamiento de tolerancia alterada a la glucosa, tal como la disminución de tolerancia a la glucosa, la disminución de niveles de insulina en suero, la disminución de niveles de triglicéridos hepáticos o la disminución de niveles de colesterol.

En una realización, el medicamento modula el equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1Th31 hacia una respuesta inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria, potenciando de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de enfermedades infecciosas y trastornos proliferativos.

El medicamento puede comprender adicionalmente un agente terapéutico, un vehículo o un adyuvante y/o calostro no hiperinmunitario.

En una realización, el medicamento está formulado para administración por vía oral, por inhalación como aerosol, o para administración parenteral, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica o rectal, o cualquier combinación de las mismas.

- 5 En otra realización, la preparación de inmunoglobulina o de alguna de sus fracciones reconoce y se une a LPS o a cualquiera de sus fragmentos.

10 En otra realización la composición reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa. En otra realización, la composición reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa y, de este modo, modula la activación inmunitaria.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamíferos enriquecida con anti-LPS en la fabricación de un medicamento para modular la tolerancia inmunitaria en un sujeto o, en otra realización, un medicamento para modular la tolerancia oral en un sujeto.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS en la fabricación de un medicamento para la inducción de células T CD4+CD25+ en el hígado, la inducción de células T CD4+CD25+LAP- en el hígado, la inducción de células T CD45+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD3+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD45+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD3+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+CD25+ en el bazo, la inducción de células T CD4+CD25+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD3+LAP+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD4+CD25+ en las células vasculares estromales, la inducción de células T CD4+CD25+LAP+ en las células vasculares estromales, la disminución de células CD3+NK1.1+ en el hígado, la disminución de células T CD25+LAP- en el hígado, el aumento de células T CD25+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD4+CD25+LAP- en el bazo o la inducción de células T CD4+CD25+LAP- en el tejido adiposo.

La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS puede proceder de calostro o de huevos de ave.

- 30 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS. La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS puede proceder de calostro o de huevos de ave.

- 35 En una realización, el trastorno patológico es enfermedad hepática aguda o crónica, cirrosis o cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas.

40 En otra realización, la enfermedad hepática aguda o crónica, cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas se selecciona del grupo que consiste en una encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado.

45 En otra realización, el trastorno patológico es un daño hepático.

50 En otra realización, el trastorno patológico es un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, esteatohepatitis no alcohólica, hígado graso, aterosclerosis, síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a estos, enfermedades infecciosas y trastorno proliferativo. Como alternativa, el trastorno patológico se selecciona del grupo que consiste en una peritonitis secundaria e infección después de cirugía, cardiomiopatía hepática e hipotensión, síndrome hepatoadrenal, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Alzheimer, cualquier tipo de pérdida de memoria, cualquier tipo de demencia, trastornos de déficit de atención (ADHA), cualquier tipo de discapacidad del aprendizaje, efecto del alcohol o drogas en el cerebro, cualquier tipo de enfermedad mediada por el sistema inmunitario, incluyendo asma y peritonitis.

55 En otra realización, la composición comprende adicionalmente una preparación de inmunoglobulina que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos a un antígeno específico de dicho trastorno patológico. La preparación de inmunoglobulina adicional puede proceder de calostro o de huevos de ave.

60 En otra realización, la composición modula las células T reguladoras, lo que conduce a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria o una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria, inhibiendo o activando de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

65 En otra realización, la composición modula el equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria, inhibiendo así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia

dicho trastorno, y en donde dicha composición es para el tratamiento de cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, esteatohepatitis no alcohólica, hígado graso, aterosclerosis, síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a estos, seleccionado de diabetes de tipo 2, resistencia a la insulina, obesidad y sobrepeso.

5 En otra realización, el trastorno patológico es un síndrome metabólico o una esteatohepatitis no alcohólica, o ambos.

En otra realización, el trastorno patológico es diabetes. En otra realización, el trastorno patológico es una tolerancia alterada a la glucosa.

10 En otra realización, el método disminuye la tolerancia a la glucosa, disminuye los niveles de insulina en suero, disminuye los niveles de triglicéridos hepáticos o disminuye los niveles de colesterol.

En otra realización, el método modula el equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria, aumentando así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno, y  
15 en donde dicha composición es para el tratamiento de las enfermedades infecciosas y los trastornos proliferativos.

En otra realización, la composición comprende adicionalmente calostro no hiperinmunitario y/o un agente, un vehículo o un adyuvante terapéutico.

20 La composición se puede administrar por vía oral, por inhalación como aerosol, o por administración parenteral, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica o rectal, o por cualquiera de estas combinaciones.

En otra realización, la preparación de inmunoglobulina o de cualquiera de sus fracciones reconoce y se une a LPS o a cualquiera de sus fragmentos.

25 En otra realización, el método reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa. En otra realización, el método reduce o inhibe la translocación microbiana a través de la mucosa y, por tanto, modula la activación inmunitaria.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para modular la tolerancia inmunitaria en un sujeto que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS. Como alternativa, el método puede ser para modular la tolerancia oral.

35 Un método para la inducción de células T CD4+CD25+ en el hígado de un sujeto comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS. En otra realización, el método puede ser para para la inducción de células T CD4+CD25+LAP- en el hígado, la inducción de células T CD45+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD3+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD45+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD3+LAP+ en el bazo, la inducción de células T CD8+CD25+ en el bazo, la inducción de células T CD4+CD25+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD3+LAP+ en el tejido adiposo, la inducción de células T CD4+CD25+ en las células vasculares estromales, la inducción de células T CD4+CD25+LAP+ en las células vasculares estromales, la disminución de células CD3+NK1.1+ en el hígado, la disminución de células T CD25+LAP- en el hígado, la  
45 disminución de células T CD25+LAP+ en el hígado, la inducción de células T CD4+CD25+LAP- en el bazo o la inducción de células T CD4+CD25+LAP- en el tejido adiposo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico. El método de la divulgación comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro de mamífero enriquecida con anti-LPS o de una composición que la comprenda. Cabe señalar que la preparación de inmunoglobulina o de cualquiera de sus fracciones reconoce y se une a LPS y a cualquiera de sus fragmentos. Según una realización opcional, el método de la divulgación comprende la etapa de administrar una composición combinada de preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS de la divulgación con al menos una preparación de  
50 inmunoglobulinas que comprende las inmunoglobulinas que reconocen al menos un antígeno específico para dicho trastorno, activando o inhibiendo de esta forma una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

Según una realización, la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro, de leche o de producto(s) lácteo(s), enriquecida con anti-LPS, o cualquier fragmento o mezcla, combinación, o cualquier composición de los mismos, utilizada por el método de la divulgación, comprende una inmunoglobulina monomérica, dimérica y multimérica seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA e IgM y en cualquiera de sus fragmentos, preparaciones, mezclas y composiciones. Más concretamente, la preparación de inmunoglobulina utilizada por el método de la divulgación puede comprender específicamente IgG, particularmente IgG1 o IgG2 y fragmentos de las mismas. De forma alternativa o adicional, la preparación de inmunoglobulina utilizada por el método de la divulgación puede comprender específicamente IgA dimérica secretora  
65

Según otra realización, el método de la divulgación puede utilizar una composición o composición combinada que comprenda la preparación de inmunoglobulina procedente calostro enriquecida con anti-LPS. Opcionalmente, dicha composición comprende adicionalmente componente/s de calostro, preferentemente, alarminas, defensinas, colostrina, o cualquiera de los glucolípidos, hidratos de carbono o cualquiera de sus preparaciones, mezclas y combinaciones o cualquier otro adyuvante/s. Cabe señalar que la presente divulgación proporciona adicionalmente el uso de calostro o de cualquiera de las preparaciones procedentes de calostro para potenciar un efecto inmunomodulador de un agente terapéutico inmunomodulador. En una realización específica, la composición o composición combinada utilizada por el método de la divulgación puede comprender cualquier adyuvante adicional. Por lo tanto, los adyuvantes apropiados pueden ser cualquier antígeno, anticuerpo, glucoesfingolípidos, proteínas, citocinas, moléculas de adhesión y componentes que puedan activar o alterar la función de la célula presentadora de antígeno o de cualquier otra célula relacionada con el sistema inmunitario de una manera directa e indirecta.

En otra realización adicional, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o cualquier otra preparación de inmunoglobulina utilizada por la divulgación puede obtenerse de un mamífero, preferentemente, de una vaca, inmunizada con LPS y, opcionalmente, además, con al menos un antígeno o una mezcla de al menos dos antígenos específicos para un trastorno que tratar.

Según una realización, el método de la divulgación comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro anti-lipopolisacárido (LPS) o de cualquier composición que la comprenda. Cabe señalar que este método puede ser particularmente aplicable para el tratamiento, la prevención y la profilaxis de una enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas.

Más específicamente, la enfermedad hepática aguda o crónica, la cirrosis y cualquier enfermedad o complicación asociada a las mismas es al menos una de una encefalopatía hepática, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis, varices hemorrágicas, circulación hiperdinámica asociada a cirrosis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensión portopulmonar, sangrado por varices, insuficiencia adrenal y nivel de conciencia alterado.

Cabe señalar que estas complicaciones pueden ser a consecuencia de una infección crónica por el VHC, hepatitis alcohólica, VHB crónico, esteatohepatitis no alcohólica, lesión hepática inducida por fármacos o por cualquier otra causa de enfermedad hepática aguda o crónica.

Según una realización opcional, la divulgación proporciona un método para tratar trastornos relacionados con el sistema inmunitario. Según esta realización específica, el método de la divulgación comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS con al menos una preparación de inmunoglobulina procedente de calostro que comprende inmunoglobulinas que reconocen y se unen a al menos un antígeno específico de dicho trastorno patológico o de una composición combinada que comprende la misma y opcionalmente un agente terapéutico adicional o cualquier vehículo y adyuvante.

Según esta realización, la combinación utilizada por la invención modula las células T reguladoras, lo que conduce a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria o una respuesta inmunitaria Th1 proinflamatoria, inhibiendo o activando de esta forma una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.

Según otra realización, el método de la divulgación puede ser particularmente aplicable para el tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, la esteatohepatitis no alcohólica, el hígado graso, el síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a los mismos, enfermedades infecciosas y el trastorno proliferativo.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar la tolerancia alterada a la glucosa.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para disminuir la tolerancia a la glucosa.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de insulina en suero.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de triglicéridos hepáticos.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de colesterol.

Cabe señalar que el método de la divulgación es para el tratamiento de complicaciones agudas, para prevenir el desarrollo y/o la recurrencia de estas complicaciones.

- Según una realización, la composición combinada utilizada por el método de la divulgación puede conducir a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th2, Tr1/Th3 antiinflamatoria, inhibiendo de este modo una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno.
- 5 Según esta realización específica, dicha composición puede ser aplicable en el tratamiento de cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, esteatohepatitis no alcohólica, hígado graso, aterosclerosis, síndrome metabólico y cualquier trastorno asociado a estos, por ejemplo, diabetes de tipo 2, resistencia a la insulina, obesidad y sobrepeso.
- Como alternativa, la composición combinada utilizada por el método de la divulgación puede conducir a la modulación del equilibrio de las células Th1/Th2, Tr1/Th3 hacia una respuesta inmunitaria Th1/Th2 proinflamatoria,
- 10 potenciando así una respuesta inmunitaria dirigida específicamente hacia dicho trastorno. Según esta realización específica, dicha composición puede ser aplicable en el tratamiento de una enfermedad infecciosa y un trastorno proliferativo.
- Según una realización, el método de la divulgación puede ser específicamente aplicable al tratamiento de las enfermedades víricas, incluidas VHC, VHB, CMV y VEB.
- 15 En una realización adicional de dicho método de la divulgación, la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS o cualquier composición que la comprenda debe administrarse por vía oral o por inhalación como aerosol, o por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, transdérmica, administración intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica, rectal o subcutánea, o cualquiera de sus combinaciones.
- 20 Según una realización específicamente preferida, el método de la invención es específicamente adecuado para el tratamiento de un sujeto mamífero. Un "mamífero" o "*Mamalia*", para fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos los seres humanos, animales de experimentación, domésticos y animales de granja y zoo, animales para el deporte o animales de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etcétera. En una realización particular, dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.
- 25 "Tratamiento" se refiere a un tratamiento terapéutico. Aquellos que necesitan tratamiento son sujetos mamíferos que padecen una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario. Por "paciente" o "sujeto que lo necesite" se entiende cualquier mamífero para el que se desea administrar la composición inmunomoduladora de la invención para prevenir, superar o retrasar dicha imposición.
- 30 Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" significan una cantidad necesaria para obtener un resultado seleccionado. La cantidad de "tratamiento eficaz" la determina la gravedad de la enfermedad junto con los objetivos preventivos o terapéuticos, la vía de administración y estado general del paciente (edad, sexo, peso y otras cuestiones conocidas por el médico tratante).
- 35 Como se ha indicado anteriormente, en general, la dosis necesaria para obtener un efecto terapéutico dependerá no solo de factores tales como la edad, peso y sexo del paciente y modo de administración, sino también del grado de progresión de la enfermedad y de la fuerza del derivado particular que se esté utilizando para el trastorno particular de la enfermedad en cuestión.
- 40 Debe apreciarse que la prevención o reducción del riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario también se incluye en el ámbito de la divulgación. Dicho método puede comprender la administración de una cantidad profilácticamente eficaz de la composición de la invención o de los principios activos incluidos en dicha composición a una persona que está en riesgo de desarrollar una enfermedad.
- 45 La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" pretende significar la cantidad de una composición farmacéutica combinada que prevendrá o reducirá el riesgo de que aparezca el suceso biológico o médico que pretende prevenir en un tejido, sistema, animal o ser humano, un investigador, un veterinario, un médico u otro especialista clínico.
- 50 Cabe señalar que, para el método de tratamiento y prevención proporcionado en la presente invención, dicha cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz depende de la gravedad y de la respuesta de la patología que tratar, con una duración de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se obtenga una curación o una
- 55 disminución de la patología. Los programas de dosificación óptima pueden calcularse de las mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos habituales en la materia pueden determinar con facilidad las dosis óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. En general, las dosis se calculan según el peso corporal y se pueden administrar una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente o incluso una vez de cada 2 a 20 años. Los expertos habituales en la materia pueden estimar fácilmente
- 60 las tasas de repetición de las dosis en función de los tiempos de residencia medidos y de las concentraciones de la composición de la invención en fluidos o tejidos corporales. Después del tratamiento satisfactorio, puede ser deseable que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para evitar la recurrencia de la patología, en cuyo caso la composición de la invención se administra en dosis de mantenimiento, una o más veces al día.
- 65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de un sujeto humano con una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertensión, aumento del índice de masa corporal (IMC), aumento

de la circunferencia de la cintura, dislipidemia, resistencia a la insulina, niveles elevados de enzimas hepáticas e hígado graso, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un sujeto humano con una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertensión, aumento del índice de masa corporal (IMC), aumento de la circunferencia de la cintura, dislipidemia, resistencia a la insulina, niveles elevados de enzimas hepáticas e hígado graso.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un sujeto humano con una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertensión, aumento de índice de masa corporal (IMC), aumento de la circunferencia de la cintura, dislipidemia, resistencia a la insulina, niveles elevados de enzimas hepáticas e hígado graso.

15 El término "hipertensión" incluye hipertensión arterial, en la que están elevados tanto los niveles de la presión sistólica como los de la diastólica (p. ej.  $\geq 140$  mmHg/ $\geq 90$  mmHg) y la hipertensión sistólica aislada, en la que solo se eleva la presión sistólica, por ejemplo, elevada a mayor que o igual a 140 mmHg, mientras que la presión diastólica es inferior a 90 mmHg y la hipertensión diastólica aislada, en la que solo se eleva la presión diastólica, por ejemplo se eleva a mayor que o igual a 90 mmHg. La presión arterial normal puede definirse como menor de 120 mmHg sistólica y menor de 80 mmHg diastólica. Un sujeto hipertenso es un sujeto con hipertensión. Un sujeto prehipertenso es un sujeto con una presión arterial que está entre 120 mmHg sobre 80 mmHg y 139 mmHg sobre 89 mmHg. Un resultado del tratamiento es disminuir la presión arterial en un sujeto con hipertensión arterial.

20 La hipertensión puede caracterizarse por una presión arterial  $> 120$  mmHg/80 mmHg, una presión arterial  $> 130$  mmHg/90 mmHg o una presión arterial  $> 140$  mmHg/90 mmHg.

25 El tratamiento de la hipertensión utilizando las composiciones de la presente divulgación puede producir una disminución en la presión arterial de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y más de 99 % en relación con un control no tratado, o con los niveles antes del tratamiento.

30 El término "obesidad", como se usa en el presente documento, es una afección en la que hay un exceso de grasa corporal. Una definición operativa de obesidad se basa en el índice de masa de corporal (IMC), que se calcula como peso corporal por altura en metros cuadrados ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). La "obesidad" se refiere a una afección por la cual un sujeto de otra manera sano tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 30  $\text{kg}/\text{m}^2$ , o una afección por la cual un sujeto con al menos una comorbilidad tiene un IMC mayor o igual a 27  $\text{kg}/\text{m}^2$ . Un "sujeto obeso" es un sujeto de otra manera sano con un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 30  $\text{kg}/\text{m}^2$  o un sujeto con al menos una comorbilidad con un IMC mayor o igual a 27  $\text{kg}/\text{m}^2$ . Un "sujeto en riesgo de obesidad", también conocido como "con sobrepeso" o "pre-obeso" es un sujeto de otra manera sano con un IMC de 25  $\text{kg}/\text{m}^2$  a menos de 30  $\text{kg}/\text{m}^2$  o un sujeto con al menos una comorbilidad con un IMC de 25  $\text{kg}/\text{m}^2$  a menos de 27  $\text{kg}/\text{m}^2$ . Un IMC "normal" varía de 18,5 a 24,9  $\text{kg}/\text{m}^2$ . En otras poblaciones, el aumento de los riesgos asociados a la obesidad se produce en un índice de masa corporal (IMC) más bajo, por ejemplo, en asiáticos. Se conocen bien límites de medidas ejemplares para diferentes poblaciones, por ejemplo, como lo comentado en la publicación WHO "*redefiniendo la obesidad y su tratamiento*", Organización Mundial de la Salud de la región del pacífico occidental, asociación internacional para el estudio de la obesidad, unidad operativa de obesidad internacional (2000).

35 Las comorbilidades inducidas por obesidad o relacionadas con obesidad incluyen, pero no de forma limitativa, diabetes, diabetes mellitus de tipo 2 no insulino dependiente, diabetes asociada a obesidad, tolerancia alterada a la glucosa, glucosa alterada en ayunas, síndrome de resistencia a insulina, dislipidemia, hipertensión, hipertensión asociada a obesidad, hiperuricemia, gota, cardiopatía coronaria, infarto de miocardio, angina de pecho, síndrome de apnea del sueño, síndrome de Pickwickian, hígado graso; infarto cerebral, trombosis cerebral, ataque isquémico transitorio, trastornos ortopédicos, artritis deformante, lumbodinia, emmeniopatía e infertilidad. En particular, las comorbilidades incluyen: hipertensión, hiperlipidemia, dislipidemia, intolerancia a la glucosa, enfermedad cardiovascular, apnea del sueño, diabetes mellitus y otras afecciones relacionadas con obesidad.

40 El tratamiento del aumento del IMC o la prevención del aumento del IMC incluye el tratamiento de los aumentos del IMC, por ejemplo, de normal a pre-obeso, de normal a obeso o de pre-obeso a obeso.

45 El IMC aumentado puede ser un IMC de al menos 25  $\text{kg}/\text{m}^2$  a menos de 30  $\text{kg}/\text{m}^2$  o un IMC de al menos 30  $\text{kg}/\text{m}^2$ . La circunferencia de la cintura aumentada puede ser una circunferencia de la cintura de al menos 102 cm en hombres o una circunferencia de la cintura de al menos 88 cm en mujeres. Una "obesidad abdominal" se define por una circunferencia de cintura mayor de 102 cm (40 pulgadas) en hombres o de 88 cm (35 pulgadas) en mujeres según el NCEP ATP III.

50 El tratamiento del IMC o de circunferencia de la cintura aumentados utilizando las composiciones de la presente

divulgación puede dar como resultado una disminución en el IMC o de la circunferencia de la cintura, respectivamente, de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y más de 99 % con respecto a un control no tratado, o a niveles antes del tratamiento.

5 En el presente documento, el "síndrome metabólico" o "síndrome X" se define basándose en los criterios del NCEP ATP III, que son la presencia de tres o más de los siguientes factores: 1) circunferencia de cintura aumentada (> 102 cm (> 40 pulgadas) en hombres, > 88 cm (> 35 pulgadas) en mujeres); 2) triglicéridos elevados (> 150 mg/dl); 3) bajo de colesterol HDL (< 40 mg/dl en hombres, < 50 mg/dl en mujeres); 4) presión arterial no óptima (> 130 mmHg sistólica o > 5 mmHg diastólica); y 5) glucosa alterada en ayunas (> 110 mg/dl).

10 Las dislipidemias o los trastornos del metabolismo de los lípidos incluyen varias afecciones caracterizadas por concentraciones anómalas de uno o más lípidos (es decir, colesterol y triglicéridos) y/o apolipoproteínas (es decir, apolipoproteínas A, B, C y E) y/o lipoproteínas (es decir, los complejos macromoleculares formados por el lípido y la apolipoproteína que permiten que los lípidos, tales como LDL, VLDL e IDL, circulen en sangre). La hiperlipidemia se asocia a niveles anómalamente altos de lípidos, colesterol LDL y VLDL, y/o triglicéridos. El tratamiento de la dislipidemia se refiere a la administración de las combinaciones de la presente divulgación a un sujeto dislipidémico. La prevención de la dislipidemia se refiere a la administración de las combinaciones de la presente divulgación a un sujeto pre-dislipidémico. Un sujeto pre-dislipidémico es un sujeto con niveles de lípidos más altos que los normales, que aún no son dislipidémicos.

20 Las directrices para la terapia hipolipemiente se establecieron en 2001 a través del Panel III de tratamiento del adulto (ATP III) del programa nacional para la educación sobre el colesterol (NCEP) y se actualizaron en 2004 (Grundy et al., *Circulation*, 2004, 110, 227-239). Las directrices incluyen la obtención de un perfil de lipoproteínas completo, normalmente después de 9 a 12 horas de ayuno, para la determinación de niveles de C-LDL, colesterol total y de C-HDL. Según las directrices más recientemente establecidas, los niveles de C-LDL de 130 a 159 mg/dl, de 160 a 189 mg/dl, y mayores que o iguales a 190 mg/dl se consideran en el límite alto, alto y muy alto, respectivamente. Los niveles de colesterol total de 200 a 239 y mayores que o iguales a 240 mg/dl se consideran en el límite alto y alto, respectivamente. Los niveles de C-HDL menores de 40 mg/dl se consideran bajos.

30 En determinadas realizaciones, el paciente se ha identificado en necesidad de una terapia hipolipemiente. En determinadas dichas realizaciones, el individuo se ha identificado en necesidad de una terapia hipolipemiente según las directrices establecidas en 2001 a través del Panel III de tratamiento del adulto (ATP III) del programa nacional para la educación sobre el colesterol (NCEP) y actualizadas en 2004 (Grundy et al., *Circulation*, 2004, 110, 227-239).

35 En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de C-LDL en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de C-VLDL en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de C-IDL en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de C-no-HDL en un individuo. En determinadas realizaciones la divulgación proporciona métodos para la reducción de Lp (a) en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de triglicéridos en suero en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de triglicéridos hepáticos en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de C-LDL-Ox en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de partículas pequeñas de LDL en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de partículas pequeñas de VLDL en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de fosfolípidos en un individuo. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para la reducción de fosfolípidos oxidados en un individuo.

50 Para determinar la cantidad y la duración de la intervención terapéutica, el médico utiliza una respuesta de un individuo a la administración de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

Un individuo que tiene niveles de C-LDL elevados también puede presentar niveles de C-HDL reducidos y/o niveles de colesterol total elevados. Los individuos que tienen niveles de C-LDL elevados también pueden presentar niveles de triglicéridos elevados.

60 En algunas realizaciones, la dislipidemia puede caracterizarse por un colesterol LDL de al menos 160 mg/dl, un colesterol LDL de al menos 190 mg/dl, un colesterol total de al menos 200 mg/dl, un colesterol total de al menos 240 mg/dl, un colesterol HDL menor de 60 mg/dl, un colesterol HDL menor de 40 mg/dl, triglicéridos en suero de entre 150 y 199 mg/dl, triglicéridos en suero de entre 200 y 499 mg/dl o triglicéridos en suero de al menos 500 mg/dl.

65 El tratamiento de la dislipidemia utilizando las composiciones de la presente divulgación puede dar como resultado una disminución del colesterol total, LDL o de triglicéridos en suero, respectivamente, de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y más de 99 % en relación con un control no tratado o con los niveles antes del tratamiento.

Las mediciones de colesterol, lipoproteínas y los triglicéridos se obtienen utilizando suero o plasma extraído de un individuo. Los métodos de obtención de muestras de suero o plasma son habituales, ya que son métodos de preparación de las muestras de suero para el análisis de colesterol, triglicéridos y otros marcadores séricos. Un médico puede determinar la necesidad de una intervención terapéutica para los individuos en casos en los que se requiere una terapia de reducción de LDL más o menos agresiva. La práctica de los métodos del presente documento puede aplicarse a cualquiera de las directrices alteradas proporcionadas por el NCEP u otras entidades que establecen directrices para los médicos que se utilizan en el tratamiento de las enfermedades o afecciones que figuran en este documento para determinar el riesgo de cardiopatía coronaria y el diagnóstico de síndrome metabólico.

La expresión "resistencia a la insulina" se refiere a un estado en el que una determinada concentración de insulina se asocia a una respuesta subnormal de la glucosa. La resistencia a la insulina es un componente de diversos estados incluidos, pero no de forma limitativa, los siguientes:

resistencia a la insulina asociada a obesidad, estrés, infección, acromegalia, síndrome o enfermedad de Cushing, síndrome del ovario poliquístico, hipertecosis ovárica; resistencia a la insulina no asociada a otros estados patológicos; síndromes de resistencia extrema a la insulina, tales como el síndrome de tipo B que tiene autoanticuerpos asociados al receptor de insulina, el leprechaunismo con mutaciones del receptor de insulina y los estados lipodistróficos;

resistencia a la insulina asociada a la ingesta de fármacos inhibidores de proteasa farmacológica, ácido valproico, olanzapina, clozapina y agentes psicoactivos;

resistencia a la insulina endógena, tal como se define por una concentración de insulina sérica alta en asociación con concentraciones de glucosa en sangre que son normales o altas;

resistencia a la insulina exógena como se manifiesta en pacientes tratados con ya sea insulina o agentes hipoglucémicos orales y/o agentes sensibilizadores de insulina descritos en el presente documento que requieren ya sea dosis anómalamente altas de insulina o del agente hipoglucémico oral y/o del agente sensibilizador de insulina especificados, para prevenir o tratar la hiperglucemia.

La resistencia a la insulina puede definirse como un valor anómalo según, por ejemplo, métodos/procedimientos generalmente conocidos y/o aceptados de determinación de resistencia y/o sensibilidad a la insulina. Los expertos en la materia conocen determinados métodos/procedimientos de determinación de dichos valores de resistencia y/o sensibilidad a la insulina, incluidos, pero no de forma limitativa, el modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA o HOMAIR), el índice de sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo (WBISI), el índice de sensibilidad a la insulina (ISI), la medición de pinzamiento euglicémico hiperinsulinémico y otros.

El modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA o HOMAIR) puede calcularse mediante la ecuación:  $(\text{HOMAIR}) = (\text{FI} \times \text{FG}) / 22,5$ , en donde FI es la concentración de insulina en ayunas (en microunidades por mililitro) y FG es la palanca de glucosa en ayunas (en milimoles por litro). En consecuencia, valores HOMA-IR relativamente más bajos corresponden a sensibilidad a la insulina relativamente alta, mientras que valores HOMA-IR relativamente más altos corresponden a sensibilidad a la insulina relativamente baja.

El índice de sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo (WBISI) puede calcularse utilizando los parámetros obtenidos de un ensayo de tolerancia a glucosa oral (OGTT) convencional (1,75 g/kg de peso corporal (hasta 75 g)) y utilizando la ecuación:  $\text{WBISI} = 10.000 / \text{raíz cuadrada de } ((\text{glucosa en ayunas} \times \text{insulina en ayunas}) \times (\text{glucosa (OGTT) promedio} \times \text{insulina (OGTT) promedio}))$ .

Como se utiliza en este documento, el término "resistencia a la insulina" incluye tolerancia alterada a la glucosa, glucosa alterada en ayunas y diabetes. La definición de los términos "tolerancia alterada a la glucosa", "glucosa alterada en ayunas" y "diabetes" puede incluir las definiciones de diagnóstico clínico de la OMS, tales como las publicadas en "definición y diagnóstico de diabetes mellitus e hiperglucemia intermedia: informe de una consulta de la OMS/FDI", (2006). La expresión "tolerancia alterada a la glucosa" (IGT) se refiere a una glucosa plasmática en ayunas menor de 7,0 mmol/l (126 mg/dl) y una glucosa plasmática de 2 horas de entre 7,8 mmol/l (140 mg/dl) a menor de 11,1 mmol/l (200 mg/dl). La expresión "una glucosa plasmática de 2 horas" se refiere a la glucosa en plasma venoso 2 horas después de la ingestión de 75 g de carga de glucosa oral (ensayo de tolerancia a glucosa oral; OGTT). La expresión "glucosa alterada en ayunas" se refiere a una glucosa plasmática en ayunas de entre 6,1 mmol/l (110 mg/dl) a 6,9 mmol/l (125 mg/dl), o a una glucosa en ayunas de entre 6,1 mmol/l (110 mg/dl) a 6,9 mmol/l (125 mg/dl) y una glucosa plasmática de 2 h menor de 7,8 mmol/l (140 mg/dl). El término "diabetes" se refiere a una glucosa plasmática en ayunas  $\geq 7,0$  mmol/l (126 mg/dl) o a una glucosa plasmática de 2 h  $\geq 11,1$  mmol/l (200 mg/dl).

El índice de sensibilidad a la insulina (ISI) se puede calcular utilizando los parámetros obtenidos de un ensayo de tolerancia a glucosa oral (OGTT) convencional (1,75 g/kg de peso corporal (hasta 75 g)) y utilizando la ecuación:  $\text{ISIOGTT} = (1,9/6 \times \text{peso corporal (kg)} \times \text{glucosa plasmática en ayunas (mmol/litro)} + 520 - 1,9/18 \times \text{peso corporal} \times \text{área bajo la curva de glucosa (mmol/h litro)} - \text{glucosa urinaria (mmol)} / 1,8) / (\text{área bajo la curva de insulina (pmol/h litro)} \times \text{peso corporal})$ .

En algunas realizaciones, la resistencia a la insulina puede caracterizarse por una glucosa plasmática en ayunas

menor de 7,0 mmol/l (126 mg/dl) y una glucosa plasmática de 2 h de entre 7,8 mmol/l (140 mg/dl) a menos de 11,1 mmol/l (200 mg/dl), una glucosa plasmática en ayunas de entre 6,1 mmol/l (110 mg/dl) a 6,9 mmol/l (125 mg/dl), una glucosa plasmática en ayunas de entre 6,1 mmol/l (110 mg/dl) a 6,9 mmol/l (125 mg/dl) y una glucosa plasmática de 2 h menor de 7,8 mmol/l (140 mg/dl), o una glucosa plasmática en ayunas  $\geq$  7,0 mmol/l (126 mg/dl) o una glucosa plasmática de 2 h  $\geq$  11,1 mmol/l (200 mg/dl).

La evaluación de la mejora en el control de la glucemia puede evaluarse, por ejemplo, basándose en un cambio en la hemoglobina A1c (HbA1c, véase, por ejemplo, Reynolds et al., BMJ, 333(7568): 586-589, 2006). Las mejoras (por ejemplo, disminución) en HbA1c que son indicativas de eficacia terapéutica, pueden variar dependiendo de la medición de la línea basal inicial en un paciente, correspondiendo a menudo una mayor disminución a una línea basal inicial mayor y correspondiendo a menudo una menor disminución a una línea basal inicial menor. En un aspecto de la divulgación, el método debe producir una disminución de HbA1c de al menos aproximadamente 0,5 % (por ejemplo, de al menos aproximadamente 0,5 %, de al menos aproximadamente 1 %, de al menos aproximadamente 1,5 %, de al menos aproximadamente 2 %, de al menos aproximadamente 2,5 %, de al menos aproximadamente 3 %, de al menos aproximadamente 3,5 %, de al menos aproximadamente 4 % o más) en comparación con niveles predosis. Una A1C de  $\geq$  6,5 % es indicativa de diabetes.

El GLP-I es una hormona neuroendocrina del intestino distal con una fuerte acción insulínica que se sintetiza y secreta a partir de células L en el intestino en respuesta a la ingestión del alimento (Kieffer TJ, Habener JF 1999. *Endocr Rev* 20: 876-913). Cabe destacar que la acción de GLP-I depende de la glucosa, evitando la aparición de hipoglucemia. El precursor intracelular de GLP-I, GLP-1-(1-37), se escinde del proglucagón, y posteriormente se eliminan los seis primeros aminoácidos de extremo N para formar péptidos bioactivos. Aproximadamente, el 80 % del GLP-I truncado está amidado para formar GLP-1(7-36) amida; la forma predominante secretada de GLP-I, mientras que el resto se libera como GLP-1-(7-37) (Orskov C. et al; *Diabetes* 43:535-539, 1994). Tanto GLP-1(7-36) NH<sub>2</sub> como GLP-1(7-37) interactúan con un receptor de GLP-I (GLP-Ir) específico que se expresa en las células  $\beta$  pancreáticas y en otros tejidos, tales como en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso central. *In vivo*, el GLP-1(7-36) NH<sub>2</sub> y el GLP-1(7-37) tienen efectos equipotentes para estimular la liberación de insulina estimulada por glucosa, (Orskov C. et al; *Diabetes* 43:535-539, 1994), y en varios modelos animales se ha establecido un papel fisiológico de estas hormonas en la respuesta de la incretina. Se han atribuido numerosos efectos distintos de la estimulación de la liberación de insulina al GLP-I. En el páncreas, estimula la biosíntesis de insulina, el restablecimiento de la sensibilidad a la glucosa en los islotes y estimula el aumento de la expresión del vehículo de glucosa GLUT-2 y glucoquinasa. El GLP-I regula la masa de células  $\beta$  estimulando la replicación y el crecimiento y también inhibe la apoptosis de células  $\beta$  existentes y la neogénesis de nuevas células  $\beta$  a partir de células precursoras del conducto. El GLP-I inhibe la secreción de glucagón y conduce a una producción de glucosa hepática reducida. En el intestino, el GLP-1 es un potente inhibidor de la motilidad y vaciamiento gástrico y también inhibe la secreción de ácido gástrico. Esto conduce a disminución de ingesta de alimento y a disminución del peso corporal (Stoffers, D. A. et al; *Diabetes* 2000, 49, 741-748. *Drucker DJ Diabetes Care* 26:2929-2940, 2003).

El GLP-I actúa a través de un receptor acoplado a proteína G para ejercer sus funciones. Este receptor se expresa en muchos tejidos, incluidos los islotes pancreáticos, el sistema nervioso central, el pulmón, el riñón, el corazón y el intestino. El GLP-I está acoplado con su receptor a través de G<sub>s</sub> estimuladora y adenilato ciclasa para aumentar el AMPc intracelular. El GLP-I también puede inducir a otras señales intracelulares, incluyendo el aumento de calcio intracelular, la actividad de la Fosfoinositol 3 -quinasa (PI3K) y la actividad de proteína quinasa activada por mitógeno (Buteau J. et al; *Diabetologia* 42:856-864, 1999; Bullock BP et al; *Endocrinology* 137: 2968-2978, 1996).

El nivel en plasma del GLP-1 bioactivo es de 5 a 10 pmol/l en seres humanos normales en ayunas, sin embargo se reduce significativamente en pacientes diabéticos.

La adiponectina se secreta en la corriente sanguínea, donde representa aproximadamente el 0,01 % de toda la proteína plasmática, aproximadamente de 5 a 10  $\mu$ g/ml. Los niveles de adiponectina son significativamente inferiores en las personas diabéticas en comparación con las delgadas y los niveles de adiponectina fueron estadística y significativamente inferiores en los pacientes con EHGNA (enfermedad del hígado graso no alcohólico) en comparación con los controles.

En consecuencia, el tratamiento de la resistencia a la insulina con las composiciones de la presente divulgación puede producir un aumento en el pico inicial de la secreción de insulina, adiponectina y GLP-1 de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y más de 99 % comparado con un control sin tratamiento o con niveles antes del tratamiento.

El tratamiento de la resistencia a la insulina con las composiciones de la presente divulgación puede producir una disminución de la glucosa plasmática en ayunas, HbA1c, puntuación HOMA y OGTT de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y más de 99 % comparado con un control sin tratamiento o con niveles antes del tratamiento.

El tratamiento de la resistencia a la insulina con las composiciones de la presente divulgación puede producir un aumento en el pico inicial de la secreción de insulina, adiponectina y GLP-1 de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15,

20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y más de 99 % comparado con un control sin tratamiento o con niveles antes del tratamiento.

5 La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) describe un espectro de enfermedades hepáticas que van del simple hígado graso (esteatosis) a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con progresiva fibrosis e insuficiencia hepática. La hiperglucemia con o sin evidencia de hiperlipidemia se asocia comúnmente a la EHGNA. La enfermedad presenta las características histológicas de la enfermedad hepática inducida por alcohol en pacientes que no consumen cantidades significativas de alcohol. Todas las etapas de la EHGNA tienen en común la acumulación de grasa en las células del hígado. Farrell y Larter en *Hepatology*, 243:899S112 (2006) describen la  
10 EHNA como "la piedra angular" entre la esteatosis hepática y la cirrosis en el espectro de EHGNA. Véase también Palekar, et al., *Liver Int.*, 26(2): 151-6 (2006). En la EHNA, la acumulación de grasa se asocia a diversos grados de inflamación y fibrosis. Las afecciones más comúnmente asociadas a la EHGNA son la obesidad, la diabetes de tipo 2 y el síndrome metabólico.

15 La hepatitis alcohólica es precursora de la cirrosis y está causada por el consumo alcohol. El cuadro histológico típico incluye necrosis hepatocelular, degeneración de vacuolas y cuerpos hialinos de Mallory alcohólicos (agregaciones anómalas de proteínas de filamentos intermedios celulares indicativas de fibrosis). La colestasis es prominente. La hepatitis alcohólica puede variar de una hepatitis leve, siendo las pruebas de laboratorio anómalas la única indicación de enfermedad, a una disfunción hepática grave con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica causada por  
20 insuficiencia hepática), ascitis (acumulación de líquido en el abdomen), varices esofágicas hemorrágicas (venas varicosas en el esófago), coagulación anómala de la sangre y coma. La hepatitis alcohólica es reversible si el paciente deja de consumir alcohol, pero generalmente tarda varios meses en resolverse. La hepatitis alcohólica puede conducir a cicatrización hepática y cirrosis. Si las anomalías hepáticas duran menos de aproximadamente  
25 seis meses, la enfermedad se considerará como hepatitis aguda; si el curso de la enfermedad se alarga más de seis meses, la hepatitis se considera crónica. En una realización, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento y/o profilaxis de la hepatitis alcohólica.

30 En pacientes con EHGNA histológicamente demostrada, los niveles de aminotransferasas hepáticas en suero, específicamente alanina aminotransferasa (ALT), son elevados del límite superior de lo normal a 10 veces este nivel (Schwimmer et al., *J Pediatr* 2003; 143 (4): 500-5; Rashid et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 (1): 48-53). La proporción de ALT/AST (aspartato aminotransferasa) es  $> 1$  (intervalo de 1,5 a 1,7) que difiere de la esteatohepatitis alcohólica, donde la proporción es generalmente  $< 1$ . Otras pruebas serológicas anómalas que pueden estar anómalamente elevadas en EHNA son la gamma-glutamilttransferasa (gamma-GT) y niveles en ayunas de insulina,  
35 colesterol y triglicéridos en plasma.

En consecuencia, un sujeto humano que necesita tratamiento también puede diagnosticarse supuestamente con pruebas de suero de las enzimas hepáticas. Por ejemplo, puede indicarse esteatosis por niveles elevados en suero (a menudo moderadamente elevados, por ejemplo, niveles elevados aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 o 12  
40 veces por encima de lo normal) de las enzimas hepáticas (tales como, por ejemplo, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa,  $\gamma$ -glutamilttransferasa, fosfatasa alcalina) cuando otras causas (tales como, por ejemplo, hepatitis aguda, enfermedad autoinmunitaria, hepatitis crónica, cirrosis, hepatitis fulminante, carcinoma hepatocelular, carcinoma metastásico, insuficiencia cardíaca derecha y hepatitis vírica) han sido eliminadas. Por ejemplo, valores de alanina aminotransferasa (ALT o SGPT) superiores a 32, 24 y 56 unidades por litro de suero o  
45 valores al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más veces de los normales pueden ser indicativos de un trastorno asociado a depósitos de lípidos hepáticos o valores de aspartato aminotransferasa (AST o SGOT) superiores a 40 unidades por litro de suero o valores al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más veces de los normales. La proporción de AST con respecto a ALT a menudo es menor que uno en EHGNA, pero puede ser mayor que uno en pacientes con enfermedad hepática alcohólica o enfermedad hepática avanzada. Además, los niveles de  $\gamma$ -  
50 glutamilttransferasa pueden estar significativamente elevados, por ejemplo, valores de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más veces de los normales. El volumen corpuscular medio (VCM) puede ser mayor que, por ejemplo, 86, 98, 100 y 110 femtolitros.

55 La expresión "enzimas hepáticas elevadas" se refiere a niveles elevados de enzimas hepáticas tales como alanina aminotransferasa (ALT), g-glutamilttransferasa (GGT), aspartato transaminasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP). El grado de elevación de la enzima puede ser entre 1 y 4 veces el límite superior de valores normales.

60 En algunas realizaciones, las enzimas hepáticas elevadas pueden caracterizarse por una AST mayor que 40 UI/l, una ALT mayor que 30 UI/l, una ALT mayor que 56 UI/l, una ALP mayor que 115 UI/l o una GGT mayor que 80 UI/l.

Además de diagnosticarse supuestamente con pruebas de suero de las enzimas hepáticas, un sujeto que necesite tratamiento también puede diagnosticarse supuestamente con técnicas no invasivas de formación de imágenes (p. ej., ecografía, tomografía computarizada y resonancia magnética) cuando la esteatosis es mayor que, por ejemplo,  
65 25 % o 30 %. En general, puede ser difícil distinguir entre EHGNA y EHNA para detectar la fibrosis o para determinar la progresión de la enfermedad mediante dichos métodos de formación de imágenes. La EHGNA puede presentarse como una acumulación focal o difusa de lípidos, pero en la EHNA el lípido es generalmente difuso. La

enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) también puede detectarse por espectroscopia de resonancia magnética, una técnica que puede ser de valor para la determinación cuantitativa de los niveles de lípidos hepáticos. Por ejemplo, la determinación de los niveles de triglicéridos hepáticos por MRI ha demostrado correlacionarse con resultados histológicos de biopsias. Véase, por ejemplo, Kawamitsu et al., *Magn. Reson. Med Sci.* 2:47-50 (2003).

5 Un sujeto que necesita tratamiento se puede diagnosticar definitivamente mediante una biopsia del hígado. Un hígado se considera esteatósico cuando una biopsia revela al menos de 5 a 10 % p/p de depósitos de grasa (en la práctica, este valor puede determinarse microscópicamente como la fracción de hepatocitos llenos de lípidos). Véase, por ejemplo, Clark et al., *J. Am. Med. Assoc.* 289:3000-3004 (2003) y Adams et al., 172:899 *Can Med Assoc.*  
10 J.-905 (2005). Un hígado con depósitos de grasa que comprende hasta 25 % p/p puede considerarse levemente esteatósico y un hígado con depósitos de grasa que comprende más de 25 % p/p puede considerarse gravemente esteatósico. Los resultados histológicos indicativos de EHNA son esteatosis, vacuolización de hepatocitos, inflamación lobular, cuerpos hialinos de Mallory, infiltrado inflamatorio mixto, fibrosis pericelular y fibrosis perisinusoidal. Puede encontrarse información adicional, por ejemplo, en Neuschwander-Tetri et al., *Hepatology*  
15 37:1202-1219 (2003).

Se ha informado que la progresión de la enfermedad en EHGNA/EHNA, según la evaluación de fibrosis en la histología hepática, se correlaciona con el grado de resistencia a la insulina y con otras características del síndrome metabólico. Ryan et al., *Diabetes Care*, 28:1222-1224 (2005). Niveles elevados de inmunoglobulina A en suero  
20 también se han asociado a progresión de la enfermedad. Neuschwander-Tetri et al., *Hepatology* 37:1202-1219. Otros marcadores propuestos relacionados con fibrosis en pacientes con EHGNA incluyen laminina, hialuronano, colágeno de tipo IV y aspartato aminotransferasa. Dos Santos et al., *Braz. J. Med.Biol. Res.* 38:747-753 (2005). El género femenino también se asocia con progresión más rápida de la enfermedad.

25 El hígado graso puede caracterizarse por una esteatosis macrovesicular, esteatosis macrovesicular y una actividad necroinflamatoria, o por una puntuación NAS de al menos 4.

La eficacia del tratamiento también puede determinarse por la detección de una reducción en uno o más síntomas o manifestaciones clínicas de una enfermedad, así como por cualquiera de las pruebas descritas anteriormente para el  
30 diagnóstico.

El tratamiento de lesión hepática/hígado graso con las composiciones de la presente divulgación puede producir una disminución de AST, ALT, AP, GGT, de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65,  
35 70, 75, 80, 85, 90, 95 y más de 99 % en comparación con un control no tratado o con niveles antes del tratamiento.

También pueden determinarse uno o más de los siguientes criterios de valoración secundarios para evaluar la eficacia del tratamiento, tales como, por ejemplo, niveles de azúcar en la sangre (por ejemplo, glucosa) en ayunas (p. ej., que disminuyen a < 130, < 125, < 120, < 115, < 110, < 105, < 100; como alternativa disminución de > 20 %, >  
40 30 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 70 % > 80 %, > 90 %, > 95 % en comparación con niveles predosis), prueba de tolerancia a glucosa oral (OGTT) de 120 minutos (por ejemplo, < 200, < 190, < 180, < 170, < 160, < 150, < 140), ABC de glucosa/insulina, péptido C (p. ej., un aumento de > 25 %, > 50 %, > 60 %, > 70 %, > 80 %, > 90 %, > aumento del 100 % del tratamiento previo), reducción de la medicación para la diabetes (p. ej., insulina, agente hipoglucémico oral), mejora en la sensibilidad a la insulina, en los niveles séricos de citocinas (p. ej., normalización), en los niveles de CRP (p. ej., disminución de > 0,2, > 0,4, > 0,6, > 0,8, > 1,0, > 1,4, > 1,8, > 2,2, > 2,6, > 3,0 mg/l; o bien una disminución de > 20 %, > 30 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 70 %, > 80 %, > 90 %, > 95 % del tratamiento  
45 previo) en las mediciones de calidad de vida, mejora del IMC (índice de masa corporal) (reducción de 1 %, 3 %, 5 %), de la farmacocinética y similares (Saudek, et al., *JAMA*, 295:1688-97, 2006; Pfitzner et al, *Diabetes Technol Ther.* 8:28-36, 2006; Norberg, et al., *J Intern Med.* 260:263-71, 2006).

50 Asimismo, la evaluación de la eficacia de otras enfermedades o afecciones puede utilizar uno o más de los criterios de valoración mencionados anteriormente y/u otros conocidos en la técnica. Por ejemplo, el efecto sobre la hiperglucemia puede evaluarse midiendo los niveles de azúcar en la sangre (por ejemplo, glucosa) en ayunas, el efecto sobre la hiperinsulinemia puede evaluarse midiendo los niveles de insulina y/o los niveles de péptido C, el efecto sobre la obesidad puede evaluarse midiendo el peso y/o el índice de masa corporal y el efecto sobre la  
55 resistencia a la insulina puede evaluarse por una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT).

De forma alternativa o adicional, los sujetos tratados según la presente divulgación pueden experimentar una disminución en uno o más indicadores de riesgo cardiovascular y/o una disminución de los lípidos séricos con mejora en el perfil lipídico. Estas mediciones de lípidos séricos y/o del perfil lipídico puede incluir, por ejemplo, una  
60 disminución del colesterol, una disminución del colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL), una disminución del colesterol de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), una disminución de los triglicéridos, una disminución de los ácidos grasos libres, una disminución de la apolipoproteína B (Apo B), un aumento del colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL), mantenimiento del nivel de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL) en comparación con el nivel previo al tratamiento, y/o un aumento de la apolipoproteína A (Apo A). Por ejemplo, una  
65 disminución en el nivel de colesterol (por ejemplo, colesterol total) puede ser una disminución de al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o más, desde el nivel del tratamiento previo. Una

- disminución en el nivel de colesterol de lipoproteína de baja densidad puede ser una disminución de al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o más desde el nivel del tratamiento previo. Una disminución en el nivel de triglicéridos en la sangre del sujeto puede ser una disminución de al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o más desde el nivel del tratamiento
- 5 previo. Una disminución en el nivel de ácidos grasos libres puede ser una disminución de al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o más desde el nivel del tratamiento previo. Un aumento en el nivel de colesterol de lipoproteína de alta densidad puede ser un aumento de al menos el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 % o más desde el nivel del tratamiento previo.
- 10 Del mismo modo, los sujetos tratados según la presente divulgación pueden experimentar una disminución de la resistencia a la insulina. Tal disminución de la resistencia a la insulina puede medirse por una mejora en una evaluación del modelo homeostático (HOMA), una prueba de tolerancia a insulina, una prueba de supresión de insulina, un método de glucosa en plasma estable o cualquiera de los otros métodos de ensayo conocidos en la
- 15 técnica (véase, por ejemplo, Matthews et al, 1985, *Diabetologia* 28:412-419; Odegaard et al., 2007, *Nature* 447:1116 - 1121; Emoto et al., 1999, *Diabetes Care* 22:818-822). Otras de las mediciones mencionadas anteriormente pueden realizarse utilizando cualquiera de una variedad de ensayos estándar conocidos en la materia, por ejemplo, ensayos publicados en Chemecky CC, Berger BJ, Eds. (2004). *Pruebas de laboratorio y procedimientos diagnósticos*, 4ª ed. Filadelfia: Saunders; Fischbach FT, Dunning MB III, Ed. (2004). *Manual de laboratorio y pruebas diagnósticas*, 7ª ed. Filadelfia: Lippincott Williams y Wilkins; Genest J, et al. (2003).
- 20 Recomendaciones para tratar la dislipidemia y la prevención de enfermedades cardiovasculares: Resumen de la actualización de 2003. *Revista de Asociación Médica Canadiense*, 169(9): 921-924. También disponible en línea: <http://www.cmaj.ca/cgi/content/full/169/9/921/DC1>; *Manual de pruebas diagnósticas* (2003). 3ª ed. Filadelfia: Lippincott Williams y Wilkins; y Pagana KD, Pagana TJ (2002). *Manual de Mosby de diagnóstico y pruebas de*
- 25 *laboratorio*, 2ª ed. St. Louis: Mosby.
- La preparación de la inmunoglobulina anti-LPS puede proceder de calostro o de huevos de ave.
- 30 La administración de la composición de la presente divulgación para poner en práctica los métodos actuales de terapia se lleva a cabo administrando a un sujeto que necesite dicho tratamiento o profilaxis una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos en la composición. La necesidad de una administración profiláctica según los métodos de la presente divulgación se determina utilizando los factores de riesgo conocidos como se describe en este documento.
- 35 Cada forma de dosis oral puede comprender, por ejemplo, el calostro equivalente de menos de 1200 mg (en peso seco), preferentemente de 800 mg, preferentemente menos de 400 mg, más preferentemente menos de 200 mg. Por calostro equivalente nos referimos a la cantidad de calostro crudo, purificado de cualquier manera, que se procesa para proporcionar el contenido de una forma de dosis.
- 40 Para la administración oral, la forma de dosis oral puede comprender de 5 mg a 500 mg de calostro bovino en polvo (CBP) (en peso seco), por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 o 500 mg.
- 45 La forma de dosis oral puede comprender de 500 mg a 5000 mg de calostro bovino en polvo (en peso seco), por ejemplo, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3250, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4750 o 5000 mg.
- 50 Son intervalos de dosis adecuados, por ejemplo, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 5000 mg/día, preferentemente de 50 mg a aproximadamente 5000 mg/día, más preferentemente de 500 mg a aproximadamente 5000 mg/día, o más preferentemente de 1500 mg a aproximadamente 2000 mg/día de CBP (en peso seco). En una realización preferida, la dosis es de 1800 mg/día de CBP (en peso seco).
- 55 En una realización, los anticuerpos están presentes en la composición para la administración oral en una cantidad suficiente para proporcionarse desde al menos 7 % en peso seco de la composición de IgG.
- En otra realización los anticuerpos están presentes en la composición para la administración oral en una cantidad suficiente para proporcionarse desde al menos 40 % en peso de la composición de IgG.
- 60 En consecuencia, para la administración oral, la forma de dosis oral puede comprender de 2 mg a 200 mg de IgG, por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 125, 150, 175 o 200 mg de IgG.
- 65 La forma de dosis oral puede comprender de 200 mg a 2000 mg de IgG, por ejemplo, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 mg de IgG.
- En una realización, los anticuerpos específicos contra antígenos están presentes en la composición para

administración oral en una cantidad suficiente para proporcionar desde al menos 10 % de IgG específica del peso de IgG.

5 En consecuencia, para la administración oral, la forma de dosis oral puede comprender de 0,2 mg a 20 mg de IgG específica, por ejemplo, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 11,0, 12,5, 15,0, 17,5 o 20,0 mg de IgG específica.

10 Son intervalos de dosificación adecuados, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 mg/día, preferentemente de 20 a aproximadamente 2000 mg/día, más preferentemente de 200 a aproximadamente 2000 mg/día o más preferentemente de 600 mg a aproximadamente 800 mg/día de IgG. En una realización preferida, la dosis de IgG es de 720 mg/día.

15 En una realización, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS no se administra a una dosis de aproximadamente 600 mg/día (volumen de peso seco).

La forma de dosis oral puede administrarse durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días.

20 En una realización, la forma de la dosis oral se administra durante 30 días.

En una realización, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS se administra durante 30 días en dosis de 1,8 g/día. En una realización, la preparación de inmunoglobulina anti-insulina se administra durante 30 días en dosis de 1,2 g/día.

25 La forma de dosis oral comprende preferentemente calostro procedente de calostro hiperinmunitario y/o de calostro que se ha añadido a los anticuerpos policlonales según las enseñanzas del documento PCT/AU03/00348 (N.º Pub.: WO/2003/080082). La forma de dosificación oral también puede comprender un sistema tampón, tal como el que se divulga en el documento PCT/AU2005/001746 (N.º Pub.: WO/2006/053383).

30 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de los compuestos activos en la composición que provoca la respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, sujeto, o ser humano, que desea el investigador, veterinario, médico u otro especialista clínico, que incluye el alivio de los síntomas del trastorno en tratamiento. Los nuevos métodos de tratamiento de esta divulgación son trastornos conocidos por los expertos en la materia.

35 La expresión "cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de los compuestos activos en la composición que provoca la respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, sujeto o ser humano, que desea el investigador, veterinario, médico u otro especialista clínico, para prevenir la aparición de los síntomas del trastorno en un sujeto en riesgo de desarrollar el trastorno.

40 Evidentemente, la magnitud de las dosis profiláctica o terapéutica de los principios activos puede variar con la naturaleza de la gravedad de la afección que tratar. También puede variar según la edad, el peso y la respuesta de cada paciente y puede administrarse al sujeto en dosis únicas o divididas. Por otro lado, puede ser necesario utilizar dosificaciones fuera de los intervalos estipulados en algunos casos.

45 La preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede administrarse a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25.000 mg diarios, de 10 mg a aproximadamente 20.000 mg diarios, de 25 mg a aproximadamente 15.000 mg diarios, de 100 mg a aproximadamente 2000 mg diarios o de aproximadamente 1800 mg diarios. En una realización, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS no se administra a una dosis de aproximadamente 600 mg diarios.

50 La preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede formularse para la administración a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25.000 mg diarios, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20.000 mg diarios, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 15.000 mg diarios, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 2000 mg diarios o de aproximadamente 1800 mg diarios.

55 En una realización, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS no está formulada para la administración a una dosis de aproximadamente 600 mg diarios.

60 Se prefiere que las bacterias de las que se aísla cada tipo de antígeno O se cultiven en sistemas de cultivo bacteriano distintos y, después de la separación del antígeno O de las bacterias, los antígenos de componente se añaden para formar un componente de la vacuna.

65 En la técnica se conocen métodos para preparar antígeno LPS/O y se describen en el documento 2004/WO/078209. En el documento WO/2004/078209 también se describen métodos para preparar calostro bovino hiperinmunitario (CBHI)

- 5 La preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede prepararse inmunizando a un mamífero o ave con LPS de varias cepas de *E. coli*. El mamífero o ave puede inmunizarse con LPS seleccionado del grupo que consiste en LPS O6, O8, O15, O25, O27, O63, O78, O114, O115, O128, O148, O153, O159 y otros LPS asociados a *E. coli* enterotoxigénica.
- El mamífero o ave puede inmunizarse con LPS seleccionado del grupo formado por LPS O78, O6, O8, O129 y O153. El LPS puede comprender LPD O78.
- 10 En otra realización, la composición comprende adicionalmente una preparación de inmunoglobulina anti-insulina.
- La preparación de inmunoglobulina anti-insulina se administra a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25.000 mg diarios, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20.000 mg diarios, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 15.000 mg diarios, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 10.000 mg diarios, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 4000 mg diarios, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 3000 mg diarios, de aproximadamente 1000 mg a aproximadamente 1400 mg diarios o de aproximadamente 1200 mg diarios.
- 15
- La preparación de inmunoglobulina anti-insulina puede formularse para la administración a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25.000 mg diarios, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20.000 mg diarios, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 15.000 mg diarios, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 10.000 mg diarios, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 4000 mg diarios, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 3000 mg diarios, de aproximadamente 1000 mg a aproximadamente 1400mg diarios o de aproximadamente 1200 mg diarios.
- 20
- 25 Para la administración oral, la forma de dosis oral puede comprender de 5 mg a 500 mg de calostro bovino en polvo (CBP) (en peso seco), por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 o 500 mg.
- 30 La forma de dosis oral puede comprender de 500 mg a 5000 mg de calostro bovino en polvo (en peso seco), por ejemplo, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3250, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4750 o 5000 mg.
- 35 En una realización, los anticuerpos están presentes en la composición para la administración oral en una cantidad suficiente para proporcionarse desde al menos 7 % en peso seco de la composición de IgG.
- En otra realización, los anticuerpos están presentes en la composición para la administración oral en una cantidad suficiente para proporcionarse desde al menos 40 % en peso de la composición de IgG.
- 40 En consecuencia, para la administración oral, la forma de dosis oral puede comprender de 2 mg a 200 mg de IgG, por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 125, 150, 175 o 200 mg de IgG.
- 45 La forma de dosis oral puede comprender de 200 mg a 2000 mg de IgG, por ejemplo, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 mg de IgG.
- En una realización, los anticuerpos específicos contra el antígeno están presentes en la composición para administración oral en una cantidad suficiente para proporcionarse desde al menos 10 % de IgG específica del peso de IgG.
- 50 En consecuencia, para la administración oral, la forma de dosis oral puede comprender de 0,2 mg a 20 mg de IgG específica, por ejemplo, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 11,0, 12,5, 15,0, 17,5 o 20,0 mg de IgG específica
- 55 La forma de dosis oral puede administrarse durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días.
- 60 La preparación de inmunoglobulina anti-insulina puede prepararse inmunizando a un mamífero o ave con insulina conjugada a una proteína. La insulina puede conjugarse a una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, maleimidobenzoil sulfosuccinimida éster (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehido, anhídrido succínico, SOCI2 o R1N=C=NR, donde R y R1 son independientemente son grupos alquilo. Como ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse, se incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM
- 65 (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El experto en la materia podrá seleccionar el protocolo de inmunización sin excesiva experimentación.

La preparación de inmunoglobulina anti-insulina puede prepararse inmunizando a un mamífero o ave con insulina conjugada a hemocianina de lapa californiana (KLH).

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir niveles de glucosa en ayunas en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar el pico inicial de secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir la tolerancia a la glucosa oral en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de HBA1C en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de triglicéridos en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de colesterol total en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de colesterol LDL en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de ALT en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de AST en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de ALP en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir los niveles de GGT en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de GLP-1 en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar los niveles de adiponectina en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la proporción de adiponectina/IL-6 en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho a paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar las células T reguladoras CD25+ en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente

eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir el peso corporal de un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir la circunferencia de la cintura o la circunferencia del brazo de un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la reducción de niveles de glucosa en ayunas en un paciente humano que lo necesite

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para aumentar el pico inicial de secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de la tolerancia a la glucosa oral en un paciente humano que lo necesite.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para aumentar la secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de HBA1C en un paciente humano que lo necesite.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de triglicéridos en un paciente humano que lo necesite

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un anti-Preparación de la inmunoglobulina de LPS para su uso en la disminución de los niveles de colesterol total en un paciente humano que lo necesite.

50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de colesterol LDL en un paciente humano que lo necesite.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de ALT en un paciente humano que lo necesite.

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de AST en un paciente humano que lo necesite.

65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulinas anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de fosfatasa alcalina en un paciente humano que lo necesite

70 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de los niveles de GGT en un paciente humano que lo necesite.

75 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para aumentar los niveles de GLP-1 en un paciente humano que lo necesite

80 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para aumentar los niveles de adiponectina en un paciente humano que lo necesite.

85 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para aumentar la proporción de adiponectina/IL-6 en un paciente humano que lo necesite.

90 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de

inmunoglobulina anti-LPS para aumentar las células T reguladoras CD25+ en un paciente humano que lo necesite.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de peso corporal en un paciente humano que lo necesite.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en la disminución de la circunferencia de la cintura o del brazo en un paciente humano que lo necesite.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para reducir niveles de glucosa en ayunas en un paciente humano que lo necesite

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar el pico inicial de secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir la tolerancia a la glucosa oral en un paciente humano que lo necesite.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar la secreción de insulina en un paciente humano que lo necesite

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de HBA1C en un paciente humano que lo necesite.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de triglicéridos en un paciente humano que lo necesite.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de colesterol total en un paciente humano que lo necesite.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de colesterol LDL en un paciente humano que lo necesite.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de ALT en un paciente humano que lo necesite.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de AST en un paciente humano que lo necesite.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de ALP en un paciente humano que lo necesite.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir los niveles de GGT en un paciente humano que lo necesite.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar los niveles de GLP-1 en un paciente humano que lo necesite.

50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar los niveles de adiponectina en un paciente humano que lo necesite.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulinas anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar la proporción de adiponectina/IL-6 en un paciente humano que lo necesite.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para aumentar las células T reguladoras CD25+ en un paciente humano que lo necesite.

60 El tratamiento que utiliza las composiciones de la presente divulgación puede producir un aumento de las células T reguladoras de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y más de 99 % en comparación con un control no tratado o con los niveles antes del tratamiento.

65 Las respuestas de las células T pueden cuantificarse utilizando métodos conocidos en la materia, por ejemplo ensayos ELISPOT, métodos de citometría de flujo o de inmunodetección útiles descritos en la bibliografía científica,

tales como, por ejemplo, Maggio et al., Enzyme-Immunoassay (1987) y Nakamura, et al., Enzyme-Immunoassays: Heterogeneous and homogeneous Systems, Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1: Immunochemistry, 27.1-27.20 (1986). Los inmunoensayos, en su sentido más simple y directo, son ensayos de unión que implican la unión entre el antígeno y los anticuerpos. Se conocen muchos tipos y formatos de inmunoensayos y todos son adecuados para la detección de las células T reguladoras divulgadas. Son ejemplos de inmunoensayos el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el ensayo de inmunotransferencia ligado a enzimas (ELISPOT), los radioinmunoensayos (RIA), los ensayos de radioinmunoprecipitación (RIPA), los ensayos de captura de inmunoperlas, la transferencia Western, transferencia puntual, ensayos de cambio de gel, citometría de flujo, matrices de proteínas, matrices de perlas multicomplejo, captura magnética, formación de imágenes *in vivo*, transferencia de energía por resonancia y fluorescencia (FRET) y la recuperación y localización de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP/FLAP)

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir el peso corporal en un paciente humano que lo necesite.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para disminuir la circunferencia de la cintura o del brazo en un paciente humano que lo necesite.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un ser humano que padece una enfermedad mediada por células T, que comprende administrar al ser humano una cantidad eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "enfermedad mediada por de células T" pretende significar una afección en la que una respuesta de célula T inadecuada es un componente de la patología. La expresión pretende incluir enfermedades directamente mediadas por células T e indirectamente mediadas por células T, tales como enfermedades en las que una respuesta de célula T inadecuada contribuye a producir daños como consecuencia de la producción de anticuerpos autoinmunitarios. La expresión pretende incluir enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T y replicación clonal no regulada de células de T. Por lo tanto, una enfermedad mediada por células T incluye afecciones mediadas por células T que presentan síntomas clínicamente reconocibles, así como disfunciones mediadas por células T. Son ejemplos específicos de enfermedades mediadas por células de T la diabetes de tipo 1, la insulinitis, la enfermedad de Graves, la artritis reumatoide (AR), la esclerosis múltiple (EM), el lupus eritematoso sistémico, la miastenia grave, el péñfigo vulgar, la tiroiditis de Hashimoto, la uveítis autoinmunitaria, el síndrome de Sjögren, la dermatomiositis y la enfermedad de Addison.

Como se utiliza en este documento, "mediada(o) por Th1", en referencia a una enfermedad, un trastorno o una afección, es una(o) que se ha asociado a la producción aumentada de citocinas de células Th1, incluyendo IFN- $\gamma$ , IL-2, GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-3. Como ejemplos específicos se incluyen esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulínica, enfermedad de Crohn, uveítis, reumatismo crónico y lupus eritematoso sistémico.

Como se utiliza en este documento, "mediada(o) por Th2", en referencia a una enfermedad, un trastorno o una afección, es una(o) que no se ha asociado a la producción aumentada de citocinas de células Th1. Como ejemplos específicos se incluyen la esclerodermia, la miositis múltiple, el síndrome de vasculitis, la enfermedad mixta del tejido conectivo, el síndrome de Sjögren, el hipertiroidismo, la enfermedad de Hashimoto, la miastenia grave, el síndrome de Guillain-Barré, la hepatopatía autoinmunitaria, la colitis ulcerosa, la nefropatía autoinmunitaria, la hematopatía autoinmunitaria, la neumonía intersticial idiopática, la neumonitis por hipersensibilidad, la dermatosis autoinmunitaria, las cardiopatías autoinmunitarias, la infertilidad autoinmunitaria y la enfermedad de Behcet.

Se contemplan todas las referencias a una enfermedad o afección que incluyan otras enfermedades, afecciones y/o síntomas asociados a la enfermedad o afección indicada por la comunidad médica. Por ejemplo, la frase "enfermedad(es) autoinmunitaria(s)" se utiliza en el presente documento para referirse a un amplio grupo de dolencias, algunas de ellas con las causas mal definidas, que se piensa que están asociadas a anomalías en la regulación inmunitaria. Por lo tanto, la frase, tal como se utiliza en el presente documento, incluye, pero de forma no limitativa, enfermedades tales como la artritis reumatoide, el lupus, la enfermedad de injerto contra huésped, la diabetes insulínica, la encefalomiелitis autoinmunitaria, la hepatitis autoinmunitaria, la enfermedad de Crohn y la esclerosis múltiple. Además, el término "alergia" pretende incluir enfermedades alérgicas, incluidas, pero de forma no limitativa, la bronquitis crónica, dermatitis atópica, polinosis (rinitis alérgica), angitis alérgica, conjuntivitis alérgica, gastroenteritis alérgica, hepatopatía alérgica, cistitis alérgica y púrpura alérgica.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad mediada por células T.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de un sujeto humano que padece una enfermedad mediada por células T.

La enfermedad mediada por células T puede ser una resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes, síndrome metabólico, o una enfermedad asociada a estas, o la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad seleccionada de una resistencia a la insulina o trastornos asociados, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una preparación de inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad seleccionada de la resistencia a la insulina o trastornos asociados.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de una preparación de inmunoglobulina anti-LPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad seleccionada de resistencia a la insulina o trastornos asociados.

La resistencia a la insulina o un trastorno asociado puede ser diabetes, síndrome metabólico o esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

20 También se hace referencia a los documentos PCT/IL2009/000273 (WO/2009/113065) y PCT/IL2010/000339.

25 Divulgada y descrita, debe entenderse que la presente invención no se limita a ejemplos particulares ni a etapas de métodos y a composiciones divulgadas en el presente documento, ya que dichas etapas de métodos y composiciones pueden variar algo. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento se utiliza para describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante ya que el alcance de la presente invención solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

30 Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno(a)", "el" y "la", incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

35 A lo largo de esta memoria descriptiva y en los ejemplos y reivindicaciones que se indican más adelante, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende" y variantes tales como "que comprende" y "comprendiendo" implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

40 Los siguientes ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo aspectos de la presente invención. Debe apreciarse que, aunque estas técnicas sean ejemplares de realizaciones preferidas para la práctica de la divulgación, los expertos en la materia, a la luz de la presente divulgación, reconocerán que pueden efectuarse numerosas modificaciones sin alejarse de la esencia y del alcance previsto de la invención. Los ejemplos que no quedan dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan con fines comparativos.

## 45 Ejemplos

### Ejemplo 1: Preparación de preparaciones de inmunoglobulina anti-LPS

50 El producto "BioGARD" es una preparación de calostro suministrada por Immuron Limited. Cada comprimido de Immuron BioGARD es un comprimido oral sin recubrimiento de 1,2 g, que contiene 600 mg de calostro bovino en polvo liofilizado, en combinación con excipientes. La sustancia activa en comprimidos BioGARD es calostro bovino en polvo liofilizado ordeñado de ganado vacuno lechero comercial. Las vacas de este ganado, que se habían vacunado contra patógenos habituales del ganado, se vacunaron con una vacuna contra antígenos de la pared celular externa de múltiples cepas de bacterias de *E. coli*, un organismo principal presente en la microflora del intestino humano. El CBP (calostro bovino en polvo) Immuron es un producto natural con alto contenido en lactosa (>80 %) y reducido en grasa, procedente del primer ordeño de vacas lecheras comerciales recogido después del parto. Antes de la formación del comprimido, se presenta como un polvo liofilizado concentrado.

60 El CBP (calostro bovino en polvo) Immuron contiene aproximadamente un porcentaje de anticuerpos (inmunoglobulinas) de 40 % en el polvo seco. Las inmunoglobulinas presentes en el CBP de BioGARD tienen una alta actividad de unión contra el Lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas. La unión del LPS se analiza mediante Immuron utilizando un ELISA estandarizado y sistemas de detección de inmunotransferencia.

65 El BioGARD se produjo de la siguiente manera. Las vacas lecheras se inmunizaron con una mezcla de antígenos LPS. Por ejemplo, las vacas lecheras se inmunizaron con LPS O78 o con una mezcla de LPS O6, O8, O15, O25, O27, O63, O78, O114, O115, O128, O148, O153, O159 y otros LPS asociados a *E. coli* enterotoxigénica. La vacuna de antígeno se administró durante las últimas ocho semanas de gestación. La leche con calostro se recogió durante

los dos primeros días de la lactancia. Se retiró la grasa de la leche y leche desnatada se pasteurizó a 56 °C durante 30 minutos y, después, se coaguló por agregación de enzima coagulante como se indica en Hilpert, en Banco de Leche Humana 1984. Después de retirar la cuajada de la leche que contiene caseína, el suero se centrifugó y se desechó el precipitado fino. Lentamente se le añadió al sobrenadante el mismo volumen de solución saturada de sulfato de amonio mezclando constantemente como se indica en Brandon et al., (Brandon et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 49:613 (1971)). Después de la centrifugación, el precipitado resultante se guardó y el sobrenadante que contenía lactosa y sales se desechó.

El precipitado se disolvió en tampón TRIS-HCl, 0.01M pH 8 que contenía NaCl 0,32 M (30 % del volumen original). Esta solución se dializó exhaustivamente contra cinco volúmenes del mismo tampón utilizando un cartucho SIY30 de membrana en espiral de Amicon. Después, la solución de anticuerpo se concentró al 10 %, se congeló rápidamente y se liofilizó.

**Producción de fragmentos de anticuerpos procedentes de calostro.** Los fragmentos de anticuerpos se prepararon según un método modificado basado en los métodos descritos por Jones R.G.A. y Landon J. (Jones RGA y Landon J. J. Immunol. Métodos 263: 57-74 (2002)). Brevemente, se añade un mismo volumen de tampón de acetato de sodio 0,2M, pH 4,0 a una reserva de calostro obtenida de animales inmunizados como se describió anteriormente. El pH de la reserva de calostro diluido se ajustó a 4,6 y se incubó a 37° C durante dos horas para precipitar la caseína. Posteriormente, el calostro se centrifugó y se filtró (0,45 µm) para retirar la caseína. El pH del suero de calostro resultante se ajustó a pH 4,0, seguido de la adición de pepsina (soluciones enzimáticas con actividad 1:15.000) al 5,0 % p/p e incubación durante veinte horas a 45 °C. La digestión con pepsina se detuvo con la adición de 0,5 vol. de Tris IM pH 8 y enfriando la mezcla de reacción a 4 °C. El pH de la reacción se ajustó a pH 7,0 y la mezcla de F(ab')<sub>2</sub> se concentró con una membrana de ultrafiltración de 30 kD y se diafiltró frente a >50 volúmenes de tampón de fosfato de sodio 20 mM/NaCl 150 mM pH 6,0. Después, los pequeños péptidos se retiraron y la solución resultante que contenía F(ab')<sub>2</sub>, pepsina y péptidos grandes se sometió a una columna de intercambio de aniones Q Sepharose que une pepsina y agregados ácidos. Para obtener F(ab')<sub>2</sub> purificado, el Fc restante y la Ig no digerida se retiraron del F(ab')<sub>2</sub> (mezclado con el resto de péptidos grandes y la Ig no digerida), mediante proteína G o por cromatografía AIP Prometic Mabsorbent.

Preparación de Fab' mediante 2-mercaptoetilamina (MEA). Para preparar Fab', 50 µl (1/9 vol.) de 2-mercaptoetilamina (MEA) 0,1 M en tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 6,0, que contenía EDTA disódico recién preparado 5 mM, se añadieron a 0,1-3,0 mg de F(ab')<sub>2</sub> en 0,45 ml de tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 6,0. La mezcla se incubó después a 37 °C durante 90 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción se aplicó sobre una columna PD-10 o una columna conveniente G25 para retirar el exceso de MEA. Como tampón de ejecución se utilizó fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,0, con EDTA disódico 5 mM). El primer pico de proteínas que contenía Fab', se recogió y se utilizó para el tratamiento de las diversas indicaciones correspondientes como se indica en el presente documento más adelante.

Para preparar la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS se extrajo el calostro de aproximadamente 200 rebaños de vacas lecheras comerciales. Las vacas de estos rebaños, además de haberse vacunado contra patógenos habituales del ganado, se habían vacunado con una vacuna contra los antígenos de la pared celular externa de múltiples cepas de bacterias de *E. coli*, un organismo principal presente en la microflora del intestino humano. El calostro obtenido se congeló en bolsitas individuales para su ensayo. Para el procesamiento, el calostro se descongeló, se agrupó y se retiró la grasa. Cada lote se pasteurizó. El calostro se concentró por ultrafiltración para reducir el volumen antes de la liofilización. La etapa de ultrafiltración reduce la lactosa en el polvo final a menos del 7 % (de aproximadamente 50 %).

### **Ejemplo 2: Uso de preparaciones de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS procedente de calostro en el tratamiento de la hepatitis**

Para el modelo de hepatitis mediada por el sistema inmunitario, ratones C57/bl de once a doce semanas de vida recibieron una inyección en la vena de la cola de una dosis de 500 µg/ratón (aproximadamente 15 mg/kg) de Con A (MP Biomedicals, EE. UU.) que se disolvió en Tris 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, del que se sabe que induce la hepatitis. A los animales de todos los grupos de ensayo se les administraron por vía oral diferentes concentraciones y preparaciones de anticuerpos específicos o la preparación de BioGARD descrita en los procedimientos experimentales, en comparación con los controles no tratados. Los animales de todos los grupos de ensayo recibieron un seguimiento de los siguientes parámetros: niveles en suero de aspartato aminotransferasa (AST) y de alanina aminotransferasa (ALT), examen histológico de muestras de hígado, análisis FACS de linfocitos intrahepáticos e intraesplénicos para marcadores de NKT, medición de los niveles de citocina en suero y análisis de transferencia Western para determinar la expresión de los factores de transcripción STAT 1, 4 y 6 y NFκB, y se comparó con los grupos de control.

### **Ejemplo 3: Administración oral de calostro enriquecido con anticuerpos anti LPS**

Para preparar las preparaciones de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS, el calostro se extrajo de aproximadamente 200 rebaños de vacas lecheras comerciales. Las vacas de estos rebaños, además de haberse

vacunado contra patógenos habituales del ganado, se habían vacunado con una vacuna contra los antígenos de la pared celular externa de múltiples cepas de bacterias de *E. coli*, un organismo principal presente en la microflora del intestino humano. El calostro obtenido se congeló en bolsitas individuales para su ensayo. Para el procesamiento, el calostro se descongeló, se agrupó y se retiró la grasa. Cada lote se pasteurizó. El calostro se concentró por ultrafiltración para reducir el volumen antes de la liofilización. La etapa de ultrafiltración reduce la lactosa en el polvo final a menos del 7 % (de aproximadamente 50 %).

Se prepararon dos composiciones que comprendían las preparaciones de inmunoglobulina anti-LPS (calostro bovino hiperinmunitario) vacunando vacas preñadas con antígenos de la pared celular bacteriana (por ejemplo, LPS) preparados a partir de diversas cepas de *E. coli*, para producir anticuerpos muy concentrados (incluyendo IgG) contra LPS en el calostro. En los siguientes ejemplos, a esta preparación de inmunoglobulina anti-LPS se le denomina 'CBHI'.

Se preparó una segunda preparación vacunando vacas preñadas con una vacuna que comprendía diversas cepas de *E. coli*, y también enriquecida con LPS y otros antígenos de superficie, para producir anticuerpos muy concentrados (incluyendo IgG) contra LPS en el calostro. La IgG se purificó después de esta preparación de calostro. En los siguientes ejemplos, a esta composición se la denomina 'T-IgG'.

En la técnica se conocen métodos para preparar antígeno LPS/O y se describen en el documento WO/2004/078209. En el documento WO/2004/078209 también se describen métodos para preparar calostro bovino hiperinmunitario (CBHI).

**Tabla 1: Diseño Experimental**

Grupo	H2O bidestilada	Preparación de calostro (3 mg)	Administración
A N=10	30 ml	-	PO
B N=10	-	30 ml	PO

**Grupos experimentales.** Se estudiaron dos grupos de ratones (Tabla 1). Los ratones (10 por grupo) se alimentaron (por vía oral, PO) diariamente durante 7 días con 30 ul de agua (control, grupo A) o 30 ul (aproximadamente 3 mg) de preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS (grupo B) que se disolvió en agua. Después de 7 días, se sacrificaron los ratones. El día del sacrificio, se extrajo sangre cardiaca por técnicas estándar y, después, se obtuvo suero para fines futuros.

**Animales.** Se utilizaron ratones C57B1/6 vírgenes (*naïve*) (de 11 a 12 semanas de vida). Los ratones se adquirieron en Harlan Laboratories (Jerusalén, Israel) y se mantuvieron en el Centro para Animales de la Facultad de medicina de la Universidad Hebrea de Hadassah. A los ratones se les administró pienso de laboratorio estándar y agua a voluntad y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los experimentos con animales se llevaron a cabo según las directrices del Comité de asuntos institucionales de la Universidad Hebrea de Hadassah para el cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité.

**Hígado:** Después de extirpar los hígados, se transfirieron a PBS enfriado con hielo, se cortaron, se trocearon y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Dounce con 9 ml de tampón de lisis frío estéril 1, se dividió en tubos Eppendorff (1,5 ml en cada tubo) y se mantuvo en hielo durante 30 minutos, seguido de ultrasonido (cinco ciclos de 25 segundos) y centrifugación (a 4 °C, 14.000 RPM durante 15 minutos). Los sobrenadantes se recogieron en un tubo de muestras para la cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Bradford y se conservaron a -20 °C.

**Bazo.** Después de la escisión, los bazos se trocearon en rejillas de disociación de células (malla 60) en medio RPMI 1640, se centrifugó (a 4 °C, 1.400 RPM durante 10 minutos) y el sobrenadante se desechó; se efectuó la lisis de los glóbulos rojos añadiendo 1 ml de tampón de lisis RBC frío (cloruro de amonio 155 mM), seguido de aclarado tres veces con PBS frío y de centrifugación.

**Preparación de la fracción citosólica del bazo.** Se añadió tampón 1 frío al sedimento de las células de bazo (en una proporción 6:1 de tampón con respecto al sedimento) y se dividieron las células en viales de 2 ml, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, se sometieron a ultrasonido cinco veces (25 segundos cada vez) y se centrifugaron (a 4 °C, 14.000 RPM durante 15 minutos); después, se recogieron los sobrenadantes de todos los viales para muestrear la cuantificación de proteínas y se conservaron a -20 °C.

**Preparación de la fracción de membrana del bazo.** El sedimento restante de la etapa de centrifugación

mencionada anteriormente del fraccionamiento citosólico se añadió con 100 a 250 ml de tampón 2, se agitó durante 30 minutos a 4 °C y se centrifugó (a 4 °C, 14.000 RPM durante 15 minutos). Se recogieron los sobrenadantes después de todos los viales para muestrear la cuantificación de proteína y se conservaron a -20 °C.

5 **Aislamiento de linfocitos esplénicos y hepáticos para la determinación de subpoblaciones de células T.** Se sacrificaron ratones de diferentes modelos experimentales los días indicados. Se aislaron células NKT y linfocitos esplénicos y se retiraron los glóbulos rojos. Se aislaron los linfocitos intrahepáticos de la siguiente manera: después de cortar la vena cava inferior por encima del diafragma, el hígado se lavó abundantemente con PBS frío hasta volverse pálido, seguido de la retirada de tejido conectivo y la vesícula. Hígados y bazo se mantuvieron en RPMI-1640 + FCS. Después, los bazo se trituraron a través de un filtro celular de nailon de 70 µm (Falcón) y se centrifugó (1250 rpm durante 7 min) para la retirada de residuos celulares. Se efectuó la lisis de los glóbulos rojos con 1 ml de tampón de lisis de cloruro de amonio 155 mM frío y se centrifugó (a 1250 rpm durante 3 min) inmediatamente. Después, los esplenocitos se lavaron y se resuspendieron con RPMI 1 ml + FCS. Se retiraron los restos de tejido conectivo. La viabilidad mediante tinción con azul de tripano fue superior a 90 %. Para los linfocitos intrahepáticos, primero se trituraron los hígados a través de una malla de acero inoxidable (tamaño 60, Sigma) y la suspensión celular se colocó en un tubo de 50 ml durante 5 minutos para permitir el descenso de los residuos celulares. Lentamente, 10 ml de preparación de linfocitos (*Lymphoprep*) (Ficoll, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega) se dispusieron en tubos de 50 ml en el mismo volumen de suspensión celular. Los tubos se centrifugaron después a 1800 rpm durante 18min. Las células en la interfaz se recogieron y se llevaron a tubos nuevos que se centrifugaron nuevamente a 1800 rpm durante 10 min para obtener un sedimento de células sin hepatocitos a un volumen final de 250 µl. Se recuperaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/hígado de ratón. La viabilidad de las células se detectó mediante tinción con azul de tripano.

25 **Aislamiento de adipocitos.** Se desmenuzó tejido adiposo (almohadilla de grasa visceral) y se incubó en tampón bicarbonato Krebs - Ringer (3 ml/g de tejido adiposo) que contenía glucosa 10 mM y albúmina de suero bovino al 2,5 %, se incubó con 840 U/g de colagenasa de tipo I (Sigma, Rehovot, Israel) a 37 °C con agitación suave durante 1 hora. Después, se filtró dos veces a través de una malla de gasa (100 µm) y se centrifugó 50 xg durante 5 minutos. Los adipocitos flotantes se separaron después del sedimento de la fracción de células vasculares estromales (VE). La fracción inferior se retiró y se centrifugó a 200 xg durante 5 minutos para que las células de la VE sedimentasen. Después, se efectuó un recuento celular.

35 **Análisis por citometría de flujo (FACS) para la determinación de diferentes subconjuntos de linfocitos.** Tras el aislamiento de linfocitos de la sangre, del bazo o de cualquier órgano, tres copias de  $2-5 \times 10^5$  células/PBS 500 µl se colocaron en tubos Falcon 2052, se incubaron con 4 ml de BSA al 1 % durante 10 minutos y se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 10 µl de FCS con anticuerpos primarios marcados 1:20 (marcados con FITC, CPA o PE) dirigidos contra los siguientes marcadores de linfocitos: CD3, CD4, CD8, NK1.1, CD25, FOX p3, células LAP, IL-17, Anexina y marcadores de superficie para la activación de células T. Las mezclas de anticuerpos y células se mezclaron cada 10 minutos durante 30 minutos. Las células se aislaron con anti-CD3 y anti-CD4, anti-CD8 y anti-NK1.1, respectivamente. Las células se lavaron dos veces en BSA al 1 % y se conservaron a 4 °C, hasta la lectura. Para el grupo control, solo se agregaron 5 µl de BSA al 1 %. La tinción superficial se realizó incubando las células con anticuerpos y anti-CD 16/32 (Fc en bloques, eBioscience) a 4 °C en tampón FACS que contenía PBS y BSA al 0,5 %, durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces más con tampón FACS, se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron por citometría de flujo. La clasificación analítica de las células se realizó en  $1 \times 10^4$  células de cada grupo con un clasificador celular activado por fluorescencia (FACStar Plus, Becton Dickinson). En todos experimentos se utilizaron controles de isotipo apropiados. El análisis se realizó con un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.). Solo se contaron las células vivas, y la fluorescencia residual se restó de los linfocitos no tratados con anticuerpos. Se establecieron selecciones en dispersiones directas y laterales para excluir las células muertas y los glóbulos rojos. Los datos se analizaron con los programas de gráfico de contorno bicolor Consort 30 (Becton Dickinson, Oxnard, CA, EE. UU.) o Cell Quest.

50 **Análisis FACS para la determinación del porcentaje de linfocitos NKT.** Inmediatamente después del aislamiento de los linfocitos, tres copias de  $2-5 \times 10^4$  células/PBS 500 µl se colocaron en tubos Falcon 2052, se incubaron con 4 ml de BSA al 1 % durante 10 minutos y se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos. Para la determinación del porcentaje de linfocitos NKT, se utilizaron anticuerpos anti-CD3 y anti DX5 (Pharmingen, EE. UU.). La clasificación analítica celular se realizó en  $1 \times 10^4$  células de cada grupo con un clasificador celular activado por fluorescencia (FACSTAE plus, Becton Dickinson). Solo se contaron las células vivas, y la fluorescencia residual se restó de los linfocitos no tratados con anticuerpos. Se establecieron selecciones en dispersiones directas y laterales para excluir las células muertas y los glóbulos rojos. Los datos se analizaron con los programas de gráfico de contorno bicolor Consort 30 (Becton Dickinson, Oxnard, CA, EE. UU.) o CELLQuest 25.

60 **Aislamiento de linfocitos NKT.** La separación de las células se realizó utilizando clasificación magnética celular (MACS, Miltenyi Biotec, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Para la separación de linfocitos NKT, se utilizaron perlas magnéticas anti-CD3 y anti-DX5. Las perlas se retiraron entre las dos etapas según las instrucciones del fabricante. Se obtuvo una precisión por encima de 95 % por análisis FACS de células.

65 **Daño hepatocelular.** La lesión hepática se evaluó mediante actividades en suero de la aspártico transaminasa

(AST) y alanina aminotransferasa (ALT), determinadas con un analizador automático.

**Mediciones.** Se midieron los siguientes parámetros: glucosa en sangre, colesterol total y triglicéridos. Los valores de glucosa en sangre se midieron con un glucómetro estándar. Los valores plasmáticos de colesterol total y triglicéridos se midieron con un analizador de química clínica, el instrumento Reflovet Plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

**Prueba de tolerancia a la glucosa.** Los ratones se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT, *glucose tolerance test*) el día 30 después de un ayuno nocturno. La glucosa se administró por vía oral (1,25 g por kg). Las mediciones de glucosa en suero se realizaron en sangre de la vena de la cola cada 15 minutos durante 3 horas. Los niveles de glucosa se midieron con un glucómetro estándar.

**Niveles matinales de glucosa.** Los grupos de estudio también se evaluaron con respecto a los niveles matinales de glucosa (no en ayunas) en reposo.

**Determinación de citocinas.** Los niveles de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  se determinaron en suero mediante ensayo ELISA de tipo "sándwich", utilizando kits comerciales (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). La insulina en suero también se determinó mediante ELISA de tipo "sándwich", utilizando el kit comercial de Mercodia AB (Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante.

**Estadísticas.** La significación estadística se determinó mediante la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes y solo se muestran valores de  $p < 0,05$ .

**Medición de triglicéridos.** El día indicado, los niveles de triglicéridos en suero se midieron utilizando un espectrofotómetro (Cobas DP-25P).

**Puntuación de esteatohepatitis hepática.** Para realizar el análisis histológico, un segmento de hígado de cada ratón se fijó en formaldehído al 10 % y se incluyó en parafina. Cinco secciones (5  $\mu$ m) se tiñeron con hematoxilina/eosina y dos patólogos las examinaron de manera oculta (*blinded*). El examen histológico y la puntuación del grado de esteatohepatitis (puntuación de EHNA) se realizaron utilizando el sistema de puntuación para la esteatohepatitis.

**Examen histológico.** Se realizó una tinción con hematoxilina/eosina de secciones de hígado incluidas en parafina. Dos patólogos experimentados (VD, YS), que desconocían las condiciones del experimento (*blinded*) examinaron las secciones.

#### **Ejemplo 4: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye las enzimas hepáticas.**

Los inventores evaluaron si los niveles de las enzimas hepáticas, que indican lesión hepática, de los animales a los que administró por vía oral la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS mejoraban debido al tratamiento. Los niveles de las actividades de la aspartil aminotransferasa (AST) y de la alanina aminotransferasa (ALT) se determinaron con un analizador de química clínica, Reflovet Plus (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania). La Figura 1 muestra que la disminución fue significativa para el grupo A AST frente al B (\*  $p < 0,001$ ). Esto demuestra mejoría de la lesión hepática, como se pone de manifiesto a través de una clara y significativa disminución en los niveles en suero de ALT y AST frente al grupo control.

#### **Ejemplo 5. La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+ en el hígado.**

**Aislamiento de linfocitos intrahepáticos.** Después de sacrificar a los ratones, los linfocitos intrahepáticos se aislaron de la siguiente manera: después de extirpar los hígados, estos se mantuvieron en medio (RPMI-1640+FCS). Después, los hígados se trituraron a través de una malla de acero inoxidable (tamaño 60, Sigma) y la suspensión celular se colocó en un tubo de 50 ml durante 5 min. La preparación de linfocitos (*Lymphoprep*) (10 ml, Ficoll, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega) se dispuso en tubos de 50 ml en un volumen similar de suspensión celular. Los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 18min. Las células en la interfaz se recogieron y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min, hasta obtener un sedimento de células sin hepatocitos a un volumen final de 250  $\mu$ l. Se recuperaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/hígado de ratón y se analizaron por citometría de flujo.

**Citometría de flujo.** La tinción superficial con dos a tres colores de las células se realizó con los siguientes anticuerpos de superficie: anti-CD4-FITC y anti-CD25-PE. (Los anticuerpos se adquirieron en eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.). La tinción superficial se realizó incubando células recién aisladas con anticuerpos y anti-CD 16/32 (Fc en bloques, eBioscience) a 4 °C en tampón FACS que contenía PBS y BSA al 0,5 % durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS, se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron por citometría de flujo. En todos los experimentos se utilizaron controles de isotipo apropiados. El análisis se realizó con un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.) con el programa informático FCS express

V.3 (programa informático DeNovo, Los Ángeles, CA, EE. UU.).

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de la t de Student. Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0,05$ .

5 Para determinar la especificidad del aumento de las células T reguladoras en el hígado se midió la expresión de superficie promedio de marcadores (CD4+CD25+) en linfocitos hepáticos por citometría de flujo el día 7 (día del sacrificio) en todos los ratones tratados con 3,0 mg de preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS. La Figura 2A demuestra que la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de las células T reguladoras CD4+CD25+ en el hígado. La selección fue en CD4 y los valores son medias  $\pm$  DT

15 En la Figura 2B se muestra una transferencia puntual representativa procedente de análisis FACS realizado en linfocitos aislados de los hígados de ratones tratados con la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS (grupo B) o de controles no tratados (grupo A), que muestra que la preparación oral de la inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+ en el hígado.

20 **Ejemplo 6: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+LAP-, CD45+LAP+ y CD3+LAP+ en el hígado.**

El aislamiento de los linfocitos intrahepáticos y el análisis FACS se realizaron como se ha descrito anteriormente

25 **Citometría de flujo.** Para tinción de LAP se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD3-Alexa-fluor 405, anti-CD45-PerCP-Cy5.5 y anti-LAP-CPA. El anticuerpo policlonal específico de cabra anti-LAP biotinilado y purificado por afinidad se adquirió en R&D Systems (Minneapolis, MN, EE. UU.), y la estreptavidina-CPA se utilizó como reactivo secundario para detectar el anticuerpo primario biotinilado (R&D). Para la tinción de LAP, las células se incubaron previamente con anticuerpo LAP/control durante 20 min y se tiñeron con CD3-Alexa-fluor 405 o CD45-PerCP-Cy5.5, seguido de tinción con estreptavidina-CPA.

30 Para determinar si la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS promueve las células Tregs, los inventores examinaron el efecto de la administración oral en los subconjuntos de células T reguladoras procedentes de tejido. La Figura 3 muestra la expresión de superficie promedio de marcadores (CD25+CD4+LAP-, CD45+LAP+ y CD3+LAP+) en linfocitos hepáticos medida utilizando citometría de flujo el día 7 (día del sacrificio) en todos los ratones tratados con 3,0 mg. Los valores son medias. Las Figuras 3A y B demuestran que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta un subconjunto de células T reguladoras CD25+CD4+LAP-, CD45+LAP+ y CD3+LAP+ en el hígado.

40 **Ejemplo 7: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD45+LAP+ y CD8+LAP+ en el bazo.**

45 Para determinar si la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS promueve las células Tregs, los inventores examinaron el efecto de la administración oral en los subconjuntos de células T reguladoras procedentes de tejido en el bazo. La Figura 4 muestra la expresión de superficie promedio de marcadores (CD45+LAP+ y CD8+LAP+) en linfocitos esplénicos medida utilizando citometría de flujo el día 7 (día de sacrificio) en todos los ratones tratados con 3,0 mg. Los valores son medias  $\pm$  DT. Las Figuras 4A y B demuestran que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta un subconjunto de células T reguladoras CD45+LAP+ y CD8+LAP+ en el bazo.

50 **Ejemplo 8: Administración oral de calostro enriquecido con anticuerpos anti-LPS a ratones Ob/Ob**

55 **Grupos experimentales.** Se estudiaron tres grupos de ratones (Tabla 2). Se alimentaron (PO) ratones Ob/Ob (4 por grupo) diariamente durante 25 días (5 días a la semana) con 30 ul de PBS (control, grupo A) o con 30 ul (=100 ug) de calostro de T-IgG (grupo B) que se disolvió en agua, o con 30 ul (=100 ug) de preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS (grupo C). Después de 4 semanas, los ratones se sacrificaron. El día de sacrificio, se extrajo sangre cardiaca por técnicas estándar y después se obtuvo suero.

**Tabla 2: Diseño Experimental**

Grupo	PBS	T-IgG	CBHI
A N=4	30ul	-	-

<b>B</b> N=4	-	100 ug/ml	-
<b>C</b> N=4	-	-	100 ug/ml

**Animales.** Para el modelo Ob/Ob, se utilizaron ratones macho C57BL/6 Ob/Ob jóvenes (de 6 a 7 semanas de vida) adquiridos en Harlan Laboratories (EE. UU.). Todos los ratones se mantuvieron en el Centro para Animales de la Facultad de medicina de la Universidad Hebrea de Hadassah. A los ratones se les administró pienso de laboratorio estándar y agua a voluntad y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los experimentos con animales se llevaron a cabo según las directrices del Comité de asuntos institucionales de la Universidad Hebrea de Hadassah para el cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité.

#### **Ejemplo 9: La T-IgG oral disminuye la insulina del suero en ratones Ob/Ob.**

Para evaluar adicionalmente el efecto de la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS, se determinaron los niveles de insulina en suero en ayunas en ratones de los grupos A-C después de cuatro semanas de T-IgG o CBHI administrados por vía oral. La insulina en suero se determinó por ensayo ELISA de tipo "sándwich", utilizando el kit comercial de Mercodia AB (Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Se recogieron sueros de ratones Ob/Ob el día 30 después de sacrificar a los ratones. La Figura 5 demuestra que los ratones a los que se había administrado T-IgG presentaban una disminución en los niveles de insulina en suero, lo que indica el impacto beneficioso de los anticuerpos anti LPS sobre la resistencia a la insulina. Por otra parte, la disminución observada proporciona datos que confirman un importante papel de los adyuvantes procedentes de calostro en el efecto metabólico.

#### **Ejemplo 10: La preparación oral inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye la tolerancia a la glucosa en ratones Ob/Ob.**

Para examinar si la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS puede disminuir los niveles de glucosa en suero, los ratones Ob/Ob se sometieron una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) el día 30 después de un ayuno nocturno. La glucosa se administró por vía oral (1,25 g por kg). Las mediciones de la glucosa en suero se realizaron en sangre de la vena de la cola cada 15 minutos durante 3 horas. Los niveles de glucosa se midieron con un glucómetro estándar.

Como se muestra en la Figura 6, los ratones a los que se les había administrado CBHI mejoraron la tolerancia a la glucosa, demostrado por valores más bajos de glucosa en la prueba de tolerancia a la glucosa con una disminución en el área bajo la curva en comparación con el grupo control. Tomados en conjunto, los datos obtenidos en los Ejemplos 9 y 10 confirman la importancia de CBHI según la presente invención en la mejora del síndrome metabólico.

#### **Ejemplo 11. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye la lesión hepática en ratones Ob/Ob.**

Una vez demostrado que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS mejoraba diversos marcadores del síndrome metabólico, tales como la disminución de la tolerancia a la glucosa y la disminución de la insulina en suero, los inventores evaluaron a continuación si los niveles de enzimas hepáticas, que indican lesión hepática, de animales alimentados con la preparación, también habían mejorado gracias al tratamiento. Los niveles de las actividades de AST y ALT se determinaron mediante un analizador de química clínica, Reflovet Plus (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania). La Figura 7 demuestra una disminución de los niveles de ALT y AST en ratones tratados con calostro-T-IgG.

#### **Ejemplo 12. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye los TG hepáticos en ratones Ob/Ob.**

Una vez demostrado que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS mejoraba diversos marcadores del síndrome metabólico, al final del estudio se determinó el efecto de la administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS y de calostros T-IgG sobre la acumulación de triglicéridos hepáticos después de sacrificar a los ratones. La acumulación de triglicéridos (TG) intracelulares en el hígado se cuantificó utilizando una modificación del método de Folch. Los TG se extrajeron de alícuotas de hígados congelados instantáneamente y después se analizaron espectrofotométricamente utilizando el kit GPO-Trinder (Sigma, Rehovot, Israel) y se normalizaron al contenido de proteínas en el homogeneizado. El contenido de triglicéridos hepáticos se calculó en todos los grupos tratados y en los de control.

La Figura 8 demuestra que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye el contenido de triglicéridos hepáticos en comparación con ratones en el grupo control. La disminución fue significativa para el grupo tratado con CBHI en comparación con los controles (\* P<0,04).

5 **Ejemplo 13. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD3+LAP+ en el bazo.**

10 Para determinar si la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS promueve las células Tregs, los inventores examinaron el efecto de la administración oral en subconjuntos de células T reguladoras procedentes de tejido en el bazo. La Figura 9 muestra la expresión de superficie promedio de marcadores (CD3+LAP+) en linfocitos esplénicos medida por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en ratones Ob/Ob. Los valores son medias  $\pm$  DT. Las Figuras 9A y B demuestran que la administración oral de T-IgG aumenta un subconjunto de células T reguladoras CD3+LAP+ en el bazo.

15 **Ejemplo 14. La administración oral de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD8+CD25+ en el bazo**

20 Para determinar si la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS promueve las células Tregs, los inventores examinaron el efecto de la administración oral de subconjuntos de células de T reguladoras procedentes de tejido en el bazo. El aislamiento de linfocitos esplénicos, los procedimientos de citometría de flujo y los análisis y tinción con anticuerpos son los mismos que los descritos anteriormente. Las Figuras 10 y 11 muestran la expresión de superficie promedio de marcadores (CD8+ CD25+) en linfocitos esplénicos medidas por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en ratones Ob/Ob. Los valores son medias  $\pm$  DT.

25 Las Figuras 10 y 11 demuestran que la administración oral de T-IgG aumenta un subconjunto de células de T reguladoras CD8+ CD25+ en el bazo.

30 **Ejemplo 15. La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+ en el tejido adiposo.**

35 Para determinar si la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS promueve las células Tregs en tejido adiposo, los inventores examinaron el efecto de la administración oral en subconjuntos de células de T reguladoras procedentes de tejido. Se realizó un análisis FACS en linfocitos aislados de tejido adiposo. El tejido adiposo se aisló de ratones Ob/Ob inmediatamente después del sacrificio. Los tejidos (almohadilla de grasa visceral) se desmenuzaron en trozos finos. Las muestras desmenuzadas se colocaron en tampón bicarbonato Krebs-Ringer (3 ml/g de tejido adiposo) que contenía glucosa 10 mM y albúmina de suero bovino al 2,5 % y se incubaron con 840 U/g de colagenasa de tipo I (Sigma, Rehovot, Israel) a 37 °C durante 1 hora. Las células se filtraron dos veces a través de una malla de gasa (100  $\mu$ m) y se centrifugó a 50 g durante 5 min. Los adipocitos flotantes se separaron del sedimento de la fracción de células vasculares estromales (VE) asociada al tejido adiposo. La fracción inferior se retiró y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos para que las células VE sedimentasen. Las Figuras 12A y 12B muestran la expresión de superficie promedio de marcadores (CD4+CD25+) en linfocitos de tejido adiposo medida por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en todos los ratones Ob/Ob.

45 La Figura 12 demuestra que la administración oral de T-IgG aumenta un subconjunto de células T reguladoras CD4+CD25+ en el tejido adiposo.

**Ejemplo 16. La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD3+ LAP+ en el tejido adiposo.**

50 Para determinar si la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS promueve las células Tregs en tejido adiposo, los inventores examinaron el efecto de la administración oral en subconjuntos de células de T reguladoras procedentes de tejido. Se realizó un análisis FACS en linfocitos aislados de tejido adiposo aislados según el método indicado anteriormente. Las Figuras 13A y 13B muestran la expresión de superficie promedio de marcadores (CD3+ LAP+) en linfocitos del tejido adiposo medida por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en todos los ratones Ob/Ob.

La Figura 13 demuestra que la administración oral de T-IgG aumenta un subconjunto de células de T reguladoras CD3+LAP+ en el tejido adiposo.

60 **Ejemplo 17: La preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS aumenta la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+ en células vasculares estromales (que contienen preadipocitos)**

65 Para determinar si la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS promueve las células Tregs en el tejido adiposo, los inventores examinaron el efecto de la administración oral en subconjuntos de células T reguladoras procedentes de tejido. Se realizó un análisis FACS en linfocitos aislados de

células vasculares estromales que contienen preadipocitos aislados según el método indicado anteriormente.

Las Figuras 14A y 14B muestran la expresión de superficie promedio de los marcadores (CD4+CD25+) en linfocitos del tejido adiposo, medida por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en todos los ratones Ob/Ob.

5 La Figura 14 demuestra que la administración oral de T-IgG aumenta un subconjunto de células T reguladoras CD4+CD25+ en células vasculares estromales que contienen preadipocitos.

10 Para investigar adicionalmente esta población de células, se realizó un análisis FACS en linfocitos aislados de células vasculares estromales para examinar la expresión de marcadores (CD4+CD25+LAP+) (el día 25 (día del sacrificio) en todos los ratones ob/ob)

15 Las Figuras 15A y 15B muestran la expresión superficial promedio de los marcadores (CD4+CD25+LAP+) en los linfocitos del tejido adiposo medidos mediante citometría de flujo el día 25 (día de sacrificio) en los ratones Ob/Ob.

La Figura 15 demuestra que la administración oral de T-IgG aumenta un subconjunto de células T reguladoras CD4+CD25+ en las células vasculares estromales que contienen preadipocitos.

20 **Ejemplo 18: Estudios de dosificación de la preparación de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS en ratones Ob/Ob**

**Tabla 3: Diseño Experimental**

Grupo	PBS	T-IgG	T-IgG	T-IgG	T-IgG	CBHI
<b>A</b> N=5	30 ul	-	-	-	-	-
<b>B</b> N=5	-	1 ug	-	-	-	-
<b>C</b> N=5	-	-	100 ug	-	-	-
<b>D</b> N=5	-	-	-	1 mg	-	-
<b>E</b> N=5	-	-	-	-	3 mg	-
<b>F</b> N=5	-	-	-	-	-	100 ug

25 **Grupos experimentales.** Se estudiaron seis grupos de ratones (Tabla 3). Se alimentaron (PO) ratones Ob/Ob (5 por grupo) diariamente durante 25 días (5 días a la semana) con 30 ul de PBS (control, grupo A) o con 30 ul (=1 ug) de calostro de T-IgG (grupo B) o con 30 ul (=100 ug) de calostro de T-IgG (grupo C) o con 30 ul (=1 mg) de calostro de T-IgG (Grupo D) o con 30 ul (=3mg) de calostro de T-IgG (Grupo E) o con 30 ul (=100 ug) de calostro CBHI (Grupo F). Ambas preparaciones de calostro se disolvieron en agua.

30 Después de 4 semanas, los ratones se sacrificaron. El día del sacrificio, se extrajo sangre cardiaca por técnicas estándar y después se obtuvo suero para fines futuros.

35 **Animales.** Para el modelo Ob/Ob, se utilizaron ratones macho C57BL/6 Ob/Ob jóvenes (de 6 a 7 semanas de vida) que se adquirieron en Harlan Laboratories (EE. UU.). Todos los ratones se mantuvieron en el Centro para Animales de la Facultad de medicina de la Universidad Hebrea de Hadassah. A los ratones se les administró pienso de laboratorio estándar y agua a voluntad, y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los experimentos con animales se llevaron a cabo según las directrices del Comité de asuntos institucionales de la Universidad Hebrea de Hadassah para el cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité.

40 **Ejemplo 19: La administración oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS**

**disminuye las enzimas hepáticas en ratones Ob/Ob.**

Los niveles de las actividades de AST y ALT se determinaron mediante un analizador de química clínica, como se describe anteriormente. La Figura 16 demuestra que 1 mg de T-IgG fue la dosis más eficaz en la disminución de las enzimas hepáticas.

**Ejemplo 20: La administración oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye el colesterol total en ratones Ob/Ob.**

El colesterol total y los triglicéridos plasmáticos se determinaron con un analizador de química clínica, Reflovet Plus (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania) como se describe anteriormente. La Figura 17 demuestra que 100 ug de T-IgG fue la dosis más eficaz en la disminución del colesterol total.

**Ejemplo 21: La administración oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS disminuye los TG hepáticos en ratones Ob/Ob.**

La acumulación de triglicéridos (TG) intracelulares en el hígado se cuantificó utilizando una modificación del método de Folch. Los TG se extrajeron de alícuotas de hígados congelados instantáneamente y, después, se analizaron espectrofotométricamente utilizando el kit GPO- Trinder (Sigma, Rehovot, Israel) y se normalizaron al contenido de proteínas en el homogeneizado.

La Figura 18 demuestra que 100 ug de 1 mg, 3 mg y 100 ug de T-IgG fue la dosis más eficaz en la disminución de los triglicéridos hepáticos. La disminución fue estadísticamente significativa para el grupo A en comparación con los grupos D, E, F (\* p<0,05).

**Ejemplo 22: La administración oral de 1 ug, 1 mg, 3 mg de T-IgG, junto con 100 ug de CBHI disminuye las células CD3+ NK1.1+ en los hígados de ratones Ob/Ob.**

Se realizó un análisis FACS en linfocitos aislados de hígados de los ratones Ob/Ob. El promedio de expresión de marcadores (CD3+NK1.1+) en linfocitos hepáticos se midió utilizando citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en todos los ratones ob/ob. Para la citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD3-FITC y anti NK1.1-PE. La tinción superficial y el análisis FACS se realizó como se ha descrito anteriormente.

La Figura 19A demuestra que la administración oral de 1 ug, 1 mg, 3 mg de T-IgG, junto con 100 ug de CBHI, disminuye las células CD3+NK1.1+ en los hígados de ratones Ob/Ob. Por otro lado, la Figura 19B demuestra que la administración oral de 1 ug y 100 ug de T-IgG disminuye las células CD3+NK1.1+ en los hígados de ratones Ob/Ob.

**Ejemplo 23: La administración oral de calostros T-IgG y CBHI aumenta las células CD4+CD25+LAP-/LAP+ en los hígados de ratones Ob/Ob.**

Para determinar las dosificaciones de la preparación oral de inmunoglobulina procedente de calostro enriquecida con anti-LPS que promueven las Tregs en los hígados, los inventores examinaron el efecto de la administración oral en los subconjuntos de células T reguladoras procedentes de tejido. El análisis FACS se realizó en linfocitos aislados de hígados según el método indicado anteriormente. Se realizó un análisis FACS en linfocitos aislados de hígados de los ratones Ob/Ob. La Figura 20 muestra el promedio de expresión de marcadores (en linfocitos hepáticos se midió utilizando citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio)) en todos los ratones ob/ob.

La Figura 20A demuestra que la administración oral de calostros T-IgG y CBHI, aumenta las células CD4+CD25+LAP-/LAP+ en los hígados de ratones Ob/Ob. La Figura 20B demuestra que la administración oral de 100 ug de calostro CBHI, aumenta las células CD4+CD25+LAP+ en los hígados de ratones Ob/Ob.

**Ejemplo 24: La administración oral de calostros T-IgG y CBHI induce cambios en linfocitos hepáticos CD25+LAP-**

La Figura 21 demuestra que la administración oral de 1 ug, 1 mg, 3mg de T-IgG, junto con 100 ug de CBHI, induce cambios en linfocitos CD25+LAP- en los hígados de ratones Ob/Ob.

**Ejemplo 25: La administración oral de calostros T-IgG y CBHI induce cambios en linfocitos esplénicos CD25+LAP+**

La Figura 22A demuestra que la administración de calostros T-IgG y CBHI disminuye los linfocitos esplénicos CD25+LAP+. La Figura 22B demuestra que la administración oral de calostros T-IgG aumenta los linfocitos esplénicos. CD25+LAP+.

**Ejemplo 26: La administración oral de 1 y 3 mg de calostros T-IgG y de 100 ug de calostros CBHI aumenta los linfocitos esplénicos CD4+CD25+LAP-.**

Se realizó un análisis FACS en linfocitos aislados de hígados de ratones Ob/Ob. La Figura 23 demuestra el promedio de expresión de marcadores (CD4+CD25+LAP-) en linfocitos esplénicos, medido por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en todos los ratones ob/ob. La Figura 23 demuestra que la administración oral de 1 y 3 mg de calostros de T-IgG y de 100 ug de calostro CBHI aumenta los linfocitos esplénicos CD4+CD25+LAP-

**Ejemplo 27: La administración oral de calostros de T-IgG aumenta los linfocitos CD4+CD25+ en el tejido adiposo.**

Se realizó un análisis FACS en linfocitos aislados de tejido adiposo de ratones Ob/Ob, como se describe anteriormente. La Figura 24 demuestra el promedio de expresión de los marcadores (CD4+CD25+) en células de tejido adiposo, medido por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en todos los ratones ob/ob. La Figura 24 demuestra que la administración oral de calostro de T-IgG aumenta los linfocitos CD4+CD25+ en el tejido adiposo.

**Ejemplo 28: La administración oral de 100 ug de calostro de T-IgG aumenta CD4+CD25+ en los adipocitos.**

Se realizó un análisis FACS en adipocitos aislados de tejido adiposo de ratones Ob/Ob, como se describe anteriormente. La Figura 25A demuestra el promedio de expresión de marcadores (CD4+CD25+) en adipocitos, medido por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en todos los ratones ob/ob. La Figura 25A demuestra que la administración de 100 ug de calostro de T-IgG aumenta CD4+CD25+ en adipocitos. La Figura 25B demuestra que la administración oral de 100 ug de calostro de T-IgG aumenta CD4+CD25+ en adipocitos.

**Ejemplo 29: La administración oral de calostro de T-IgG aumenta CD3+LAP+ en adipocitos.**

Se realizó un análisis FACS en adipocitos aislados de tejido adiposo de ratones Ob/Ob, como se describe anteriormente. La Figura 26 demuestra el promedio de expresión de marcadores (CD3+LAP+) en adipocitos, medido por citometría de flujo el día 25 (día del sacrificio) en ratones ob/ob.

La Figura 26A demuestra que la administración oral de calostro de T-IgG aumenta CD3+LAP+ en adipocitos. La Figura 26B demuestra que la administración oral de calostro de T-IgG aumenta CD3+LAP+ en adipocitos.

**Ejemplo 30: La administración oral de calostro de T-IgG aumenta CD4+CD25+LAP- en adipocitos.**

La Figura 27A demuestra que la administración de calostro de T-IgG aumenta CD4+CD25+LAP- en adipocitos.

**Ejemplo 31: La administración oral de calostro enriquecido con anti-LPS disminuye la translocación bacteriana en un modelo de hepatitis.**

Para examinar la hepatitis y la translocación bacteriana, se trataron grupos de ratones de la siguiente manera: Grupo A: tratados con calostro CBP sin anticuerpo; Grupo B: tratados con calostro que contiene anti-LPS. Los ratones se alimentaron con calostro durante 4 días antes de la inducción de la hepatitis con Con A.

*Administración de Con A y medición de las actividades de transaminasa en suero*

Se adquirió Con A en MP Biomedicals (Ohio, EE. UU.). Se disolvió Con A (0,5 mg, 20 mg/kg) en 200 ul de Tris 50 mM (pH 7), NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM y se inyectó por vía intravenosa en los ratones. Los sueros de ratones individuales se obtuvieron 8 o 20 horas después de la inyección de Con A. Las actividades en suero de la alanina aminotransferasa (ALT) y de la aspartato aminotransferasa (AST) se midieron utilizando un analizador automático.

Para evaluar la translocación bacteriana, se midieron los niveles de lipopolisacárido (LPS) utilizando el ensayo cromogénico de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL); el ensayo LAL es una medida del grado de translocación bacteriana. La Tabla 4 demuestra que la administración oral de calostro anti-LPS disminuye la translocación bacteriana, como se muestra por una disminución en los niveles promedio de LAL.

**Tabla 4**

		Promedio	Desv. típica	Valor de P
<b>Grupo A</b>	ConA + CBP	1,52	0,75	0,37
<b>Grupo B</b>	ConA + calostro LPS	1,18	0,30	

Cabe destacar que, como se muestra en la Tabla 5, la translocación bacteriana reducida se asoció a una mejora en la enzima hepática ALT, que es un marcador de daño hepático.

Tabla 5

		ALT	Promedio	Desv. típica
<b>Grupo A</b>	<b>A1</b>	28.170		
<b>ConA + CBP</b>	<b>A2</b>	857,6		
	<b>A3</b>	1356,8		
	<b>A4</b>	340,8		
	<b>A5</b>	26.340		
			<b>11.413,04</b>	14.480,59
<b>Grupo B</b>	<b>B1</b>	10.992		
<b>ConA+T-IgG</b>	<b>B2</b>	796,8		
	<b>B3</b>	187,2		
	<b>B4</b>	2816		
	<b>B5</b>	12.672		
			<b>5492,8</b>	5898,076

5 **Ejemplo 32: Preparación de composiciones que contienen preparaciones enriquecidas con anti-LPS procedente de calostro y anticuerpos anti-insulina.**

10 Para preparar la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS se extrajo el calostro de aproximadamente 200 rebaños de vacas lecheras comerciales. Las vacas de estos rebaños, además de haberse vacunado contra patógenos habituales del ganado, se habían vacunado con una vacuna contra los antígenos de la pared celular externa de múltiples cepas de bacterias de *E. coli*, un organismo principal presente en la microflora del intestino humano. Para preparar la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-insulina, tres vacas lecheras se inmunizaron con insulina conjugada a KLH, la cual se utilizó como antígeno. Las vacunas de antígeno se administraron durante las ocho últimas semanas de gestación. La leche con calostro se recogió durante los dos primeros días de lactancia. El calostro obtenido se congeló en bolsitas individuales para el ensayo. Para el procesamiento, el calostro se descongeló, se agrupó y se retiró la grasa. Cada lote se pasteurizó. El calostro se concentró por ultrafiltración para reducir el volumen antes de la liofilización. La etapa de ultrafiltración reduce la lactosa en el polvo final a menos del 7 % (de aproximadamente 50 %).

20 La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS y la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-insulina se mezclaron para formar una composición para su uso como se describe a continuación. Para el modelo de hepatitis mediada por el sistema inmunitario, ratones macho C57/bl de once a doce semanas de vida recibieron una inyección en la vena de la cola de una dosis de 500 µg/ratón (aproximadamente 15 mg/kg) de Con A (MP Biomedicals, EE. UU.) que se disolvió en Trig 50mM pH 7, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, que se sabe que induce la hepatitis. A los animales de todos los grupos de ensayo se les administraron por vía oral (por ej, por sonda nasogástrica) diferentes concentraciones de la composición que contenía las preparaciones de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS y anti-insulina y se comparó con controles no tratados. Los animales de todos los grupos de ensayo recibieron un seguimiento de los siguientes parámetros: niveles en suero de aspartato aminotransferasa (AST) y de alanina aminotransferasa (ALT), examen histológico de muestras de hígado, análisis FACS de linfocitos intrahepáticos e intraesplénicos para marcadores de NKT, medición de niveles de TG, colesterol total, tolerancia a la glucosa, insulina en suero, glucosa en suero, niveles de citocinas y análisis de transferencia Western para la expresión de los factores de transcripción STAT 1, 4 y 6 y NFκB, y se compararon con grupos control.

**Ejemplo 33. Ensayo clínico en Fase I/II**

35 Como se divulga en el presente documento, la preparación de inmunoglobulina anti-LPS puede ejercer un efecto inmunomodulador y aliviar los daños producidos en órganos diana en modelos animales. Se realizó un estudio para determinar la seguridad y eficacia de la administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS a pacientes con resistencia a la insulina y EHNA.

40 **DISEÑO DEL ESTUDIO**

45 Para evaluar el efecto de 4 semanas de la administración de CBP de control (CBPC) o de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS, o de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (preparaciones CBHI) sobre las enzimas hepáticas séricas y el síndrome metabólico en pacientes con EHNA se realizó un ensayo clínico exploratorio, previo y posterior, sin ocultación, con dos grupos. Los candidatos se identificaron de entre los pacientes tratados en el departamento de medicina y en la unidad hepática del centro médico de la Universidad Hebrea de

Hadassah y firmaron un consentimiento informado aprobado desde antes de que se iniciasen las actividades del estudio. Los participantes se asignaron al azar recibir ya sea calostro bobino de control (CBPC) (30 pacientes) o la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (20 pacientes). Se realizó un seguimiento de los pacientes en estudio con visitas semanales, así como durante 4 semanas más después de concluir el tratamiento para evaluar la seguridad.

5

## 1. SELECCIÓN E INSCRIPCIÓN DE LOS SUJETOS

### 1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1.1.1. EHNA demostrada por biopsia (puntuación NAS  $\geq$  4)

10 1.1.2. Niveles de ALT en suero  $\geq$  30 (U/l)

1.1.3. Edad de 18 a 80

1.1.4. Tratamiento de la diabetes durante hasta 2 medicaciones por vía oral, con dosis estables durante 2 meses.

15 1.1.5. Si mantiene relaciones sexuales que pueden llevar al embarazo, el voluntario que participa en el estudio debe estar de acuerdo en utilizar dos métodos anticonceptivos fiables simultáneamente mientras que está recibiendo la medicación especificada en el protocolo y durante 1 mes después de suspender la medicación.

NOTA: Los métodos basados en hormonas no son suficientes por sí solos. DEBEN utilizarse apropiadamente al menos dos de los siguientes métodos, a menos que se justifique menopausia, esterilización o azoospermia:

20 -Preservativos (masculinos o femeninos) con o sin agente espermicida. Se recomiendan los preservativos porque su uso apropiado es el único método anticonceptivo eficaz para la prevención de la transmisión del VIH.

-Diafragma o capuchón cervical con espermicida

-DIU

25

-Anticoncepción hormonal

Los sujetos sin potencial reproductor que participan en el estudio (niñas que no han comenzado la menstruación o mujeres que han sido posmenopáusicas durante al menos 24 meses consecutivos o que se han sometido a histerectomía y/u ooforectomía bilateral) son aptos sin requerir el uso de anticonceptivos. Se requiere documentación por escrito u oral comunicada por el personal médico o por el médico mediante cualquiera de los siguientes:

30

- Informe médico/carta

- Informe operativo u otra fuente de documentación en el registro del paciente (se requiere un informe de laboratorio de la azoospermia para documentar una vasectomía satisfactoria)

35 - Resumen del alta

- Informe de laboratorio de la azoospermia

-Medición de FSH elevada en la gama de menopausia según lo establecido por el laboratorio del informe.

1.1.6. Capacidad y voluntad del sujeto o tutor/representante legal de proporcionar el consentimiento informado.

40

### a. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

i. Embarazo o lactancia

ii. Consumo ininterrumpido de los siguientes medicamentos durante más de 3 días en los 30 días del ingreso al estudio:

45

1. inmunosupresores

2. inmunomoduladores

3. glucocorticoides sistémicos

4. agentes antineoplásicos

50

iii. Consumo activo de drogas o alcohol o dependencia que, en opinión del investigador, pueda interferir con el cumplimiento de los requisitos del estudio

iv. Enfermedad grave que requiera tratamiento sistémico y/u hospitalización en los 30 días antes del ingreso

v. Cirugía en los 3 meses anteriores

vi. Una enfermedad infecciosa, cardíaca, pulmonar o nefrológica grave

55

vii. Ser alérgico a la leche de vaca o intolerancia a la lactosa

## 2. TRATAMIENTO DEL ESTUDIO

### a. RÉGIMEN, ADMINISTRACIÓN Y DURACIÓN

60

i. *Régimen de tratamiento según protocolo*

Los sujetos recibieron tratamiento con control CBP 1,8 gramos (3 x cápsulas de 200 mg), con preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) 1,8 g diarios (3 x cápsulas de 200 mg, tres veces al día) o con preparación de inmunoglobulina anti-insulina 600 mg diarios (2 x cápsulas de 100 mg, tres veces al día) durante 4 semanas y después se supervisó el tratamiento del estudio durante 4 semanas más.

65

ii. *Modificaciones del tratamiento del estudio*

No se permitieron reducciones de la dosis. Todas las modificaciones de los fármacos del estudio se documentaron y se registraron.

5 b. FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DEL PRODUCTO DEL ESTUDIO

El medicamento del estudio se suministró en comprimidos envasados individualmente en blíster.

10 Para la preparación de la inmunoglobulina anti-LPS, cada comprimido de 200 mg contiene 200 mg de CBP liofilizado obtenido de vacas inmunizadas con LPS como el único componente activo en combinación con excipientes, incluyendo sílice coloidal anhidra, estearato de magnesio, celulosa microcristalina y carbonato de calcio. El producto puede conservarse a temperatura ambiente y tiene una fecha de caducidad de 5 años.

15 Para la preparación de la inmunoglobulina anti-insulina, cada comprimido de 100 mg contiene 100 mg de CBP liofilizado obtenido de vacas inmunizadas con insulina como el único componente activo en combinación con excipientes, incluyendo sílice coloidal anhidra, estearato de magnesio, celulosa microcristalina y carbonato de calcio. El producto puede conservarse a temperatura ambiente y tiene una fecha de caducidad de 5 años.

20 c. FARMACIA: SUMINISTRO, DISTRIBUCIÓN Y RESPONSABILIDAD DEL PRODUCTO

i. *Adquisición/distribución del producto del estudio*

Las composiciones fueron conservadas y dispensadas por las farmacias de investigación del centro médico de la Universidad Hebrea de Hadassah.

25

ii. *Responsabilidad del producto del estudio*

El farmacéutico está obligado a mantener registros completos de todos los productos del estudio.

30 d. MEDICAMENTOS CONCOMITANTES

i. *Pautas generales*

35 No existen restricciones impuestas por el protocolo específicas sobre las medicaciones concomitantes, que no sean las estipuladas en los criterios de inclusión/exclusión. Sin embargo, al iniciar una medicación o un agente de estudio concomitante, o al cambiar una dosis, los investigadores revisaron los prospectos más recientes de los medicamentos y agentes de estudio concomitantes, folletos de investigación o información actualizada de fuentes en línea para obtener la información más actualizada sobre interacciones de fármacos, contraindicaciones y precauciones.

40

ii. *Medicamentos prohibidos*

45 Uso de los siguientes medicamentos durante más de 3 días en los 30 días del ingreso al estudio: insulina, inmunosupresores, inmunomoduladores, agentes antineoplásicos, glucocorticoides.

45

e. EVALUACION DEL CUMPLIMIENTO

En cada visita, se preguntó a los participantes acerca de la cantidad de dosis de la medicación del estudio que no habían tomado desde la última visita.

50

**3. EVALUACIONES CLÍNICAS Y DE LABORATORIO**

a. CALENDARIO DE ACONTECIMIENTOS

55 Véase la Tabla 6

Evaluación preclínica del sujeto: consentimiento y evaluación preclínica (exploración)

60 Para cada sujeto candidato se había programado una visita de exploración. En la visita de exploración, el investigador (o investigadores) explicó el estudio con detalle, respondió a todas las dudas que pudiese tener el candidato y dio al candidato un formulario de consentimiento para que lo leyera y lo firmase. Después de firmar el formulario de consentimiento, se solicitó al sujeto candidato que proporcionara un historial clínico completo y se sometiese a un examen físico, incluida una medición de la presión arterial, el pulso, la temperatura, el peso corporal y la altura.

65

Se extrajo sangre para obtener un hemograma completo (CBC) y realizar otros análisis de laboratorio. (Véase la

Tabla 6). Se recogió el suero y se archivó para su uso en el desarrollo de marcadores indirectos. Las mujeres con posibilidad de quedar embarazadas se sometieron a una prueba de embarazo. El historial de la medicación de los sujetos se evaluó para determinar que tanto la propia medicación como el régimen de dosis de la misma estaban dentro de los criterios de inclusión.

5 Los pacientes se asignaron al azar a los diferentes grupos de tratamiento (CBPC, preparación de inmunoglobulina anti-LPS o preparación de inmunoglobulina anti-insulina).

10 Los resultados de las pruebas de diagnóstico rutinarias obtenidos durante la evaluación previa al tratamiento o durante el transcurso de proyecto de investigación estarán disponibles para el médico de atención primaria del sujeto después de la recepción por el investigador principal de un consentimiento firmado por escrito del sujeto candidato.

#### Incorporación e inscripción al ensayo clínico: pautas de medicación

15 En la visita inicial después de una determinación de que un objeto es elegible para incorporarse al ensayo clínico (día cero), se instruyó al sujeto sobre la forma en la que debían tomarse los componentes del fármaco del estudio. Después de ello, el sujeto visitó al médico los días 7, 14, 21, 30 y 60.

20 El CBPC y la preparación de inmunoglobulina anti-LPS, así como la preparación de inmunoglobulina anti-insulina se tomaron todos los días durante 30 días.

25 Los sujetos tomaron el medicamento (CBPC o preparaciones de inmunoglobulina) por la mañana antes del desayuno y se les requería no comer durante 2 horas después de tomar el medicamento.

Si un sujeto se olvidaba de tomar el medicamento por la mañana, podía tomarlo durante el día.

30 No podían ingerirse alimentos 2 horas antes y 2 horas después de tomar el medicamento. Los sujetos se trataron de forma ambulatoria y se supervisaron durante un periodo de tratamiento de 30 días, y se hizo un seguimiento de 30 días después de finalizar el estudio.

#### Seguimiento clínico y de laboratorio

35 a. Se hizo un seguimiento de los sujetos mediante visitas programadas regulares, que incluían una exploración física, revisión del historial médico en curso y pruebas de laboratorio, como se describe en la Tabla 6.

b. La seguridad se evaluó supervisando los acontecimientos adversos de los pacientes. Se pidió a los sujetos que redactaran un diario detallando cualquier acontecimiento adverso que pudiera producirse durante el periodo de tiempo entre las visitas.

40 c. La evaluación del efecto de la administración oral del estudio se evaluó determinando las pruebas clínicas y de laboratorio, tal como se ilustra y resume continuación.

#### Evaluación del tratamiento

45 a. La seguridad y tolerabilidad de la administración oral del cóctel farmacológico del estudio se evaluó los días 7, 14, 21 y 30 mediante exploraciones físicas y a través de evaluaciones de laboratorio e historial médico, como se describe a continuación y a través de las entradas en el diario del sujeto. El supervisor del estudio, el director del estudio y el investigador principal supervisaron ininterrumpidamente a los sujetos revisando los acontecimientos adversos, los datos del laboratorio y el estado clínico del sujeto.

50 b. Se llevó a cabo una recopilación de datos en cada una de las visitas; se realizaron los siguientes exámenes (también descritos anteriormente).

#### Modificaciones de dosis

55 No tendrá lugar ninguna modificación de la dosis en este protocolo.

#### Visita 1:

La visita 1 tuvo lugar hasta 14 días después de la visita de exploración. Si se producía un retraso, se repetía la visita de exploración.

60 Antes de participar en cualquier procedimiento del estudio, el sujeto debe cumplir los criterios de inclusión/exclusión por su historial (que incluye una renuncia firmada) y revisar y firmar un formulario de consentimiento informado.

65 En esta visita de exploración, se revisaba la información demográfica, el historial médico y las medicaciones pasadas y actuales del sujeto. Los sujetos se sometieron a un examen físico (incluidas las constantes vitales), de altura y peso completo, y se realizaron las siguientes pruebas de laboratorio:

-CBC con diferencial.

-Pruebas químicas: proteínas totales, albúmina, ALT, AST, ALP, GGTP, LDH, colesterol, ácido úrico, creatinina, urea (BUN), Na, K, glucosa, bilirrubina total

-FACS, ELISA y prueba de translocación bacteriana

5 -Prueba de tolerancia a la glucosa

-Puntuación HOMA/HOMAIR

Visita 2-5: días 7, 14, 21,30

10 Los sujetos se sometieron a una evaluación de sus constantes vitales, evaluación de AE y medición de peso y altura, y se recogieron muestras de sangre para la bioquímica y CBC. Los días 14 y 30 se realizaron pruebas de HbA1C, insulina, FACS y ELISA, y también una prueba de translocación bacteriana.

Visita 6: día 60:

15 Los sujetos se sometieron a una evaluación de AE, examen físico y constantes vitales, índice de masa corporal, y se extrajo sangre para: bioquímica, CBC, CRP, HbA1C, insulina.

20 b. DEFINICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EVALUACIONES CLÍNICAS Y DE LABORATORIO

EVALUACIONES

i. *Registro y clasificación de las evaluaciones de laboratorio*

25 En la exploración y la entrada se registraron todos los valores de laboratorio. Para evaluaciones posteriores a la entrada, se registraron todos los valores de laboratorio. Se registraron todas las toxicidades de laboratorio que conducían a un cambio en el tratamiento, independientemente del grado.

ii. *Hematología*

30 Incluye hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), recuento leucocitario (WBC), diferencial, recuento absoluto de neutrófilos (RAN) y plaquetas.

iii. *Pruebas de función hepática*

35 Incluyen bilirrubina total, AST (SGOT), ALT (SGPT), fosfatasa alcalina, proteínas totales y albúmina.

iv. *Químicas sanguíneas*

40 Se incluye glucosa, creatinina, BUN, colesterol, LDL, HDL, TG, ácido úrico, albúmina, ALP, GGTP, LDH, Na, K.

v. *Prueba de embarazo*

45 Que realizar en mujeres con potencial reproductor. (Prueba de  $\beta$ -HCG en orina, aprobada con una sensibilidad de 25-50 mUI/ml)

vi. *Estudios Inmunológicos*

50 Análisis FACS hechos para: Anti CD3, anti CD4, anti CD8, anti CD25+, Foxp3+, anti CD56, CD62L+HLA-DR.  
ELISA hecho para: IL6, TNF $\alpha$ , adiponectina, GLP-1.  
También hecha prueba de translocación bacteriana.

vii. Se realizaron evaluaciones de recuentos celulares y porcentajes en el mismo laboratorio, de ser posible, para la exploración y a lo largo del estudio.

55 Debido a la variación diurna en los recuentos celulares, de ser posible, se obtuvieron regularmente determinaciones de participantes individuales por la mañana o por la tarde durante todo el estudio.

60 Todos los estudios de citometría de flujo desarrollados, incluidos los ensayos de activación inmunitaria, se realizaron según los métodos de consenso ACTG. Las células T activadas se definieron como aquellas que coexpresan CD38 y HLA-DR.

viii. *Historial médico*

65 El historial médico incluye, como mínimo, duración de infección por VHC conocida, hospitalizaciones anteriores y diagnósticos, con un énfasis especial en complicaciones relacionadas con el hígado y otras afecciones relacionadas

con el VHC, exposición a medicamentos antivíricos y cualquier afección médica preexistente que pudiese interferir con el desarrollo del estudio.

ix. *Examen físico completo*

Un examen físico completo debe incluir, como mínimo, un examen de la piel, la cabeza, la boca y el cuello; auscultación del tórax; examen cardíaco; examen abdominal; examen de las extremidades inferiores para comprobar si hay edema. El examen físico completo también incluye signos y síntomas, diagnósticos y constantes vitales (temperatura, pulso, ritmo respiratorio y presión arterial).

x. *Examen físico dirigido*

Un examen físico dirigido incluye constantes vitales (temperatura, pulso, ritmo respiratorio y presión arterial) y debe estar motivado por cualquier síntoma previamente identificado o nuevos síntomas que ha experimentado el sujeto, o diagnósticos que se han hecho al sujeto desde la última visita.

**7.0 ASPECTOS DE TRATAMIENTO CLÍNICO**

7.1 EMBARAZO

Las mujeres que se quedan embarazadas durante el estudio abandonarán el tratamiento del mismo, es decir, no recibirán ninguna dosis más de calostro y harán saber información relacionada con el embarazo (p. ej., complicaciones, nacimientos, pérdida/anomalías del feto).

Se alentó a estas mujeres a que permanecieran en el estudio para que se les hiciera un seguimiento de forma aislada del estudio o en el estudio, para evaluaciones de seguridad (evaluación clínica, examen dirigido) por el protocolo, hasta la finalización del estudio y se les haría un seguimiento por contacto telefónico posteriormente para determinar el resultado del embarazo. También se deben registrar los resultados (salud del bebé) y cualquier complicación relacionada con el embarazo.

**8.0 CRITERIOS DE INTERRUPCIÓN**

8.1 INTERRUPCIÓN PERMANENTE DEL TRATAMIENTO

- Toxicidad relacionada con el fármaco
- Embarazo o lactancia
- Finalización de tratamiento tal como se define en el protocolo
- Petición de finalizar el tratamiento por parte del sujeto
- Razones clínicas que el médico considera que ponen en peligro la salud, incluso si no se abordan en la sección de toxicidad del protocolo.

8.2 INTERRUPCIÓN PREMATURA DEL ESTUDIO

- Falta de asistencia del sujeto a 2 visitas clínicas consecutivas
- Incumplimiento repetido del sujeto de las medicaciones según lo prescrito
- Solicitud de abandono por parte del sujeto
- Solicitud por parte de los cuidadores profesionales si consideran que el estudio ya no es del mayor interés para el sujeto.
- Sujeto sobre el que el investigador ha juzgado que supone un riesgo significativo de no cumplir con las disposiciones del protocolo en cuanto a causar daños a sí mismo o interferir gravemente en la validez de los resultados del estudio.
- A criterio del IRB, Ministerio de Sanidad, investigador o patrocinador farmacéutico.

**9.0 CONSIDERACIONES ESTADÍSTICAS**

9.1 ASPECTOS GENERALES DEL DISEÑO

La hipótesis de que la administración de CBHI reduce los niveles en plasma de productos microbianos en la población de estudio después de un periodo de 4 semanas de administración se evaluó mediante la prueba de Wilcoxon para datos emparejados para comparar la media de los valores de pretratamiento con los valores observados al final del periodo de 4 semanas de tratamiento y el valor 4 semanas después de interrumpir la terapia.

El valor de referencia (definido como el promedio de 2 observaciones antes del tratamiento del estudio) se comparó con cada una de las mediciones del tratamiento y cada una de las observaciones después del tratamiento, y los valores al final del periodo de tratamiento con los valores después del tratamiento. Se utilizó un enfoque similar para probar la hipótesis secundaria de una disminución de la activación inmunitaria después de la administración del tratamiento del estudio.

Para probar la hipótesis de una asociación entre los niveles del tratamiento de los niveles plasmáticos de productos microbianos y los niveles de activación inmunitaria celular, se exploran los datos gráficamente y ajustan a un modelo de regresión de medidas repetidas, utilizando la frecuencia de células T activadas como la variable dependiente y tanto el nivel de productos microbianos en el plasma como la fase de estudio (antes, sobre o después del tratamiento) como las variables explicativas. Esto permite obtener una estimación del efecto del tratamiento sobre la activación inmunitaria (si existe) y si el efecto es completamente dependiente del efecto intermedio sobre los niveles de productos microbianos.

Dada la naturaleza exploratoria de este estudio preliminar, inicialmente no se aplica ninguna corrección a las comparaciones múltiples.

**10.0 RECOPIACIÓN DE DATOS Y SEGUIMIENTO E INFORME DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS**

10.1 Registros que elaborar. Se proporcionarán cuadernos de recogida de datos (CRD) a cada sujeto. Los sujetos no pondrán su nombre en ningún CRD sino que se identificarán mediante el número de identificación del paciente (IDP) y un número de identificación de estudio (IDE) proporcionados en el momento de la asignación al azar.

**11.0 SUJETOS HUMANOS**

**11.1 COMITÉ INSTITUCIONAL DE REVISIÓN (IRB) Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El protocolo y el documento de consentimiento informado, y cualquiera de sus modificaciones posteriores se revisaron y aprobaron por el IRB o comité de ética responsable de la supervisión del estudio. Se obtuvo un formulario de consentimiento firmado del sujeto (o de los padres, tutor legal o persona con poder legal para sujetos que no pueden consentir por sí mismos). El formulario de consentimiento describe el propósito del estudio, los procedimientos que seguir y los riesgos y beneficios de la participación. Se ofreció una copia del formulario de consentimiento al sujeto, padre/madre o tutor legal, y este hecho se documentó en el registro del sujeto.

**11.2 CONFIDENCIALIDAD DEL SUJETO**

Todas las muestras de laboratorio, los formularios de evaluación, los informes y otros registros que se dejan en el lugar se identificarán con un número codificado con el único fin de mantener la confidencialidad del sujeto. Todos los registros se mantendrán bajo llave. Todas las entradas al ordenador y programas de establecimiento de red informática se realizarán únicamente con números codificados. La información clínica no será publicada sin el permiso escrito del sujeto, salvo que sea necesario un seguimiento por el IRB, el Ministerio de Sanidad, o el proveedor farmacéutico (o los proveedores farmacéuticos) o la persona designada.

**11.3 SUPERVISIÓN DEL ESTUDIO**

Aunque este fue un ensayo clínico exploratorio que solo evalúa un complemento nutricional, sin ningún fármaco aprobado o experimental, se supervisan los pacientes para comprobar si se producen efectos secundarios esperados e inesperados.

**12.0 CONTENCIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO**

Todo el personal tomó las precauciones apropiadas en cuanto a sangre y secreciones en las extracciones de muestras de sangre y en la distribución y manipulación de todas las muestras para este estudio, como actualmente recomiendan los centros para el control y prevención de enfermedades y los institutos nacionales de sanidad.

Todos los materiales de mercancías peligrosas, incluidas las muestras de diagnóstico y las sustancias infecciosas, se transportaron utilizando envases según lo dispuesto por la ley.

**Tabla 6**

Visita	-1	1	2	3	4	5	6
Día	Exploración	1	7	14	21	30	60
Tratamiento (todos los días durante los días 1 a 30)		X	X	X	X	X	
Consentimiento informado	X						
Historial médico	X						
Historial de medicación	X						
Evaluación AE		X	X	X	X	X	X

Examen físico	X	X				X	X
Constantes vitales	X	X	X	X	X	X	X
IMC (ÍNDICE DE MASA CORPORAL)	X	X	X	X	X	X	X
SMA <sup>1</sup>	X	X	X	X	X	X	X
CRP	X					X	X
CBC/diferencial	X	X	X	X	X	X	X
ESR	X					X	
HbA1C	X		X			X	X
Insulina		X	X			X	X
Embarazo (beta HCG)	X						
FACS <sup>2</sup>		X		X		X	
ELISA		X		X		X	
Prueba de translocación bacteriana		X		X		X	
Puntuación HOMA		X		X		X	X
Prueba de tolerancia a la glucosa		X				X	
Asignación al azar	X						
Toma de la medicación del estudio		X	X	X	X	X	

<sup>1</sup> SMA incluye: proteínas totales, albúmina, ALT, AST, ALP, GGTP, LDH, colesterol, LDL, HDL, TG, ácido úrico, creatinina, urea (BUN), Na, K, glucosa, bilirrubina total

<sup>2</sup> Análisis FACS incluye, pero no de forma limitativa: Anti CD3, anti CD4, anti CD8, anti CD25+, FoxP3+, anti CD56, CD62L+HLA-DR

<sup>3</sup> ELISA: IL6, TNF $\alpha$ , adiponectina, GLP-1

\* Las visitas 2 a 6 se pueden hacer en una ventana de tiempo de 3 días de la fecha fijada.

10 **Ejemplo 34. El alivio del daño hepático y de la resistencia a la insulina por la administración oral de la preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS está mediado por el aumento de las células Treg y asociado al aumento de GLP-1 y adiponectina en suero: resultados de un ensayo clínico de fase I/II en EHNA.**

15 En un ensayo clínico sin ocultación, diez pacientes con EHNA y resistencia a insulina, confirmado por biopsia, se trataron por vía oral durante 30 días con una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS (Immuron, Australia) preparada como se describe en el presente documento en el Ejemplo 47. Los pacientes se supervisaron para comprobar la seguridad, la resistencia a la insulina, las células T reguladoras (Tregs), la IL-6, adiponectina y GLP-1 en suero. El efecto clínico se determinó mediante la prueba de hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c), prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT), puntuación HOMA, enzimas hepáticas y perfil lipídico. La comparación se hizo entre el día 1 y 30 en cada paciente.

25 **Criterios de inclusión.** Se inscribieron diez pacientes en un ensayo sin ocultación. Los participantes (hombres y mujeres de entre 18 y 60 años) se evaluaron para determinar su elegibilidad después de firmar un formulario de consentimiento informado escrito. El diagnóstico de EHNA se basó en una puntuación de una biopsia de hígado de 4 o superior y por un metabolismo de glucosa alterado, incluyendo diabetes (no tratada o tratada con hasta dos fármacos, sin ningún cambio en la medicación dos meses antes de la inscripción), glucosa alterada en ayunas o tolerancia alterada a la glucosa y HbA1C entre 5,5 y 14 %. La glucosa alterada en ayunas se definió como > 100 mg/dl. La tolerancia alterada a la glucosa se definió como el nivel de azúcar en sangre > 140 mg/dl dos horas después de una carga de glucosa y una HbA1C entre 5,5 y 8 %. No había pruebas de que hubiese otra enfermedad hepática vírica o mediada por el sistema inmunitario.

35 **Criterios de exclusión.** Se excluyeron los pacientes que cumplieran algunos de los siguientes criterios: infección simultánea activa con virus de hepatitis A, B o C; la presencia de infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), carcinoma hepatocelular, insuficiencia hepática fulminante, funciones hepáticas sintéticas con grave deterioro o una enfermedad infecciosa clínicamente significativa, neoplásica o mediada por el sistema inmunitario; antecedentes de tratamiento con fármacos inmunomoduladores, incluyendo esteroides y AINE, en cualquier momento dentro de las cuatro últimas semanas; antecedentes de coagulopatía; mujeres con posibilidad de embarazo a menos que sean quirúrgicamente estériles o utilicen medios anticonceptivos adecuados (es decir, DIU, anticonceptivo oral o Depo-Provera o barrera y espermicida); anemia (Hb < 10,5 g/dl), trombocitopenia (plaquetas < 40 100 k/ $\mu$ l) o linfopenia (recuento absoluto de linfocitos < 0,7) o alergia a la leche de vaca o intolerancia a la lactosa.

**Terapia y seguimiento de laboratorio.** Después de una evaluación médica completa y de una biopsia de hígado, los pacientes cualificados para la terapia recibieron una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS a una dosis de 600 mg tres veces al día (un total de 1800 mg). Los pacientes se supervisaron durante 60 días a través de visitas regulares programadas semanalmente, que incluían un examen físico, una revisión del historial médico en curso y pruebas de laboratorio. La seguridad se evaluó controlando los acontecimientos adversos de los pacientes. La sangre se extrajo en cada visita para determinar el hemograma completo (CBC), la velocidad de sedimentación (ESR) y los recuentos químicos estándar, incluyendo nivel de enzimas hepáticas, INR, perfil lipídico, CRP, HbA1C y de insulina en suero. Todos los pacientes se sometieron a una prueba de tolerancia oral a la glucosa repetida y a una evaluación de puntuación HOMA al final del estudio.

**Resumen de los resultados.** La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS era segura y no se observaron efectos secundarios en ninguno de los sujetos tratados. El alivio de la resistencia a la insulina se determinó mediante las siguientes medidas: una disminución en los niveles de glucosa en ayunas (6,9 frente a 6,05 mmol/l  $p<0,03$ ); elevación en el pico inicial de la secreción de insulina tras la administración de glucosa (278 frente a 470 pmol/l,  $p<0,03$ ); OGTT mejorada (ABC de 2492 frente a 2252,  $p<0,08$ ); mejora de la secreción de insulina durante la OGTT (ABC de 99.177 frente a 117.784 y  $p<0,08$ ); mejora de la puntuación HOMA (6,71 frente a 4,82  $p<0,06$ ). Los pacientes tratados mostraron una disminución en los niveles de triglicéridos en suero (1,88 frente a 1,32  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p<0,05$ ), colesterol total (5,28 frente a 4,44  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p<0,04$ ) y colesterol LDL (3,7 frente a 2,49  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p<0,05$ ). En la mayoría de los pacientes tratados se observó una disminución en las enzimas hepáticas (ALT: 54,5 frente a 43,16 u/l,  $p<0,04$ ; AST: 50,58 frente a 45,5 u/l,  $p<0,05$ ; fosfatasa alcalina: 82,1 frente a 72,4 u/l,  $p<0,001$ ; GGT: 84,3 frente a 58,6 u/l,  $p<0,05$ ). En el 90 % de los sujetos tratados se observó una pérdida de peso corporal de al menos un 10 % con una pérdida de peso promedio de 3 kg en el periodo de estudio de 30 días (100,25 frente a 97,23 kg,  $p<0,05$ ) junto con una reducción en la circunferencia de brazo, abdomen y cintura. Estos efectos fueron mediados por concentraciones séricas mayores de GLP-1 y adiponectina observadas en el 60 % y 80 % de los pacientes tratados, respectivamente (58.816 frente a 62.828, para GLP1,  $p<0,04$ ; y 6181 frente a 7068, unidades para adiponectina,  $p<0,01$ ). Se observó un aumento de células Tregs CD25+ y CD4+CD25+Foxp3 (5,24 % frente a 7,12 % y 2 % frente a 2,26 % respectivamente,  $p<0,002$ ) y en subconjuntos de células CD4+CD62+ (34,41 frente a 38,44,  $p<0,01$ ) en los sujetos tratados.

Conclusión: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS es segura y ejerce un efecto inmunomodulador en pacientes con diabetes de tipo 2, hiperlipidemia y EHNA. El efecto antiinflamatorio y la promoción de Tregs están asociados al alivio de la resistencia a la insulina, la hiperlipidemia y el daño hepático en estos pacientes.

**Ejemplo 35: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS disminuye la lesión hepática en seres humanos.**

Los niveles de enzimas hepáticas (AST y ALT, AP y GGT), de la glucosa en suero en ayunas, de la insulina y lípidos (colesterol y triglicéridos) en plasma se determinaron utilizando métodos estándar.

Los resultados demuestran que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) disminuye la lesión hepática en seres humanos.

Las Figuras 28A-B, 29, 30 y 31 muestran el efecto de la administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS (CBHI) a una dosis de 1,8 g/día en los niveles en suero de ALT, AST fosfatasa alcalina (PA) y  $\gamma$ -GGT, respectivamente. Los niveles de ALT disminuyeron en cinco pacientes (57,4 frente a 48,6 u/l para el día 1 frente al día 30;  $P<0,04$ ). Los niveles de AST disminuyeron en cinco sujetos tratados (51,2 frente a 44,6 u/l para el día 1 y día 30;  $P=0,013$ ). Los niveles de AP mejoraron en ocho pacientes tratados (83,1 frente a 73,9 u/l, para el día 1 frente al día 30;  $P<0,002$ ) y los niveles de  $\gamma$ -GGT disminuyeron en cinco pacientes tratados (88,2 frente a 73,2 u/l para el día 1 frente al día 30;  $P<0,05$ ).

Como puede observarse en la Figura 28B, se observó una mayor disminución en los niveles de ALT en aquellos sujetos con niveles iniciales de ALT más altos. Por tanto, los métodos pueden incluir identificar a un sujeto con un nivel de ALT por encima de un determinado nivel, por ejemplo, 50 U/l y administrar el calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento.

Además, como puede observarse en la Figura 29B, se observó una mayor disminución en los niveles de AST en aquellos sujetos con niveles iniciales de AST más altos. Por tanto, los métodos pueden incluir identificar a un sujeto con un nivel de AST por encima de un determinado nivel, por ejemplo, 50 U/l y administrar el calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento. Por tanto, los métodos pueden incluir identificar a un sujeto con un nivel de AST por encima de un determinado nivel, por ejemplo, 50 U/l y administrar el calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento.

Además, como puede observarse en la Figura 30B, se observó una mayor disminución en los niveles de AP en aquellos sujetos con niveles iniciales de AP más altos. Por tanto, los métodos pueden incluir identificar a un sujeto

con un nivel de AP por encima de un determinado nivel, por ejemplo, 70 U/l y administrar el calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento.

5 Además, como puede observarse en la Figura 31B, se observó una mayor disminución en los niveles de GGT en aquellos sujetos con niveles iniciales de GGT más altos. Por tanto, los métodos pueden incluir identificar a un sujeto con un nivel de GGT por encima de un determinado nivel, por ejemplo, 60 U/l y administrar el calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento.

10 **Ejemplo 36: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS disminuye los niveles de glucosa en ayunas, aumenta el pico inicial de secreción de insulina, mejora la tolerancia oral a la glucosa y mejora los niveles de HbA1c, las puntuaciones HOMA y los niveles de GLP-1 en seres humanos.**

15 Para determinar el efecto de la inmunoglobulina enriquecida anti-LPS sobre el control glucémico en pacientes con EHNA, especialmente en los pacientes diabéticos con tolerancia alterada a la glucosa, se analizaron varios parámetros. Una diana recomendada de HbA1c en ensayos clínicos es una disminución de entre 6,5 y 7,0 % (DeFronzo et al., Diaber Med 27, 309-317 (2010)).

20 Las Figuras 35A-B muestran una mejora significativa en los valores de HbA1c en todos los pacientes tratados (7,49 frente a 6,38 % para el día 1 frente al día 30, respectivamente, para diez pacientes;  $P < 0,001$ ). El tratamiento con una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS durante 30 días provocó una disminución de 14,8 % en los valores de HbA1c en los diez pacientes. Como puede observarse en la Figura 35B, se producía una mayor disminución en pacientes con valores iniciales de HbA1c más altos. Por tanto, los métodos pueden incluir identificar a un sujeto con un nivel de HbA1c por encima de un nivel determinado, por ejemplo, por encima de 7 u 8, y administrar el calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento.

25 Las Figuras 33A-B muestran que la inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS también ejerce un efecto beneficioso en la resistencia a la insulina, evaluado midiendo el pico inicial de secreción de insulina 30 minutos después de la administración de glucosa (OGTT de 75 g de glucosa). La secreción de insulina aumentó después de 30 min de 310 a 538,4 pmol/l para el día 1 y día 30, respectivamente, en cinco pacientes tratados ( $P = 0,083$ ). Como se muestra en la Figura 33B, los mayores aumentos se produjeron en los sujetos con los niveles iniciales más altos de secreción de insulina, por lo tanto, los métodos pueden incluir seleccionar sujetos que tengan un nivel de secreción de insulina por encima de un nivel umbral, por ejemplo, por encima de 300 pg/ml y administrar el calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento.

35 Las Figuras 32A-B muestran una reducción significativa ( $p < 0,01$ ) en los niveles de glucosa en plasma en ayunas de los pacientes tratados (6,3 frente a 5,8 mmol/l, para el día 1 frente al día 30, respectivamente, de cinco pacientes;  $P = 0,063$ ).

40 Las Figuras 34A-B muestran una mejora ( $p = 0,08$ ) en los resultados de la prueba de la tolerancia oral a la glucosa (OGTT), como lo indica el área bajo la curva (2492 frente a 2252 para el día 1 frente al día 30, respectivamente, de cinco pacientes).

45 Las Figuras 36A-B muestran puntuaciones HOMA mejoradas (6,7 frente a 4,8, para el día 1 frente al día 30, respectivamente, de seis pacientes). Como se muestra en la Figura 36B, las mayores disminuciones ocurrieron en los sujetos con las puntuaciones HOMA iniciales más altas, por lo tanto, los métodos pueden incluir seleccionar sujetos que tengan una puntuación de HOMA por encima de un umbral, por ejemplo, por encima de 7 u 8 y administrar calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento.

50 En su conjunto, estos resultados muestran una clara mejora en la resistencia a la insulina en pacientes tratados con la preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS a una dosis de 1,8 g/día.

55 El papel principal de GLP-1 en la tolerancia a la glucosa ha planteado cuestiones sobre la posible implicación de este péptido en la patogénesis de la diabetes. En un estudio reciente, se descubrió que la sensibilidad de los pacientes diabéticos a GLP-1 se reducía significativamente en comparación con individuos no diabéticos (Kjems et al, Diabetes 52, 380-386 (2003)).

60 Las mediciones de citocinas y adiponectina circulantes se realizaron de la siguiente manera. Los días 1 y 30 del estudio se extrajeron muestras de sangre de todos los pacientes. Los niveles en suero de IL-6 se determinaron utilizando un ensayo ELISA de tipo "sándwich" utilizando kits comerciales (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. El péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) se ensayó mediante el siguiente método: después de un ayuno nocturno de 12 horas en un momento de 180 min de OGTT, se extrajo sangre de todos los pacientes. La sangre se recogió en tubos con EDTA enfriados con hielo e inmediatamente ( $< 30$  segundos) después de la recogida se añadieron 20  $\mu$ l de inhibidor de DPP-IV a 2 ml de plasma, según las instrucciones del fabricante. Los tubos se invirtieron e inmediatamente después se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min en una centrifuga refrigerada. Después de la separación del plasma, las muestras se conservaron a  $-70^{\circ}$  C hasta llevar a cabo el ensayo ELISA. El nivel de GLP-1 humano circulante se cuantificó utilizando un kit comercial de

ELISA de Millipore (MA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Se determinaron los niveles en suero de adiponectina humana utilizando un kit comercial de ELISA de Linco Research (Missouri, EE. UU.). El suero se diluyó 500 veces antes del ensayo y se sembraron 20 µl de suero diluido, muestras estándar y controles, por duplicado en una placa revestida con anticuerpo de ratón contra adiponectina humana, y se examinó utilizando un lector ELISA a 450 nm, según las instrucciones del fabricante.

Se compararon los niveles circulantes de GLP-1 en suero antes y después de realizar el ensayo OGTT los días 1 y 30. Las Figuras 37A-B muestran que el tratamiento durante 30 días aumentó los niveles en suero de GLP-1 después de la prueba OGTT en los cinco pacientes tratados (6,31 frente a 6,78 X 10<sup>4</sup> pM, en respondedores). Las Figuras 38A-B muestran los niveles en suero de adiponectina, que se incrementaron en ocho pacientes (6181 frente a 7069 ng/ml). Por tanto, la preparación oral de inmunoglobulina anti-LPS a una dosis de 1,8 g/día aumenta los niveles de GLP-1 y de adiponectina 1 en seres humanos.

**Ejemplo 37: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS disminuye los niveles de colesterol total, de colesterol LDL y de triglicéridos en seres humanos**

Las Figuras 39A-B muestran un efecto beneficioso de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS sobre los niveles en suero de colesterol total en cinco pacientes tratados (5,8 frente a 4,5 µmol/l para el día 1 frente al día 30, respectivamente). Se obtuvieron resultados similares con las mediciones de LDL en suero (3,8 frente a 2,7 µmol/l para el día 1 y día 30, respectivamente, Figuras 40A-B). Se observó una ligera mejoría en los niveles en suero de los triglicéridos en cinco pacientes (Figuras 41A-B). Como se muestra en las Figuras 39B 40B y 41B, los mayores efectos se observaron en los sujetos con los niveles más altos de colesterol, LDL y triglicéridos; por tanto, los métodos pueden incluir seleccionar sujetos que tengan un nivel de colesterol total en suero por encima de un umbral, por ejemplo, por encima de 6 uM/dl; un nivel de LDL en suero por encima de un umbral, por ejemplo, 4 uM/dl o un nivel de triglicéridos en suero por encima de un umbral, por ejemplo, por encima de 2 o 2,5 uM/dl y administrar el calostro enriquecido con anti-LPS como se describe en este documento.

Los datos presentados en este documento sugieren que la administración oral de calostro enriquecido con anti-LPS tiene un efecto mejorador sobre el perfil lipídico, por ejemplo, en pacientes con EHNA.

**Ejemplo 38: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS produce un aumento de las células T reguladoras CD4+CD25+ y CD4+CD25+Foxp3+ en seres humanos**

En trastornos relacionados con la obesidad, tal como EHNA, la inflamación local crónica está presente en el tejido adiposo y las células del sistema inmunitario innato están crucialmente implicadas en la inflamación adiposa y en las anomalías metabólicas sistémicas (Ilan et al, Proc Natl Acad Sci, EE. UU. 107, 9765-9770 (2010)). Diversos subconjuntos de células T periféricas procedentes de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se caracterizaron por citometría de flujo. Las CMSP de muestras de sangre recogida los día 0 y 30 se aislaron utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células se resuspendieron en PBS que contenía BSA al 1 %. Para la tinción de la superficie, las CMSP se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, bien con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra los marcadores de superficie celular indicados (eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.) a la dilución recomendada, o con anticuerpos de isotipo control. Se utilizaron los siguientes anticuerpos de superficie celular: CD4-FITC, CD25-PE, CD8-FITC, CD56-FITC, CD69-PE, CD3-CPA, CD62-PE y HLA-DR-CPA. Las células se lavaron en PBS que contenía BSA al 1 % y se fijaron con tampón fijador (eBioscience) durante otros 50 minutos. Para la tinción intracelular de Foxp3, las células se permeabilizaron con tampón de tinción de Foxp3 (eBioscience) después de la fijación y se tiñeron con anticuerpos conjugados con CPA contra Foxp3 (eBioscience). Las células se lavaron dos veces y resuspendieron en 250 µl de PBS que contenía BSA al 1 %, y se mantuvieron a 4 °C. Posteriormente se analizó un total de 10<sup>6</sup> células teñidas en 250 µl de PBS que contenía BSA al 1 % utilizando un instrumento FACS LRS II (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.) con el programa informático FCS express V.3 (programa informático DeNovo, California, EE. UU.). Solo se contaron las células vivas y la fluorescencia residual se restó de los linfocitos no tratados con anticuerpos.

Las Figuras 42A-B muestran que las células CD4+CD25+ se elevaron 30 días después del tratamiento oral con una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS en 7 de los 10 pacientes (4,63 frente a 6,28 %). Se observó un aumento significativo (p=0,002) en células CD4+CD25+HLA-DR en CMSP (2,3 frente a 3,8 % seleccionadas de CD4 para el día 1 frente al día 30) de siete pacientes tratados, como se presenta en la Figura 42. La Figura 42D muestra un aumento en células CD4+CD62+ que se observó en seis pacientes (36,5 frente a 41 % en respondedores, seleccionadas de células CD4). Se observó un aumento en células CD4+CD25+Foxp3+ en siete de diez pacientes tratados (Figuras 43A-B, 1,7 frente a 2,2 % de respondedores). En su conjunto, los datos presentados en este documento muestran que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS está asociada a alteraciones de linfocitos T reguladores, que pueden contribuir a algunos de sus efectos antiinflamatorios.

**Ejemplo 40: Administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS en ratones**

Introducción: El síndrome metabólico es una afección inflamatoria crónica. Las células T reguladoras (Tregs) son esenciales para mantener la tolerancia periférica y limitar las enfermedades inflamatorias crónicas. Las células Tregs

han demostrado aliviar las anomalías metabólicas y patológicas que acompañan a EHNA en ratones ob/ob.

Objetivo: Evaluar los efectos de la inducción de las Tregs sobre la resistencia a la insulina y la lesión hepática en EHNA.

5 Métodos: Se alimentó durante 6 semanas a ratones Ob/Ob deficientes en leptina con calostro bovino en polvo (CBP) preparado de vacas que no se inmunizaron o con calostro de vacas que se "hiperinmunizaron" con LPS (*E. coli* enterotoxigénica, 0,1 mg por dosis) o con una fracción de preparación de inmunoglobulina anti-LPS potenciada con IgG ("T-IgG") en tres dosis, 0,001, 0,1 y 1 mg. La resistencia a la insulina y la lesión hepática se midieron mediante  
10 niveles de glucosa en ayunas, pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) y enzimas hepáticas. Se midieron la acumulación de grasa en el hígado y los lípidos en plasma. El TNF-alfa en suero se determinó por ELISA y la tinción de Tregs en el bazo y el hígado se realizó por citometría de flujo.

15 Resultados: La administración oral de una dosis alta (1 mg) de preparación de inmunoglobulina anti-LPS disminuyó los niveles ALT ( $P < 0,05$ ) y de triglicéridos hepáticos en suero ( $P < 0,009$  y  $P < 0,05$ , respectivamente) en comparación con animales de control. La intolerancia a la glucosa medida con GTT se alivió después de 90 y 120 min ( $P < 0,05$ ). Dosis bajas y altas de preparación de inmunoglobulina anti-LPS y de calostros T-IgG disminuyeron los niveles de glucosa después de 3 semanas de tratamiento. Los niveles de TNF-alfa disminuyeron con tratamiento oral de 0,1 y 1 mg de preparación de inmunoglobulina anti-LPS. El efecto beneficioso de la preparación de inmunoglobulina anti-LPS y de T-IgG se asoció a un aumento en el número de células CD4+CD25+ ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,05$  para 0,001, 0,1 y 1 mg de preparación de inmunoglobulina anti-LPS y T-IgG, respectivamente), células CD4+CD25+Foxp3 ( $P < 0,001$ ,  $P < 0,05$  para 0,001 mg de preparación de inmunoglobulina anti-LPS y 0,1 mg de T-IgG, respectivamente) y células CD3+NK1.1 ( $P < 0,05$  para 0,1 mg de preparación de inmunoglobulina anti-LPS y 0,1 mg de T-IgG).

25 Conclusiones: La administración oral de una fracción de calostro ETEC potenciada con IgG induce las Tregs y alivia el estado inflamatorio crónico en el síndrome metabólico, aliviando la resistencia a la insulina y la lesión hepática.

#### **Ejemplo 41: Administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina en seres humanos.**

30 El síndrome metabólico es un trastorno inflamatorio crónico asociado a la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática. El calostro anti insulina (AI) ("preparación de inmunoglobulina anti-insulina" como se describe en este documento) puede ejercer un efecto inmunomodulador y aliviar el daño al órgano diana en modelos animales.

35 Objetivo: Determinar la seguridad y la eficacia de la administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina a pacientes con resistencia a la insulina y EHNA.

Métodos: En un ensayo clínico sin ocultación (*open label*), se trataron sujetos con resistencia a insulina y EHNA confirmada con biopsia por vía oral durante 30 días con 1,2 g/día (en peso seco de CBP) de preparación de inmunoglobulina anti-insulina que se suscitó contra la insulina humana. Los sujetos se supervisaron con respecto a  
40 la seguridad, a los niveles en suero de adiponectina y GLP-1 y de células T reguladoras (Tregs). El efecto clínico se determinó mediante OGTT, pruebas de enzimas hepáticas y perfil lipídico. La comparación se realizó entre el día 30 y día 0 en cada paciente.

45 Resultados: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina fue segura y en ninguno de los sujetos tratados se observaron efectos secundarios. El alivio de la resistencia a la insulina se determinó mediante las siguientes medidas: una disminución en los niveles de glucosa en ayunas (6,01 frente a 5,55 mmol/l,  $p < 0,008$ ); se observó una elevación en el pico inicial de secreción de insulina después de la administración de glucosa en el 70 % de los pacientes tratados (541 frente a 679 pmol/l,  $p < 0,02$ ); la prueba de tolerancia oral a la glucosa, OGTT mejoró (ABC de 1515 frente a 1420,  $p < 0,002$ ); y los niveles de HBA1C mejoraron en el 50 % de los pacientes tratados (5,8 frente a 5,54,  $p < 0,05$ ). Los pacientes tratados (70 %) mostraron una disminución de los niveles en suero de triglicéridos (2,62 frente a 1,72  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,06$ ), colesterol total (4,9 frente a 4,47  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,04$ ) y colesterol LDL (3,59 frente a 2,97  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,04$ ). En la mayoría de los pacientes tratados se observó una disminución en las enzimas hepáticas (ALT:67 frente a 48 u/l,  $p < 0,01$ ; AST:59 frente a 40 u/l,  $p < 0,05$ ; fosfatasa alcalina: 101 frente a 91 u/l,  $p < 0,004$ ; GGT: 70 frente a 58 u/l,  $p < 0,004$ ). Se observó una pérdida de peso de al menos un 15 % del peso corporal original en el 90 % de los sujetos tratados (80,5 frente a 79,2 kg,  $p < 0,05$ ), también se observó una  
50 reducción neta en la circunferencia de la cintura (99,6 frente a 95,6 cm,  $p < 0,001$ ). Estos efectos se asociaron a niveles aumentados en suero de IL-6 en el 90 % de los pacientes tratados, (4,29 frente a 6,61 pM  $p < 0,05$ ). La proporción de adiponectina/IL-6 disminuyó en el 90 % de los pacientes (2410 frente a 1970  $p < 0,03$ ). Se produjo un aumento de CD25+ en el 70 % de los pacientes tratados y de Tregs CD4+CD25+Foxp3+ (3,38 % frente a 6,61 % y 2,95 % frente a 4,27 % respectivamente,  $p < 0,002$ ).

60 Conclusión: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina es segura y ejerce un efecto inmunomodulador en pacientes con diabetes de tipo 2, hiperlipidemia y EHNA. En estos pacientes, el efecto antiinflamatorio y la promoción de Tregs están asociados al alivio de la resistencia a la insulina, la hiperlipidemia y el daño hepático.

**Ejemplo 42: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina disminuye la lesión hepática en seres humanos.**

5 Las Figuras 44, 45, 46 y 47 demuestran que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI anti-insulina) a una dosis de 1,2 g/día disminuye la lesión hepática en seres humanos.

**Ejemplo 43: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina disminuye los niveles de glucosa en ayunas, aumenta el pico inicial de secreción de insulina, mejora la tolerancia a la glucosa oral y mejora los niveles de HB1Ac, mejora las puntuaciones HOMA y los niveles de GLP-1 en seres humanos**

10 La Figura 48 demuestra que la preparación oral de inmunoglobulina anti-insulina a una dosis de 1,2 g/día disminuye los niveles de glucosa en ayunas en seres humanos. La Figura 49 demuestra que la preparación de inmunoglobulina anti-insulina a una dosis de 1,2 g/día aumenta el pico inicial de secreción de insulina en seres humanos. La Figura 50 demuestra que la preparación oral de inmunoglobulina anti-insulina a una dosis de 1,2 g/día mejora la tolerancia a la glucosa oral en seres humanos.

**Ejemplo 44: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina disminuye los niveles de colesterol total, de colesterol LDL y de triglicéridos en seres humanos**

20 La Figura 51 demuestra que la preparación oral de inmunoglobulina anti-insulina a una dosis de 1,2 g/día disminuye los niveles de colesterol total en seres humanos. La Figura 52 demuestra que la preparación de inmunoglobulina anti-insulina a una dosis de 1,2 g/día disminuye el peso corporal en seres humanos.

**Ejemplo 45: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina produce un aumento de células T reguladoras CD4+CD25+ en seres humanos**

25 La Figura 53 demuestra que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) a una dosis de 1,2 g/día produce un aumento de Tregs CD4+CD25+ en el 60 % de los pacientes (2,95 % frente a 4,27 %,  $p < 0,003$ ).

**Ejemplo 46: La administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina disminuye la circunferencia de la cintura y del brazo en seres humanos**

35 Las Figuras 54 y 55 muestran que la administración oral de la preparación de inmunoglobulina anti-insulina (CBHI) a una dosis de 1,2 g/día produce una disminución de la circunferencia de la cintura y del brazo en seres humanos.

**Ejemplo 47. Preparación de la preparación de calostro enriquecido con inmunoglobulina anti-LPS**

40 Se inmunizaron vacas lecheras de granjas comerciales con una vacuna ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénica) (serotipo O78) de cepa única, inactivada o con una vacuna ETEC multivalente, inactivada, en adyuvante (serotipos O6, O8, O15, O25, O27, O63, O114, O115, O128, O148, O153 y O159 combinados). La vacuna de cepa única se utilizó para inmunizar a aproximadamente un tercio de las vacas contra una de las cepas más comunes de ETEC (serotipo O78) y la vacuna de cepas múltiples se utilizó para inmunizar a los otros dos tercios de las vacas en el programa de inmunización.

*Proceso de producción de la vacuna de E. coli de cepa única y de cepas múltiples*

50 Rejuvenecimiento de la cepa – Se siembra en estrías la cepa única O78, H10407, que se desea rejuvenecer en 2 placas con medio CFA. Estas “placas de rejuvenecimiento” se colocan en la incubadora a 37 °C durante toda la noche en condiciones aerobias.

55 Inoculación de la "suspensión iniciadora" - Cada “placa de rejuvenecimiento” se examina para determinar el crecimiento puro. Si no hay crecimiento o este no es puro, se reinicia la producción desde el principio. Si el crecimiento es puro, varias colonias de una placa de rejuvenecimiento se retiran con un asa estéril y se utilizan para inocular una suspensión iniciadora en un frasco McCartney que contiene 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,2.

60 Inoculación de las placas de vacuna - La suspensión iniciadora se inocula en placas múltiples con CFA. Estas placas de vacuna se incuban a 37 °C durante 18 a 24 horas en condiciones aerobias.

En una de las placas de vacuna se realiza una prueba de hemaglutinación para confirmar la producción de pilosidades (*pilus*).

65 Lavado de las “placas de vacuna” – Las bacterias que han crecido desde las superficies de las placas de la vacuna se lavan con un tampón de fosfato de sodio 0,1 M, estéril, enfriado, (pH 7,2) en un frasco Schott estéril. Se enfrían en hielo los lavados de la vacuna durante al menos 30 minutos antes de comenzar la homogeneización.

5 Enumeración de los lavados de la vacuna - Se enumera la etapa de "lavados de la vacuna". El material debe agitarse cuidadosamente para dispersar todas las agrupaciones y garantizar que las diluciones elegidas son adecuadas para el grado de concentración de las células bacterianas en los lavados para el lote que se está fabricando.

10 Muestreo de pureza - Se reúnen varias placas diferentes (HBA, TSA y MAC) para realizar pruebas de pureza de cada "lavado de vacuna". Las colonias sencillas se cultivan en medios y se colocan en la incubadora a 37 °C en condiciones aerobias. El proceso prosigue solo si las placas contienen únicamente colonias puras de *E. coli*.

15 Homogeneización del lavado de vacuna - El "lavado de vacuna" se homogeneiza utilizando una sonda esterilizada con un homogeneizador durante un total de 15 minutos a intervalos de un minuto, con un minuto de enfriamiento en un baño con hielo entre cada intervalo.

20 Separación y diálisis de la fracción de pilosidades/LPS - El "lavado de vacuna homogeneizada" se centrifuga a 12.000 g durante 20 minutos a 4 °C y se guarda el sobrenadante. Lentamente, se añade solución de sulfato de amonio saturada estéril al sobrenadante hasta alcanzar una saturación del 20 %. La mezcla vuelve a centrifugarse y de nuevo se guarda el sobrenadante. Adicionalmente, se añade solución de sulfato de amonio saturada hasta alcanzar una saturación del 40 % y, después, vuelve a centrifugarse. La fracción de "pilosidades/LPS" se encuentra en el sedimento. La fracción de "pilosidades/LPS" vuelve a suspenderse y posteriormente se dializa, utilizando una membrana de límite de 3.500 PM, durante 24 a 48 horas a 4 °C contra de 250 a 1000 volúmenes de tampón de fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,2.

25 Análisis de contenido proteico del "dializado de pilosidades/LPS" - Se mide el contenido proteico de cada "dializado de pilosidades/LPS" utilizando un análisis de proteínas de Pearce y se ajusta la concentración a 1 mg/ml.

30 Inactivación de la vacuna - A cada "dializado de pilosidades/LPS" se le añade formaldehído para que la concentración final de formalina sea de 0,3 % y se conserva durante tres días a 4 °C. Después, la vacuna se somete a ensayo con respecto a su esterilidad.

35 Conservación del dializado de pilosidades/LPS formalinizado - El "dializado de pilosidades/LPS formalinizado" se conserva a -20 °C.

Se calentaron a 30 °C las mismas cantidades de "dializado de pilosidades/LPS formalinizado" y de adyuvante Seppic Montanide ISA 206 y, después, se mezclaron gradualmente al mismo tiempo que se agitaba. Después de conservar durante una noche a 4 °C, la vacuna se volvió a mezclar y después se cargó en envases estériles de tipo almohada.

40 El CC final de la vacuna antes de distribuirla incluyó una prueba de esterilidad, de seguridad y nivel de formalina libre durante una semana a una dosis normal 2 x en 3 vacas.

45 La vacuna de *E. coli* de cepa múltiple Immuron procede de la masa celular equivalente a la de la vacuna de *E. coli* de cepa única, contribuyendo cada cepa a una misma proporción del total. Cada una de las 12 cepas se preparó utilizando el proceso anterior y, después, se agrupó antes de la formulación final con adyuvante. Las 12 cepas se muestran en la tabla 7A.

**Tabla 7A - Cepas de *E. coli* enterotoxigénica en vacunas ETEC inactivadas de Immuron**

Serotipo	Cepa no.	Fuente	Fecha de aislamiento <sup>(ref)</sup>
ETEC O6: H16	B2C	EE. UU.	pre-1971 <sup>(1)</sup>
ETEC O8: H19	C55 3/3c3	EE. UU.	a mediados de 1980
ETEC O15: H4	PE 595	IMVS, Adelaida	Fuente de Aust.
ETEC O25: H42	E11881A	EE. UU.	1986
ETEC O27: HR	C1067-77	EE. UU.	1985
ETEC O63: H-	PE 673	IMVS, Adelaida	Fuente de Aust.
ETEC O78: H1 1	HI0407	EE. UU.	pre-1973, <sup>(2)</sup>
ETEC O114: H21	E20738/0	RU	1980 <sup>(3)</sup>
ETEC O115: H-	PE 724	IMVS, Adelaida	Fuente de Aust.
ETEC O128: H21	EI 37-2	EE. UU.	1985

ETEC O148: H28	B7A	EE. UU.	pre-1971 <sup>(1)</sup>
ETEC O153: H12	E8772/0	RU	pre-1980
ETEC O159: H-	PE 768	IMVS, Adelaida	Fuente de Aust.

Referencias citadas en la tabla:

<sup>(1)</sup>DuPont, H.L. et al., (1971) Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. New England J. of Medicine, 285: 1-9.

<sup>(2)</sup>Evans, DJ, Jr. and Evans, DG (1973) Three characteristics associated with enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man. Infect. Immunity 8: 322-328.

<sup>(3)</sup>McConnell MM, Hibberd M, Field AM, Chart H and Rowe B (1990) Characterization of a new putative colonization factor (CS17) from a human enterotoxigenic Escherichia coli of serotype O114:H21 which produces only heat-labile enterotoxin. J. Infect. Dis. 161(2): 343-347.

10 La siguiente Tabla 7B describe la composición de la vacuna.

**Tabla 7B - composición de la vacuna ETEC**

Constituyente	Especificación de fabricación	Concentración	Propósito en la formulación
<b>A. Cada 2 ml de vacuna de <i>E. coli</i> de cepa única contiene:</b>			
1 ml de "dializado de pilosidades/LPS formalinado" de serotipo O78 de <i>E. coli</i>	Preparado como se describe en Allied Biotech Doc. No. S04gs	La conc. final de inmunógeno "Pilosidades/LPS" es menor de 1,0 mg/ml	Inmunógeno
-Que contiene tampón de fosfato de sodio 0,05 M pH 7,2			Tampón
-Formalina libre		<0.002 % p/v en la emulsión final	Inactiva la vacuna
<b>Más</b> 1 ml de adyuvante Seppic Montanide ISA206			Adyuvante
<b>B. Cada 2 ml de vacuna de <i>E. coli</i> de cepa múltiple contiene:</b>			
1 ml de "dializado de pilosidades/LPS formalinado" de los siguientes serotipos de <i>E. coli</i> : O6, O8, O15, O25, O27, O63, O114, O115, O128, O148, O153 y O159.	Preparado como se describe en Allied Biotech Doc. No. S04gs	Contribuyendo cada cepa a una misma proporción (1/12) de la masa celular equivalente mínima total necesaria para producir la concentración final de 1,0 mg/ml de la vacuna Immuron de <i>E. coli</i> de <u>cepa única</u>	Inmunógeno
-Que contiene tampón de fosfato de sodio 0,05 M pH 7,2			Tampón
-Formalina libre			Inactiva la vacuna
<b>Más</b> 1ml de adyuvante Seppic Montanide ISA206			Adyuvante

15 *Hiperinmunización de vacas lecheras*

Todas las inmunizaciones se administraron utilizando procedimientos de manipulación limpios con el fin de maximizar la respuesta inmunitaria contra los antígenos y minimizar cualquier reacción a la inyección. A partir preferentemente de 2 a 4 meses antes del parto, las vacas seleccionadas se encerraron en un recinto y se administró una inyección subcutánea. Las vacas se inmunizaron 2 veces más hasta el parto a intervalos de 2-4  
5 semanas, cesando al menos 1 mes antes del parto. Las inyecciones se administraron por vía subcutánea después de desinfectar cuidadosamente el sitio frotando con una preparación de yodo.

Para recoger y conservar el calostro en cada granja se utilizó una bolsa higiénica de polietileno de calidad alimentaria. El calostro se filtró al entrar en la bolsa utilizando un filtro de 200 micras para retirar la materia bruta.

10 El calostro se extrajo de vacas frisonas de raza Holstein y Jersey, todas ellas certificadas por el gobierno y carentes de antibióticos en el momento de la extracción. No se les proporcionó esteroides en ninguna etapa del proceso. El calostro se extrajo en el primer ordeño a las doce horas del parto. Cada vaca producía aproximadamente 8 litros de calostro. A los terneros recién nacidos se les administró una parte del calostro extraído para garantizar que recibían los nutrientes necesarios. Después de extraer el calostro, se enfrió rápidamente en agua antes de conservarse en el  
15 congelador a -20 °C.

#### *Preparación de la sustancia farmacológica*

20 Utilizando una fresadora modificada "Butcher Boy", se fragmentaron bloques congelados de calostro en el tanque de calostro crudo. El calostro molido se descongeló y se recirculó a 7 °C y, después, se calentó 30 °C, antes de diluirse mediante la adición de un volumen similar de agua microfiltrada. En esta fase, se confirmó que el intervalo del pH era de 6,4 a 6,6.

25 El calostro diluido se calentó a 55 °C antes de la centrifugación durante 1 hora utilizando un separador de leche Westfalia automático, para eliminar grasa, células somáticas, restos de células y algunas bacterias.

30 El calostro desnatado se recogió en el tanque de pasteurización con camisa de agua, donde se pasteurizó el producto para destruir las bacterias patógenas. La temperatura máxima a la que se expuso fue de 65 °C, lo que garantizaba que la inmunoglobulina permanecía activa. El calostro se pasteurizó a una temperatura mínima de 63 °C durante 30 minutos, se enfrió a 5 °C y después se sometió a ultrafiltración en membrana, retirando gran parte de agua, iones y lactosa.

35 La etapa de ultrafiltración, que utiliza una unidad de ultrafiltración APV de bobina en espiral con membranas de 10 kD, dio lugar a la producción de un producto acabado con alto valor proteico (más de 80 % de proteínas) y más de 35 % de IgG, el componente clave del producto. La ultrafiltración produjo un concentrado con aproximadamente la mitad del volumen inicial del calostro por eliminación de agua y lactosa, y concentró el contenido proteico a aproximadamente 18 % y el contenido de sólidos totales a aproximadamente 20 %. En general, es deseable una cantidad de IgG que no sea inferior a 7 %.

40 El concentrado hidratado de calostro se transfirió a 4 °C a bandejas de liofilización y se liofilizó a -20 °C para producir un polvo, que se molió a 200 micras.

#### *Determinación de anticuerpos anti LPS en la preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS*

45 La inmunización de vacas con varias cepas de *E. coli* enteropatógena refuerza la concentración de anticuerpos específicos contra estos microbios en la sangre y el calostro. Para la inmunización, se utilizó una vacuna inactivada patentada para producir niveles muy altos de anticuerpos específicos contra antígenos de superficie seleccionados de 13 de las cepas más comunes de *E. coli*. Los anticuerpos resultantes se enriquecieron con anticuerpos anti-LPS. Los títulos de anticuerpos específicos en una preparación de CB hiperinmunitario con calostro enriquecido con  
50 inmunoglobulina anti-LPS se analizaron mediante un ELISA interno validado contra un conjunto de antígenos procedentes de antígenos tanto de la vacuna de *E. coli* de cepa múltiple (serotipos O6, O8, O15, O25, O27, O63, O114, O115, O128, O148, O153 y O159) como de la vacuna de *E. coli* de cepa única.

55 Los métodos ELISA se desarrollaron de la siguiente forma: en primer lugar, se pesaron polvos de calostro de una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS y se resuspendieron vigorosamente en PBS - T a 40 mg/ml. Las suspensiones se agitaron repetidamente con vórtex durante de 2 a 3 horas a temperatura ambiente y los componentes no disueltos se retiraron por centrifugación. Después, el sobrenadante se recogió en tubos limpios para la dilución posterior. Se realizaron muestras diluidas en caseína-PBS-T al 0,5 % por etapas en serie de factor  
60 cuatro, para dar diluciones de 1/250, 1/1000, 1/4000 y 1/16.000, antes del ensayo. Se dispensaron 100 µl de antígeno de recubrimiento (descrito anteriormente) en una placa de 96 pocillos de fondo plano (Nunc-Immuno, Nunc, Dinamarca) y, después, se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Se recubrió una placa de ELISA con antígeno de cepa única a  $1 \times 10^{-3}$  mg/ml y otra placa se recubrió con antígeno de cepa múltiple a  $1 \times 10^{-2}$  mg/ml. Tras la incubación, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y después se secaron golpeando ligeramente en una toalla de papel. Se añadieron 200 µl de solución de bloqueo (caseína-PBS 5%) y las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C para reducir la unión no específica. Después del lavado, se prepararon diluciones de factor 4 (1/250, 1/1000,  
65

1/4000, 1/16.000, 1/64.000 y 1/256.000) de cada muestra y se prepararon controles en una placa de 96 pocillos sin recubrimiento, utilizando como diluyente caseína-PBS-T al 0,5 %. Se retiraron 100 µl de cada dilución de la bandeja de dilución y se transfirieron a los pocillos de la placa ELISA, y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Todas las muestras se analizaron al menos dos veces para garantizar resultados precisos. En cada placa se incluyeron 5 controles positivos y negativos (sin anticuerpos). Las placas se lavaron 5 veces con PBS-T y se secaron golpeando ligeramente. Después, se dispensaron 100 µl de una concentración final 1/4000 de anticuerpo secundario de conejo contra bovino conjugado con HRP (Sigma) en una placa de 96 pocillos y después se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron de nuevo 5 veces y se dispensaron 100 µl de reactivo sustrato (sustrato de peroxidasa TMB de KPL SureBlue) en las placas, que después se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente, con 10 agitación suave. La reacción sustrato se detuvo después por la adición de 100 µl de HCl 1M. La densidad óptica (DO) de cada pocillo se leyó a 450 nm en un lector de placa (ELISA "Multiskan Ascent" Labsystems) y se analizó utilizando el programa informático Ascent versión 2.4.

15 Se comparó el título de los anticuerpos anti-LPS se comparó. Las Figuras 54-55 muestran los resultados de este ensayo, que demuestra claramente el alto contenido de anticuerpos anti LPS en una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS.

20 **Ejemplo 48. La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS mejora la enfermedad inflamatoria intestinal.**

Se evaluó en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal el efecto de una preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS sobre el sistema inmunitario.

25 Para investigar la inmunopatogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se han desarrollado modelos murinos de colitis experimental que se utilizan con frecuencia para evaluar nuevas estrategias antiinflamatorias. Uno de los modelos más utilizados es la colitis inducida por el agente haptinizante ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (TNBS). Se cree que este modelo se asemeja a la enfermedad de Crohn debido a la inflamación de la mucosa resultante mediada por una respuesta Th1 con producción excesiva de citocinas proinflamatorias.

30 La colitis inducida por TNBS se induce generalmente por aplicación intrarrectal de TNBS en etanol. En el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR), el primer periodo es la fase de sensibilización. La aplicación del hapteno en TNBS produce la modificación de moléculas autólogas en la mucosa, lo que conduce a la estimulación previa de células T específicas de antígeno. La fase de sensibilización inicial es de aproximadamente 7 días. Los animales se sensibilizaron con TNBS utilizando otro sitio, por ejemplo, la piel. La colitis inducida por TNBS 35 se puntuó el día +4, que refleja que esta reacción local aguda representa la fase de sensibilización inicial. La fase eferente o de provocación, la reacción de HTR, puede estudiarse solamente después de volver a aplicar los agentes iniciadores.

40 Se alimentaron ratones macho Balb-c, de 7-8 semanas de vida, con pienso de laboratorio estándar y se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones se llevaron a un entorno sin SPF (laboratorio) 3 días antes de comenzar el experimento. Para inducir la colitis mediada por hapteno, los ratones se sensibilizaron con 160 µl del agente haptinizante TNBS (Sigma-Aldrich, Rhovot, Israel) a una concentración de 2,5 % en etanol al 50 % pintando sobre la piel el día -7. El día 0, se administraron 120 µl de TNBS al 2,5 % en etanol al 50 %, por vía intrarrectal mediante un catéter de 3,5 French que se insertó cuidadosamente en el colon, de tal manera que la punta estaba a 45 4 cm proximal al ano. Los animales se mantuvieron en posición vertical durante 30 segundos y regresaron a sus jaulas. Los animales se trataron por vía oral (véanse las Tablas 8 y 9) mediante diversos tratamientos durante y después de la fase de sensibilización, y después se sacrificaron el día +4 (cuatro días después de la instalación de TNBS intrarrectal).

50 **Tabla 8**

Días	-7	-6	-5	-4	3-	0	1+	+2	3+	4+
Grupo A:	S	TNBS	Sacrificio							
Grupo B:	S	B	B	B	B	TNBS	B	B	B	Sacrificio
Grupo C:	S	I	I	I	I	TNBS	I	I	I	Sacrificio
Grupo D:	S	I	I	I	I	TNBS	I	I	I	Sacrificio

S - Sensibilización (pintando sobre la piel); TNBS- TNBS intrarrectal; B- CBP; I- Anti LPS

55 **Tabla 9**

Grupo	Tratamiento	Ligando	Administración
-------	-------------	---------	----------------

A N=4	TNBS	agua	PO (30 ml)
B N=4	TNBS	CBP* 100 mg	PO (30 ml)
C N=4	TNBS	anti LPS** 50 mg	PO (30 ml)
D N=4	TNBS	anti LPS 500 mg	PO (30 ml)

\* CBP - control de calostro (el calostro que se recogió de vacas no inmunizadas), disuelto en agua

\*\* anti-LPS - calostro con *E. coli* enterotoxigénica, hiperinmunizado, disuelto en agua

5 El peso es uno de los parámetros clave en el modelo de tipo TNBS. Para evaluar la pérdida de peso, todos los ratones se pesaron el día -7 (inicio del experimento), el día 0 (TNBS intrarrectal) y el día del sacrificio. Los gráficos que se muestran en la figura 56 representan la pérdida de peso (% de pérdida de peso de su peso inicial). En la Tabla 10 se muestran los datos.

Tabla 10

10

Tratamiento	Peso promedio (gramos)		
	Sensibilización	TNBS	Sacrificio
TNBS-agua	24,82	25,44	21,04
TNBS - calostro cont.	24,07	24,76	20,60
TNBS - anti LPS 50 µg	24,33	24,75	22,87
TNBS - anti LPS 500 µg	23,91	24,64	22,88

Los resultados mostraron que los ratones no tratados o los ratones tratados con control de calostro perdieron significativamente más peso durante el experimento en comparación con los ratones que se trataron con anti-LPS (ambas dosis).

15

La graduación de la histología del colon se realizó de la siguiente manera: para la evaluación histológica de la inflamación, se extirpo tejido colónico distal (últimos 10 cm) después de sacrificar a los ratones, y después se fijaron en formaldehído al 10 %. Después, se tiñeron secciones en parafina de cada animal con hematoxilina-eosina según técnicas estándar. Se graduó el grado, el nivel, el daño y la regeneración de la inflamación en secciones transversales microscópicas del colon de 0 a 3, considerándose el grado 0 como normal. La graduación la realizó un patólogo experimentado que no conocía el tratamiento. Los resultados, mostrados en la Figura 57, demuestran que los ratones que fueron tratados con anti LPS, en las dos dosis examinadas, exhibieron una graduación histológica mejorada en los cuatro parámetros ensayados.

20

25

Dado que la colitis inducida por TNBS se produce por una inflamación de la mucosa mediada por una respuesta Th1, intervienen muchos componentes del sistema inmunitario. Se examinaron cambios en la distribución de las células T reguladoras en el bazo y el hígado de ratones tratados por citometría de flujo después de sacrificar a los animales. El aislamiento de linfocitos intrahepáticos y esplenocitos se realizó de la siguiente manera. Los hígados y los bazos se mantuvieron en RPMI-1640 complementado con FCS. Los bazos se trituraron a través de un retenedor celular de nailon de 70 mm y se centrifugó (1250 rpm durante 7 min). En 1 ml de tampón de lisis de cloruro de amonio 155 mM frío, se efectuó la lisis de los glóbulos rojos. Los esplenocitos se lavaron y se resuspendieron en RPMI 1 ml complementado con FCS. La viabilidad evaluada por exclusión con azul de tripano era superior a 90 %. Para linfocitos intrahepáticos, los hígados se trituraron a través de una malla de acero inoxidable (tamaño 60, Sigma). Se cargaron 10 ml de preparación de linfocitos (*Lymphoprep*) (Ficoll, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega) con un volumen similar de suspensión celular en tubos de 50ml. Los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 18 min. Las células presentes en la interfaz se recogieron y se centrifugó nuevamente a 1800 rpm durante 10 min hasta obtener un sedimento de células sin hepatocitos. Se recuperaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/hígado de ratón. La citometría de flujo para subconjuntos de linfocitos se realizó de la siguiente manera. La citometría de flujo se

30

35

- realizó después del aislamiento de esplenocitos y linfocitos hepáticos utilizando  $1 \times 10^6$  linfocitos en 100 ml de PBS con BSA al 0,1%. Para la tinción de la superficie, las células se incubaron con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra los marcadores de superficie celular indicados (eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.) a la dilución recomendada o con anticuerpos de isotipo control durante 30 minutos a 4 °C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos anti ratón de superficie celular: CD4-eFluoro 450, CD8-FITC y CD25-PE. Después, las células se lavaron en PBS que contenía BSA al 1 % y se fijaron con tampón fijador (eBioscience) durante otros 50 minutos. Para la tinción intracelular de Foxp3, después de la fijación, las células se permeabilizaron con tampón de tinción de Foxp3 (eBioscience). Las células resultantes se tiñeron con anticuerpos contra Foxp3 conjugados con PE-Cy7 (eBioscience). Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 250  $\mu$ l de PBS que contenía BSA al 1 %, y se mantuvieron a 4 °C. Posteriormente, se analizó un total de  $1 \times 10^6$  células teñidas en 250  $\mu$ l de PBS que contenía BSA al 1 % utilizando un instrumento FACS LRS II (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.) con el programa informático FCS express V.3 (programa informático DeNovo, California, EE. UU.). Solo se contaron las células vivas, y la fluorescencia residual se restó de los linfocitos no tratados con anticuerpos.
- 15 Como se muestra en la Figura 58, en el bazo se observaron varios efectos sobre poblaciones de células T reguladoras. Las células CD4+CD25+ aumentaron por tratamiento de control calostro y por dosis de 500 mg de anti LPS, sin embargo, la dosis de 50 mg de anti LPS causó una disminución significativa en la expresión de este marcador en el bazo. Las células CD4+FOXP3+ aumentaron por la dosis más alta de anti LPS, en comparación con el control calostro. Curiosamente, no se observaron cambios significativos (Figura 59) en el hígado. También se determinaron los niveles en suero de IL-10, y la dosis más alta (500  $\mu$ g) indujo un aumento en los niveles en suero de esta citocina antiinflamatoria (Figura 60).

**Ejemplo 49. La preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS mejora los síntomas de infección.**

- 25 Para evaluar el efecto de la preparación de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS sobre los síntomas de infección, se ensayó la preparación en un modelo de septicemia. Se alimentaron ratones C57B1/6 de 11-12 semanas de vida (25 gr) con CBP de control o con una preparación de calostro de inmunoglobulina enriquecida con anti-LPS durante 10 días. La septicemia fue inducida por inyección IP de LPS 1 mg y de Gal/N 20 mg el último día del experimento, 5 horas antes de sacrificar a los ratones.
- 30 Se realizó un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL); los resultados, mostrados en la Figura 61, demuestran una disminución dependiente de la dosis en la translocación bacteriana. Además, como se muestra en la Figura 62, las dos dosis mejoraron la función hepática en comparación con el calostro (CBP) de control

**35 OTRAS REALIZACIONES**

- Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con su descripción detallada, la descripción anterior pretende ilustrar, y no limitar, el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.
- 40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende una preparación de calostro enriquecida con inmunoglobulina anti-LPS para su uso en el tratamiento de un sujeto con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) que tiene uno o más de:
- un nivel de ALT por encima de 50 UI/dl,
  - un nivel de AST por encima de 50 UI/dl,
  - una AP mayor que 70 U/l y/o
  - 10 una GGT mayor que 60 U/l,
- en la que la composición se formula para administración oral y la forma de dosis oral comprende de 200 mg a 2000 mg de IgG, siendo la inmunoglobulina anti-LPS al menos el 7 % en peso seco de la composición de IgG.
- 15 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la preparación de inmunoglobulina anti-LPS se prepara inmunizando a una vaca con LPS que comprende O6, O8, O15, O25, O27, O63, O78, O114, O115, O128, O148, O153 y O159 de una cepa de *E. coli* enterotoxigénica.
- 20 3. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la preparación de inmunoglobulina anti-LPS se administra a una dosis de más de 500 mg a más de 2000 mg al día.
4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la preparación de inmunoglobulina anti-LPS se administra a una dosis de más de 1800 mg al día.
- 25 5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición se administra durante al menos 14 días.

FIGURA 1

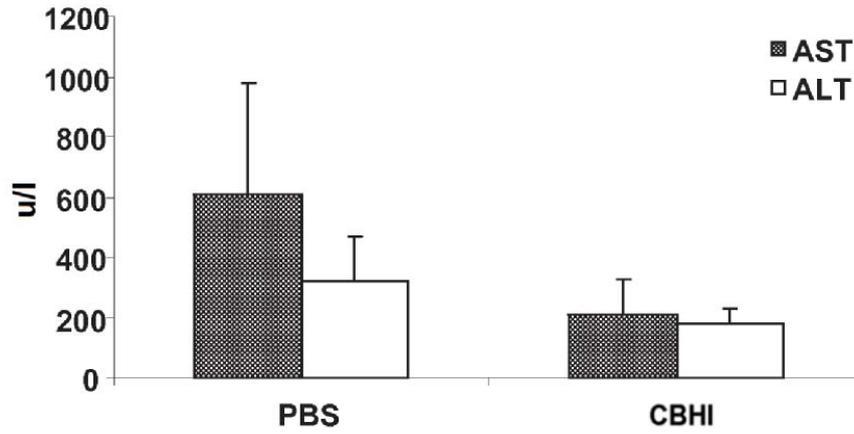


FIGURA 2A

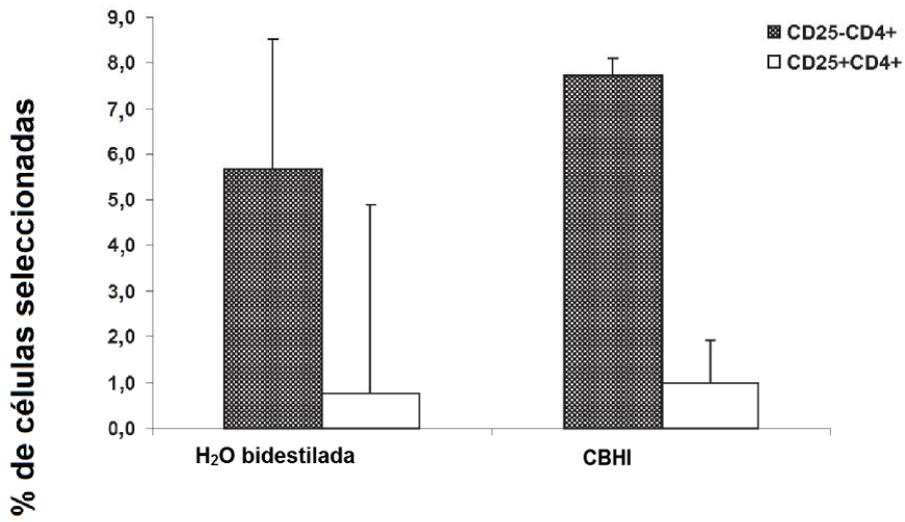


FIGURA 2B

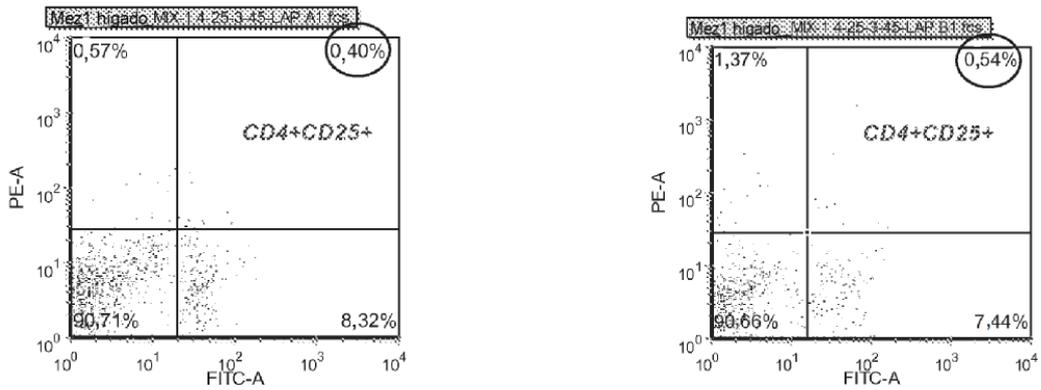


FIGURA 3A

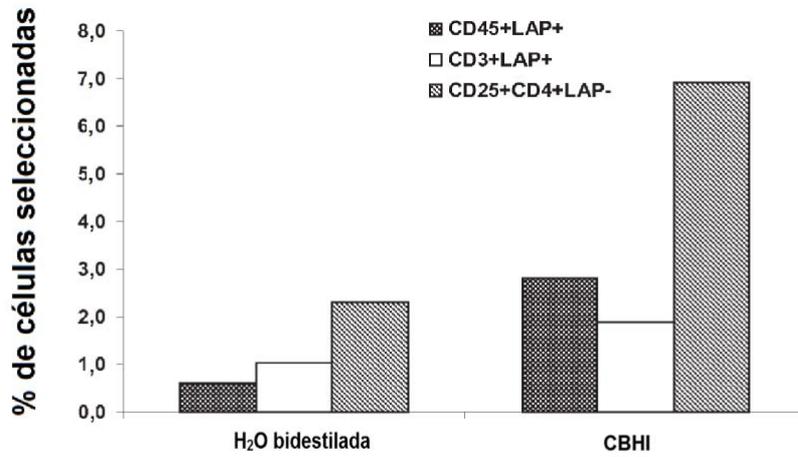


FIGURA 3B

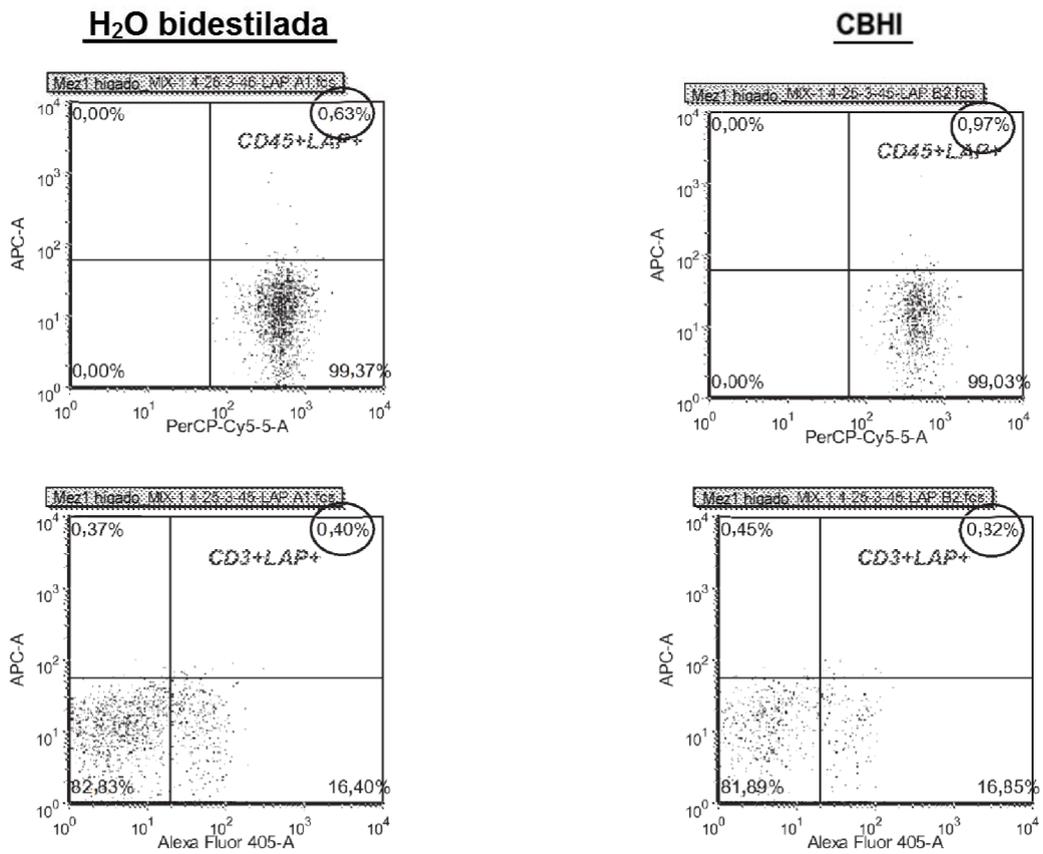


FIGURA 4A

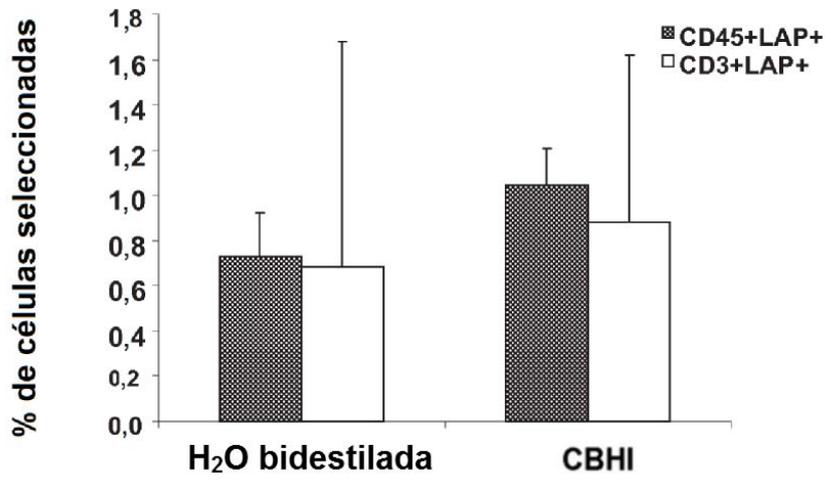


FIGURA 4B

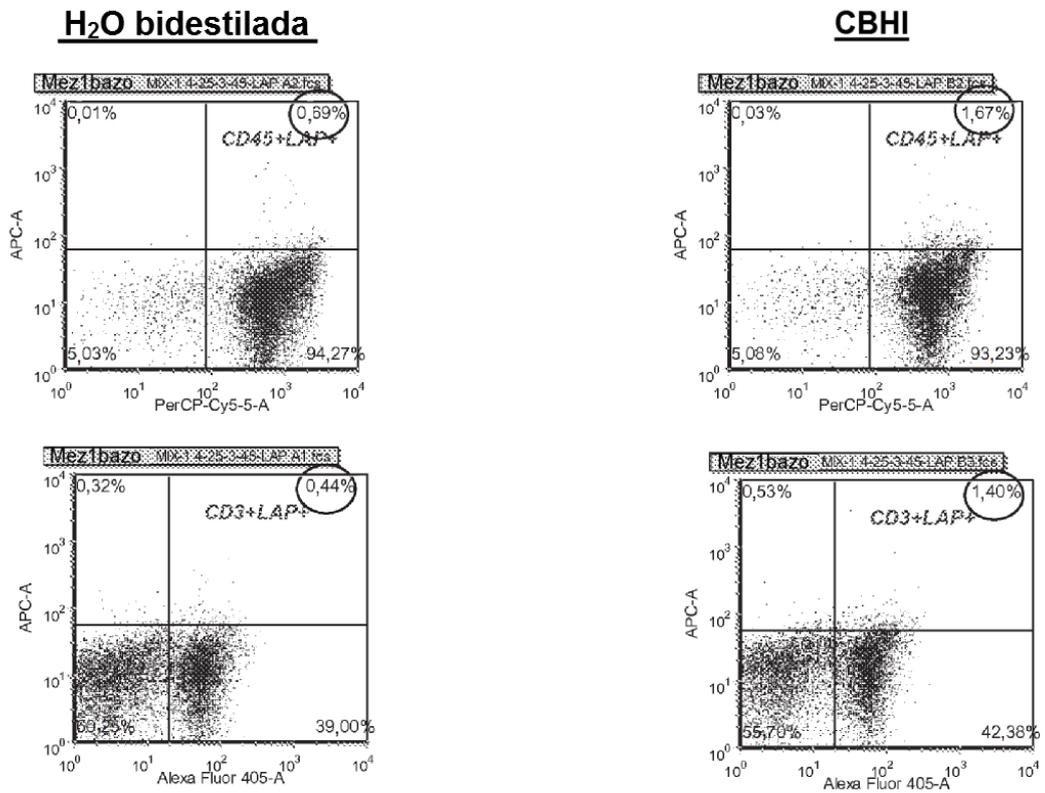


FIGURA 5

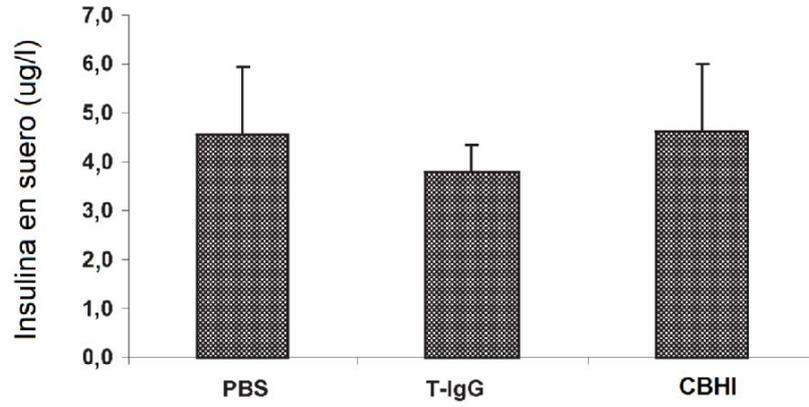


FIGURA 6

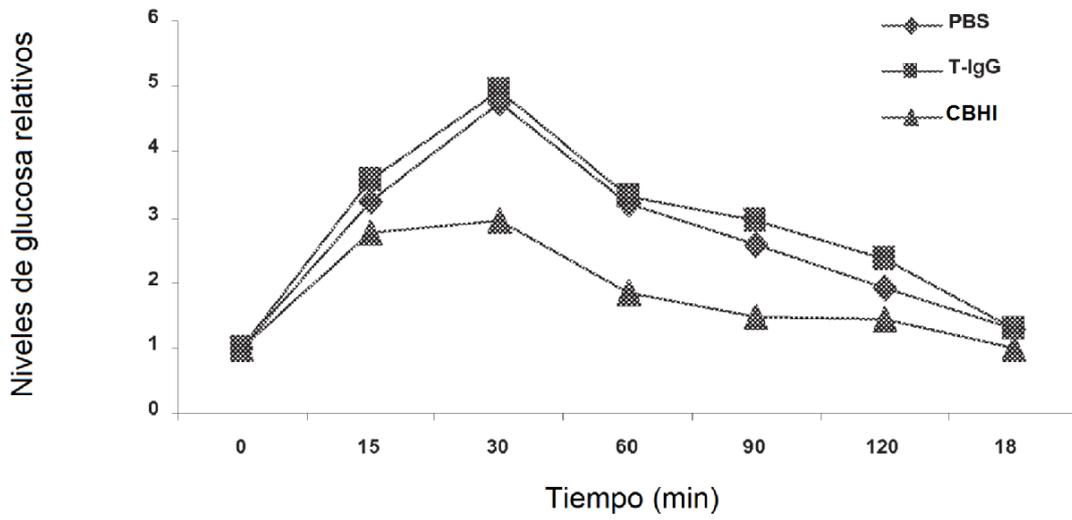


FIGURA 7

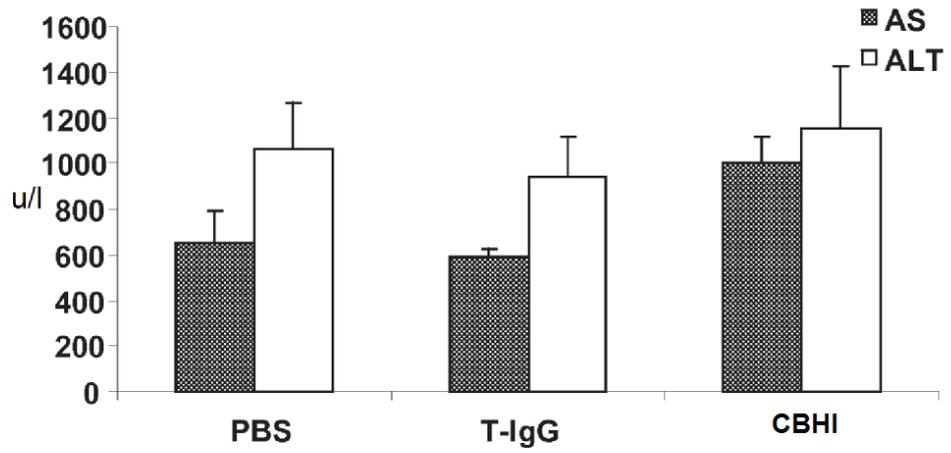


FIGURA 8

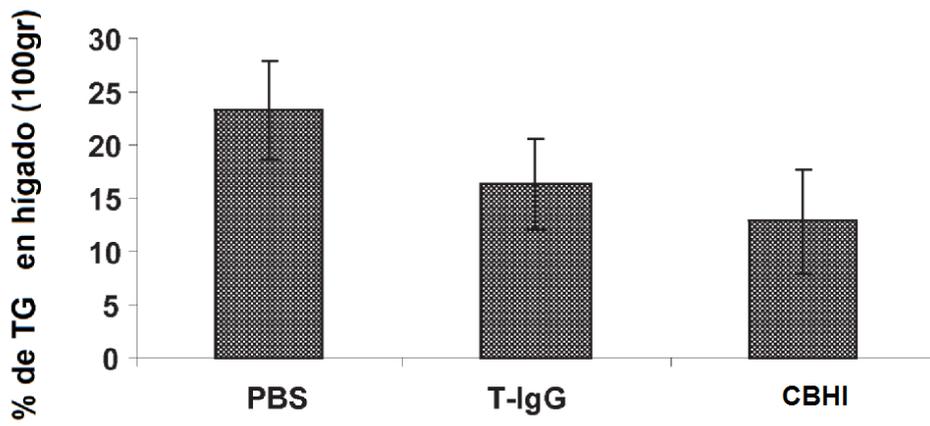


FIGURA 9A

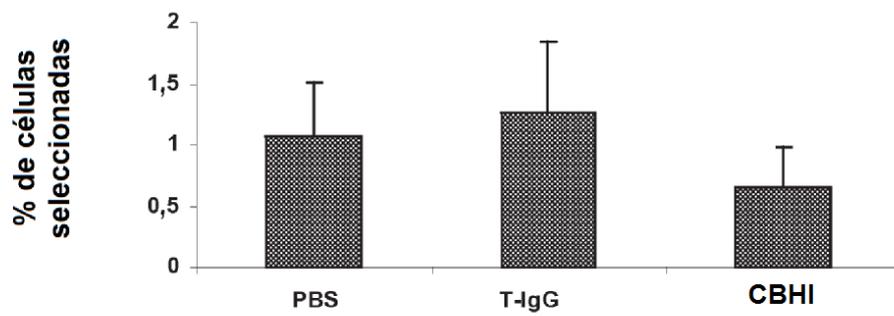


FIGURA 9B

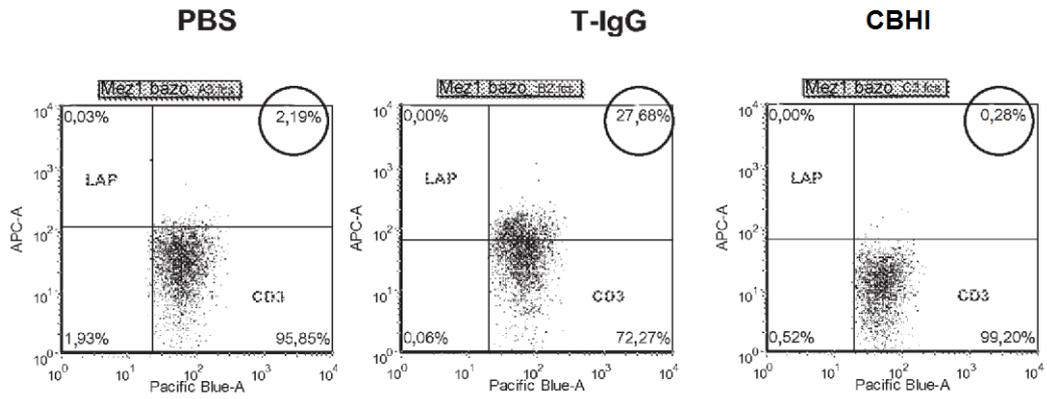


FIGURA 10

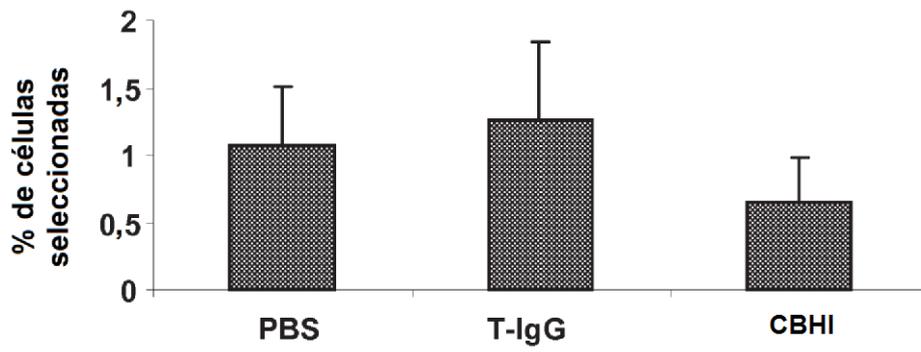


FIGURA 11

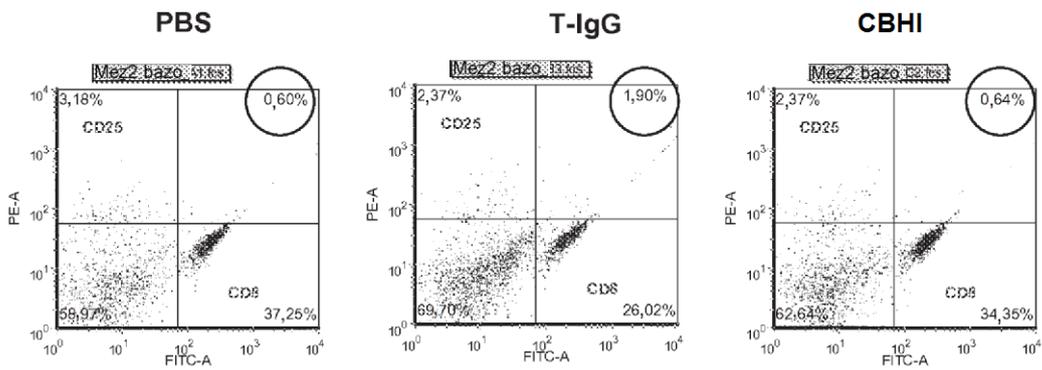


FIGURA 12A

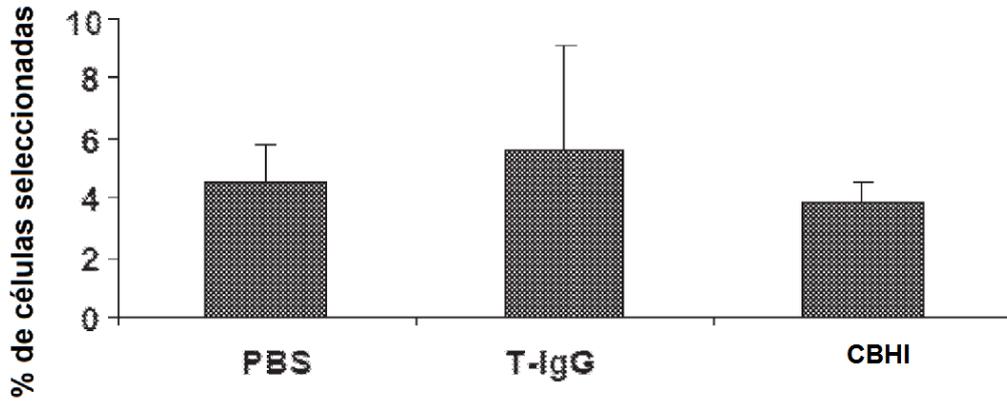


FIGURA 12B

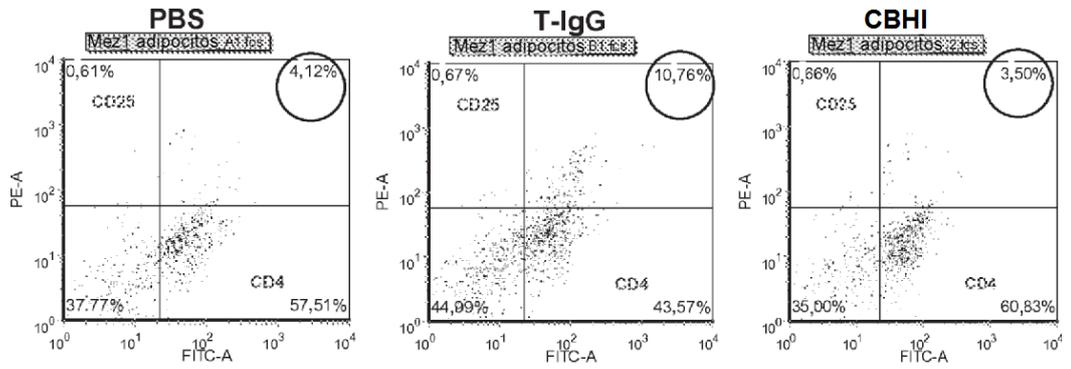


FIGURA 13A

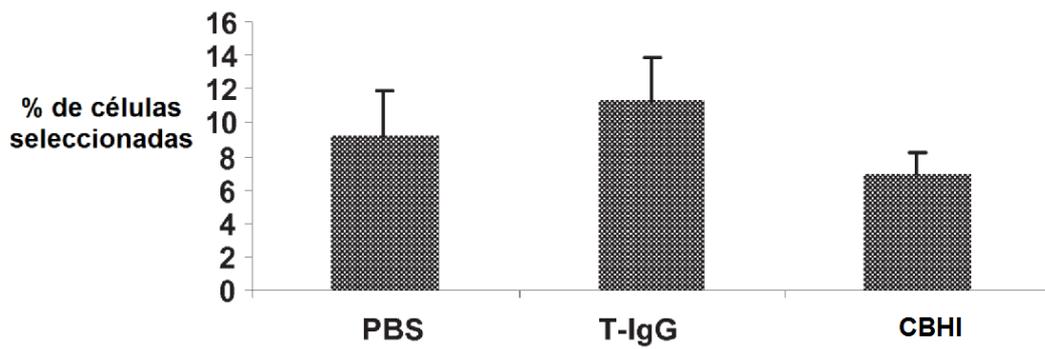


FIGURA 13B

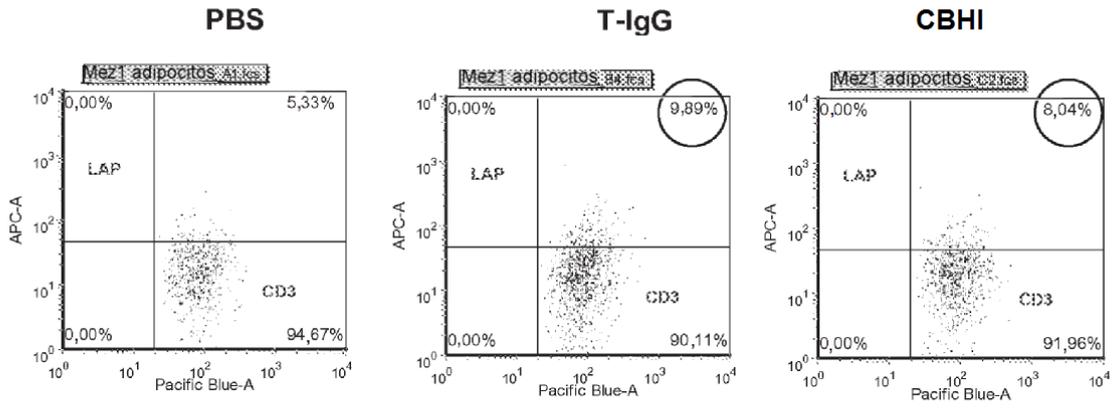


FIGURA 14A

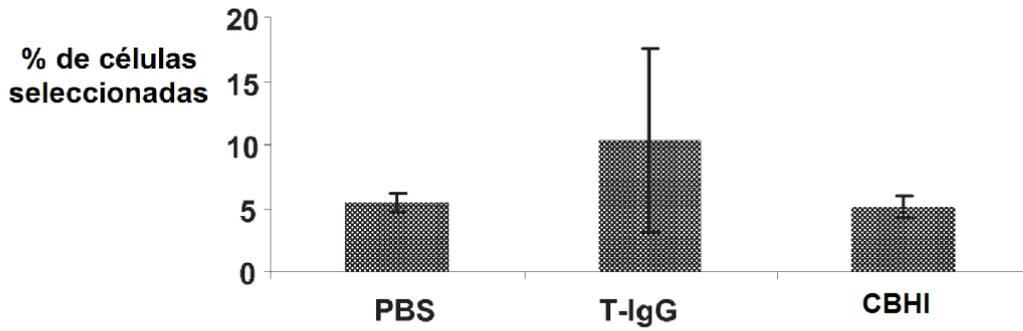


FIGURA 14B

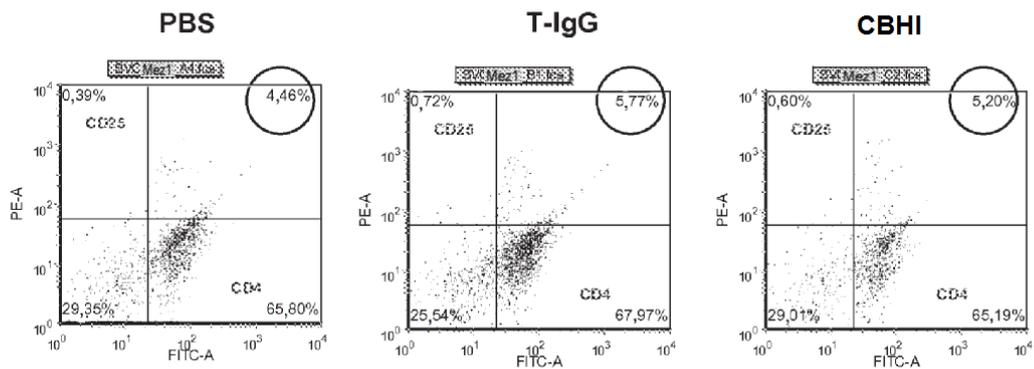


FIGURA 15A

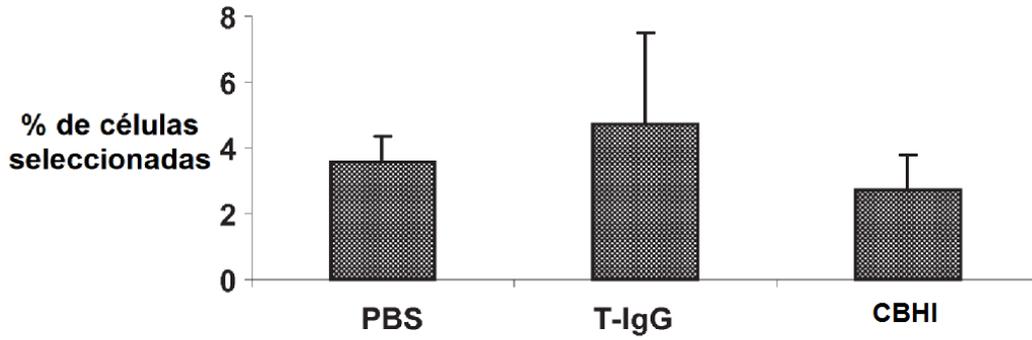


FIGURA 15B

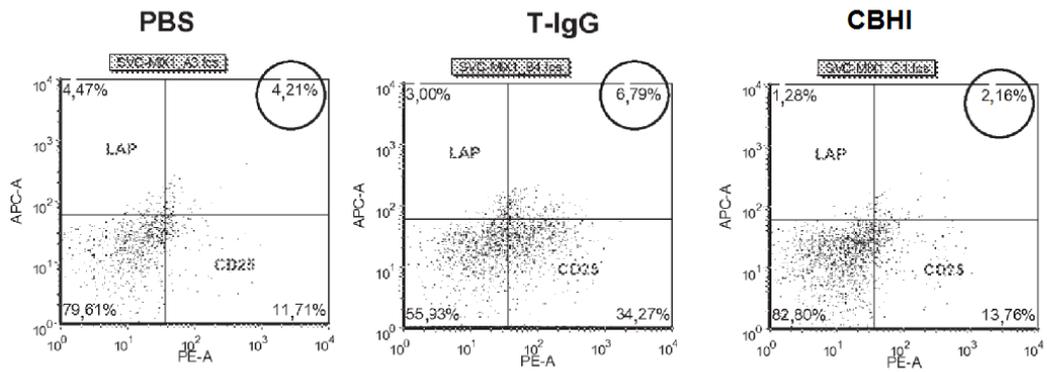


FIGURA 16

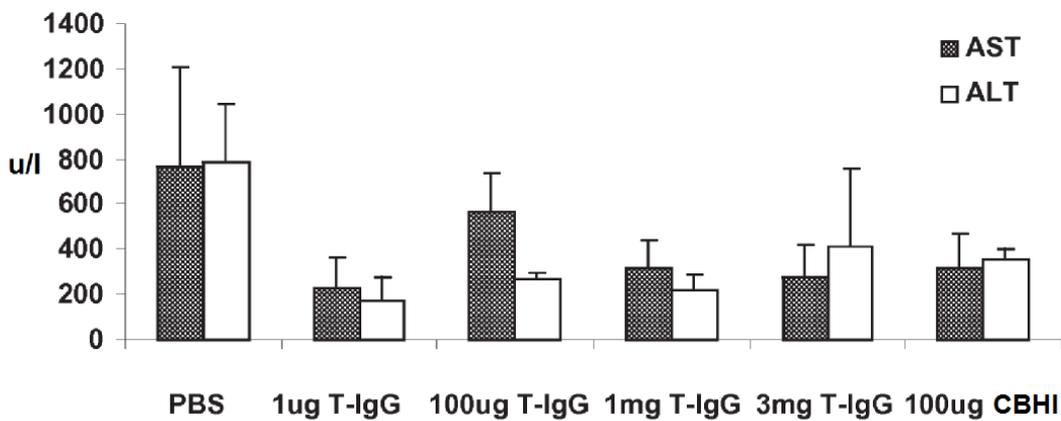


FIGURA 17

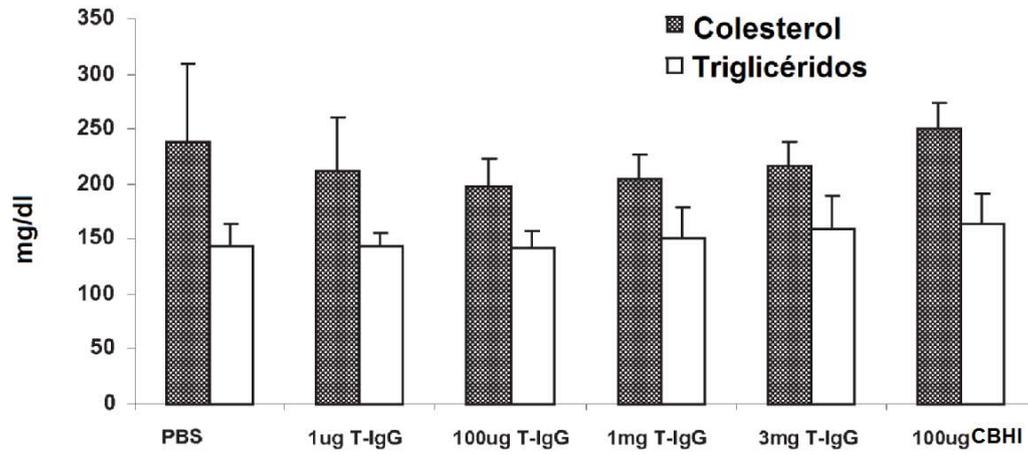
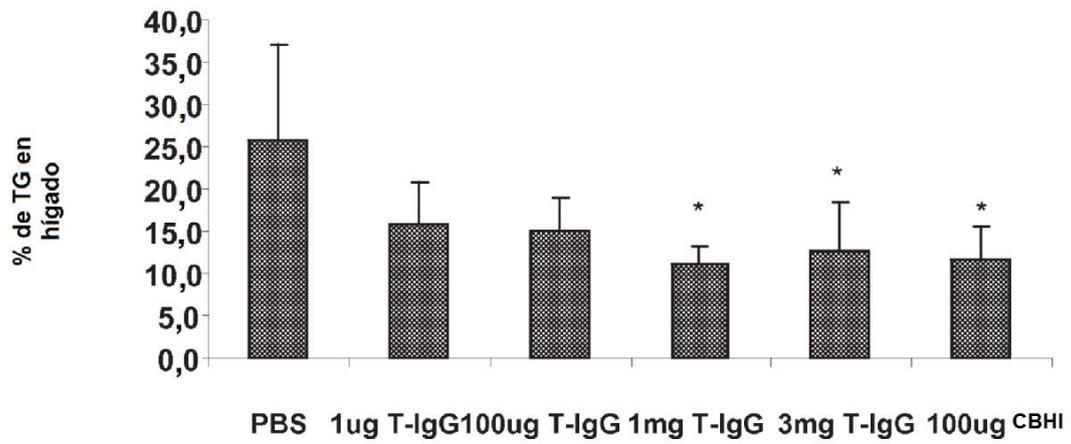
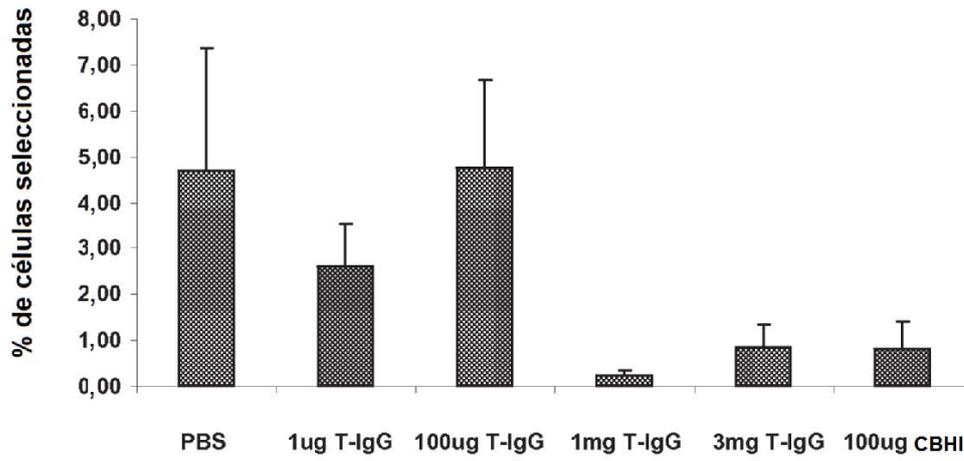


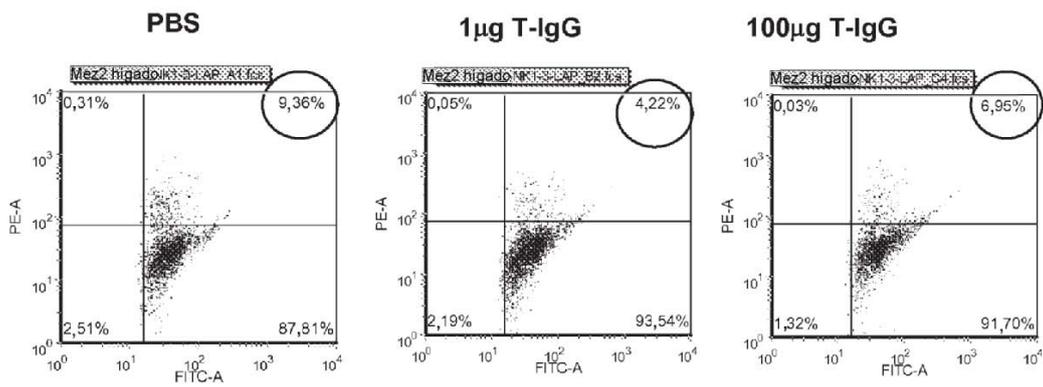
FIGURA 18



**FIGURA 19A**

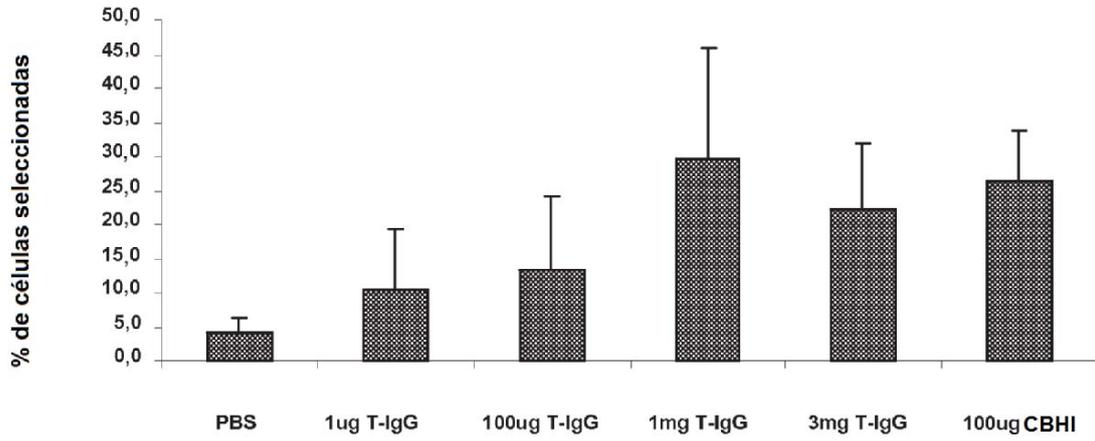


**FIGURA 19B**



**FIGURA 20A**

Hígado: CD4+CD25+LAP-



Hígado: CD4+CD25+LAP+

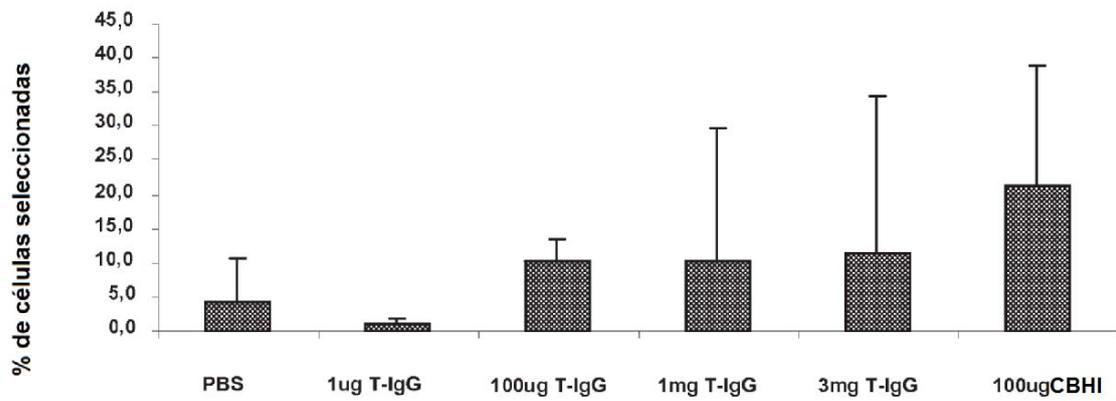


FIGURA 20B

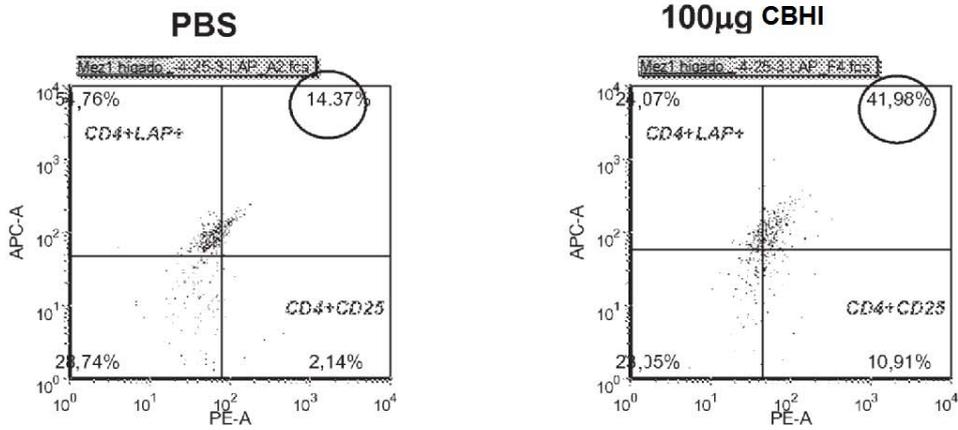


FIGURA 21

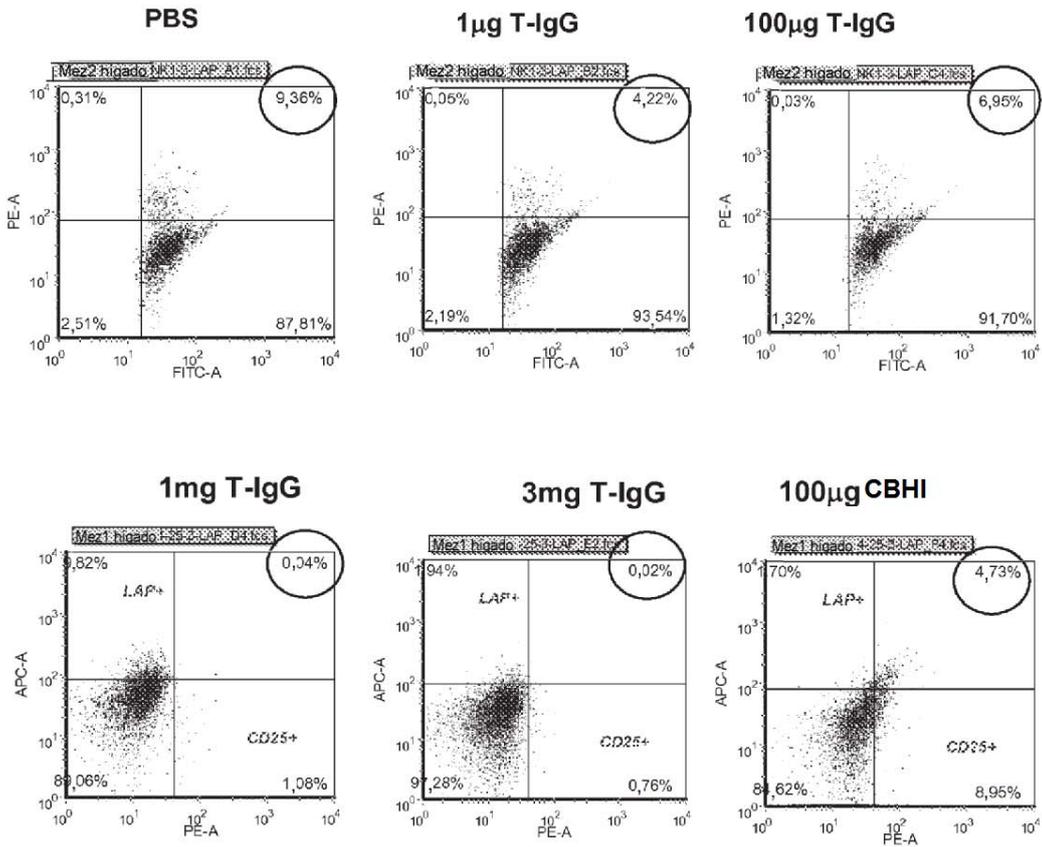


FIGURA 22A

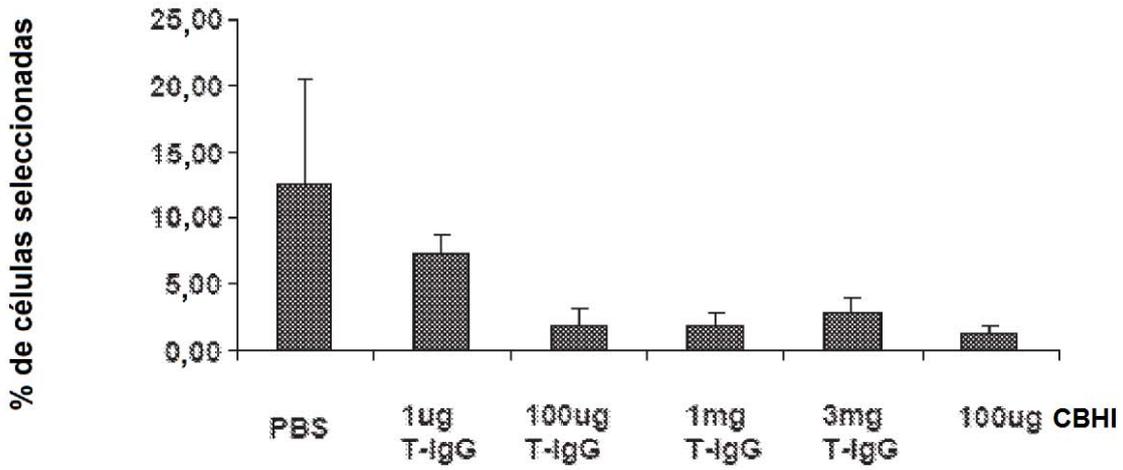


FIGURA 22B

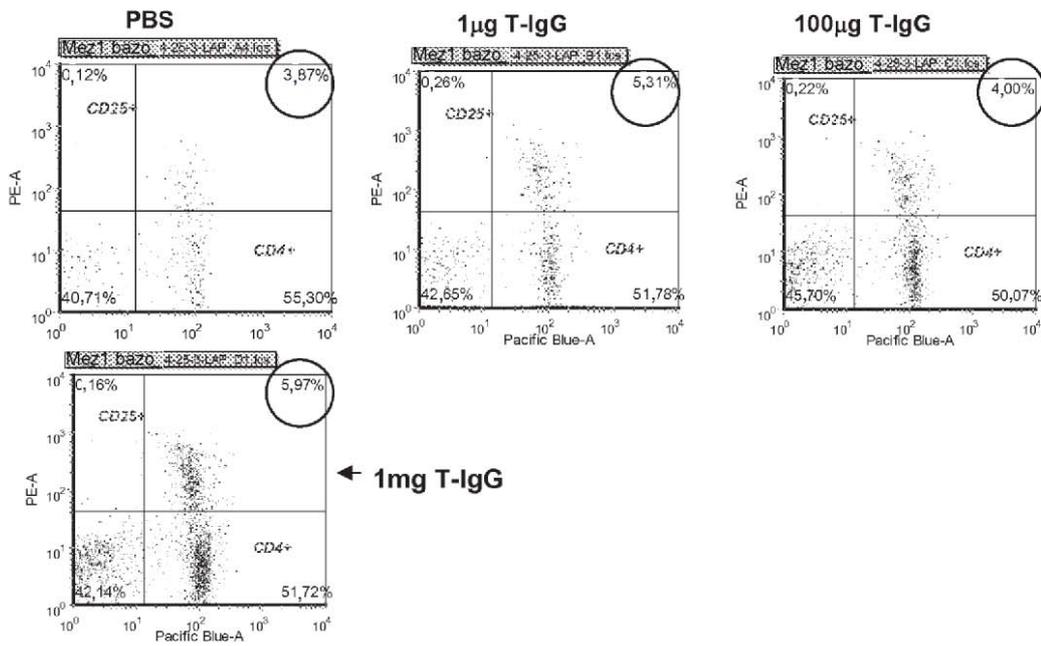


FIGURA 23

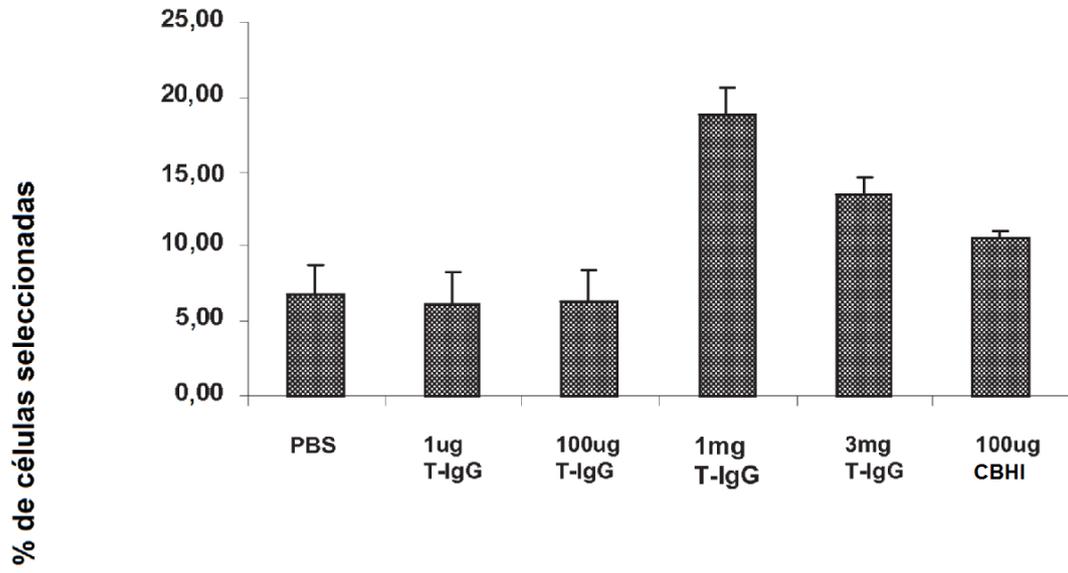


FIGURA 24

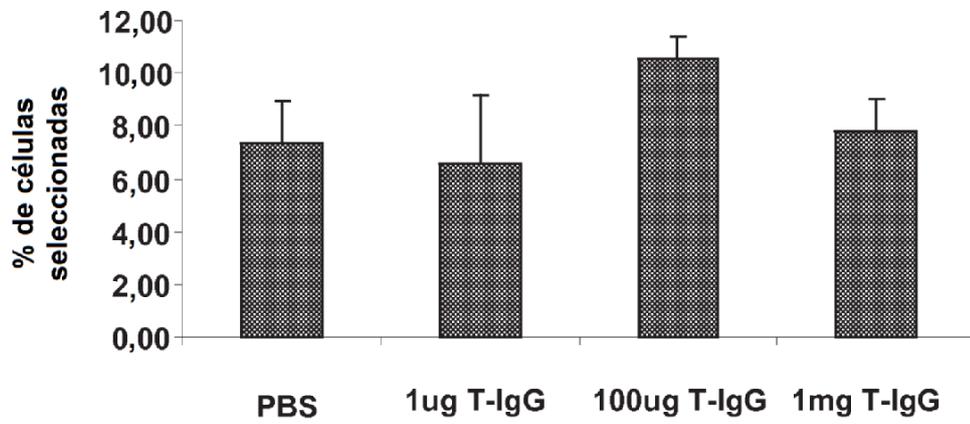


FIGURA 25A

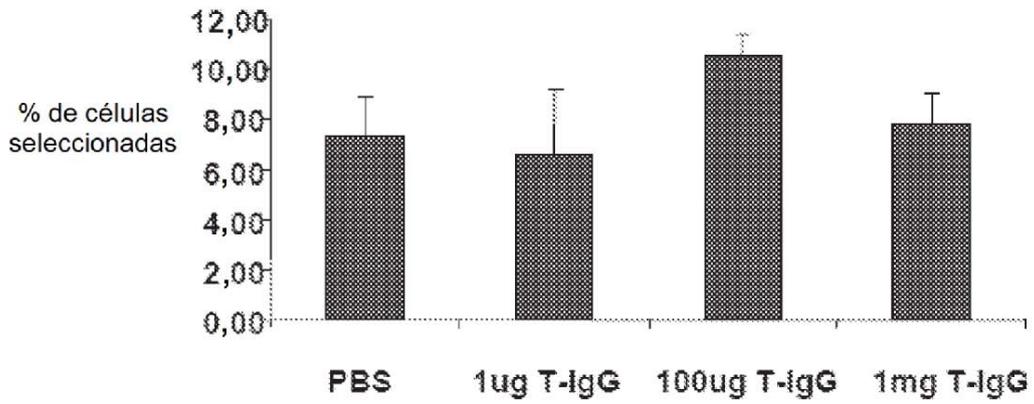


FIGURA 25B

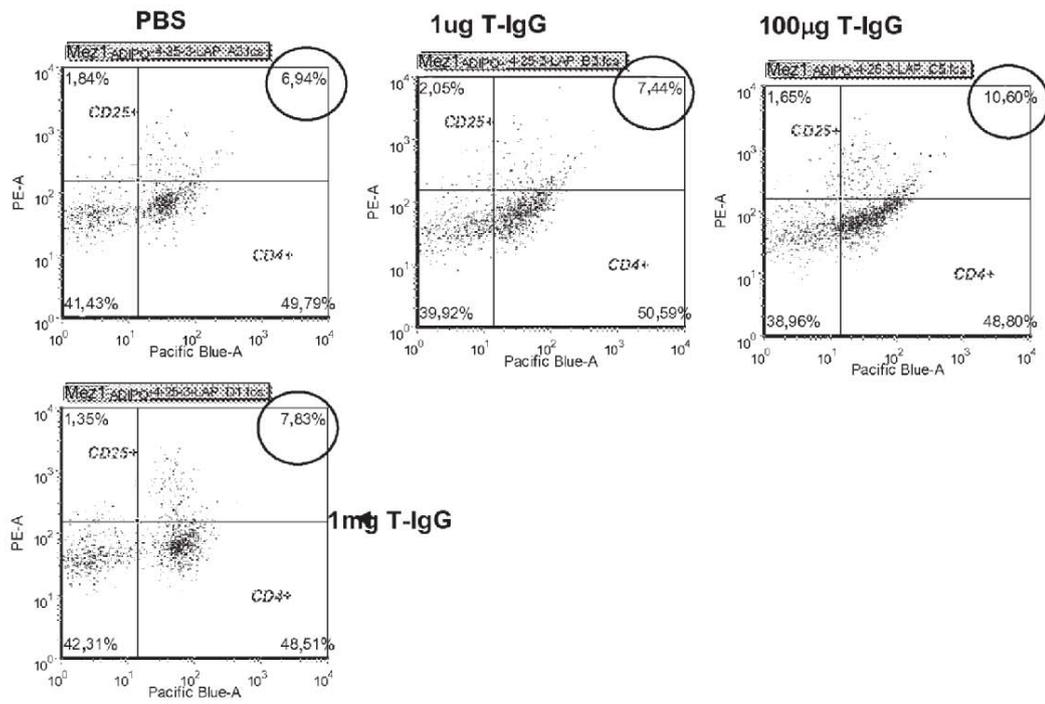


FIGURA 26A

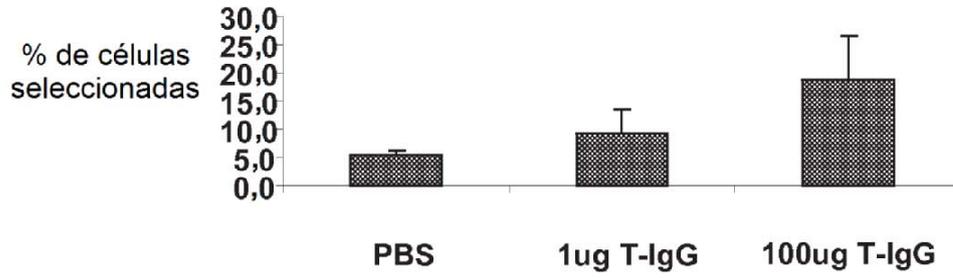


FIGURA 26B

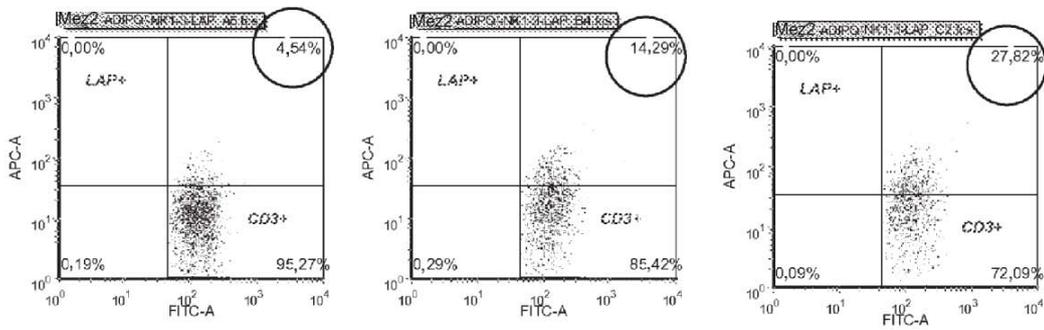


FIGURA 27A

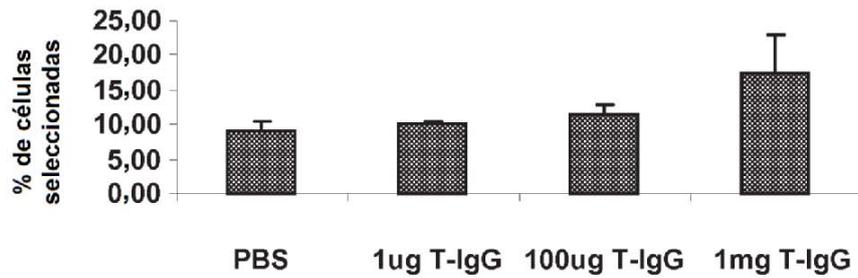


FIGURA 27B

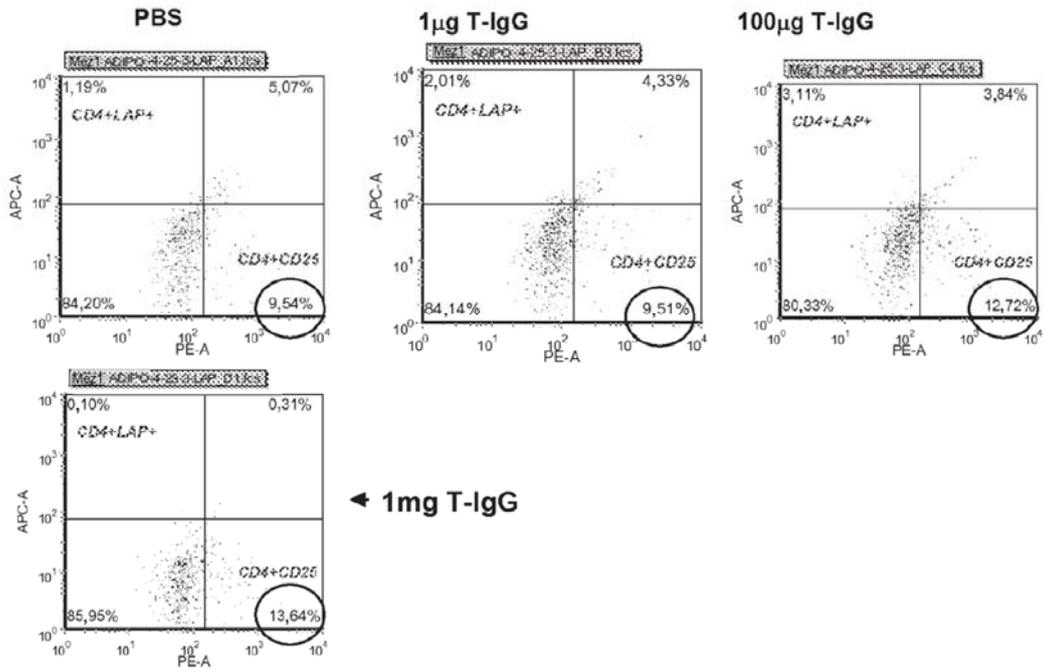


FIGURA 28A

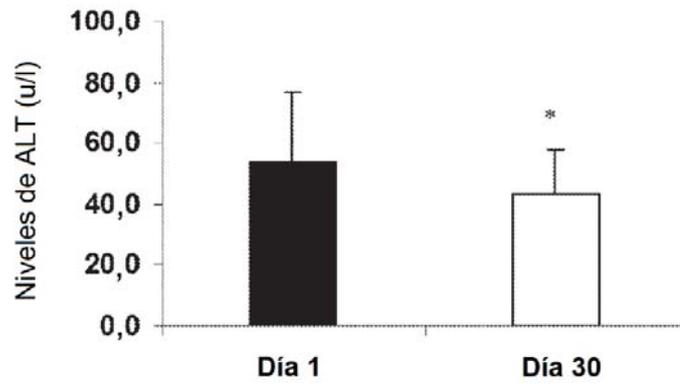


FIGURA 28B

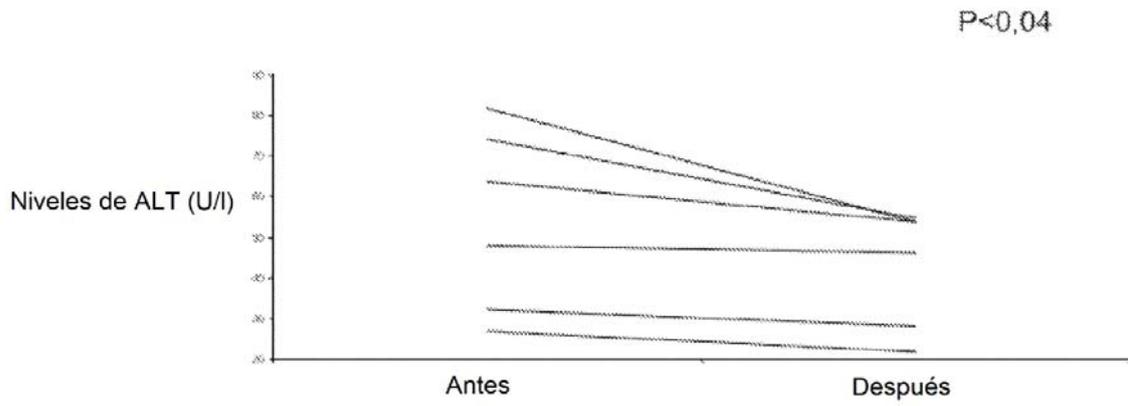


FIGURA 29A

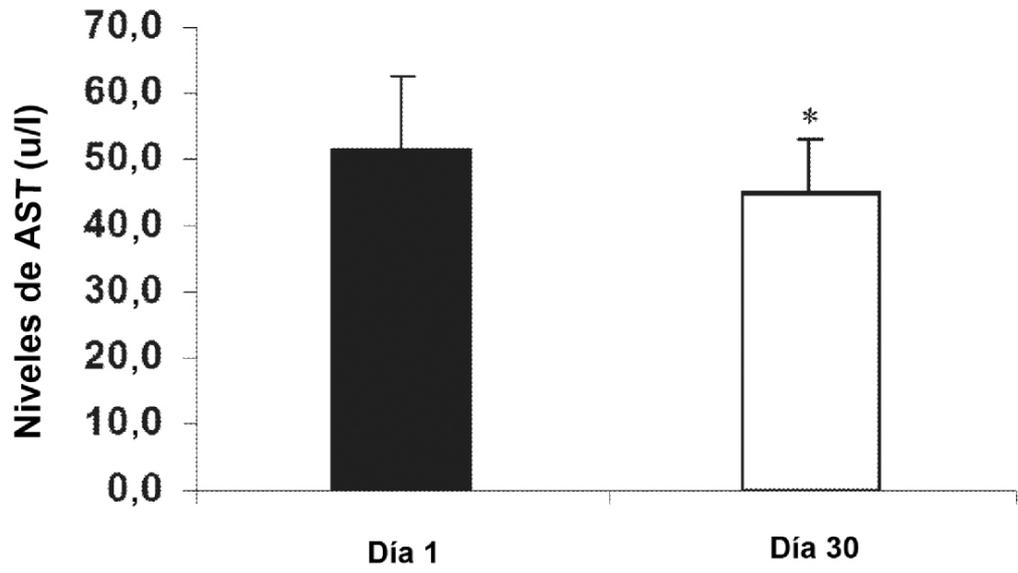


FIGURA 29B

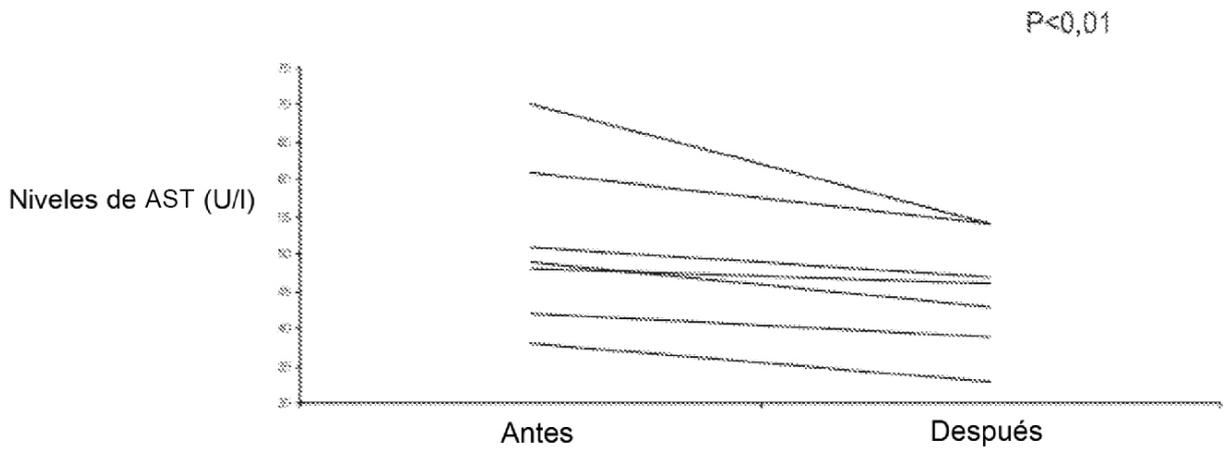


FIGURA 30A

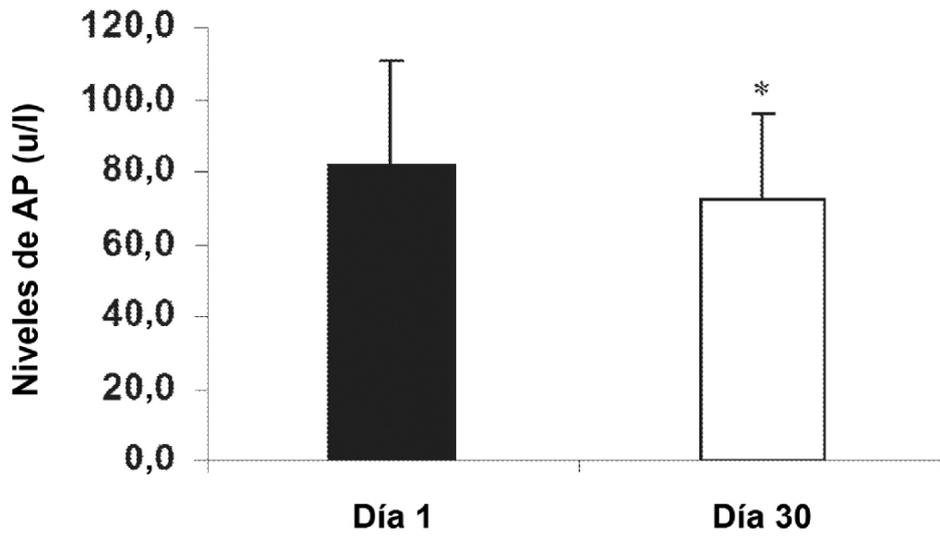


FIGURA 30B

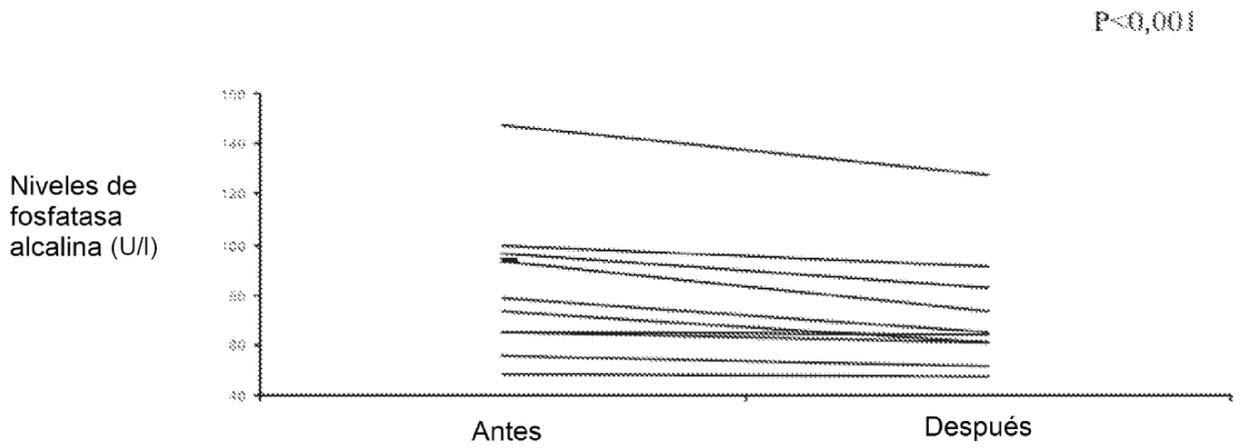


FIGURA 31A

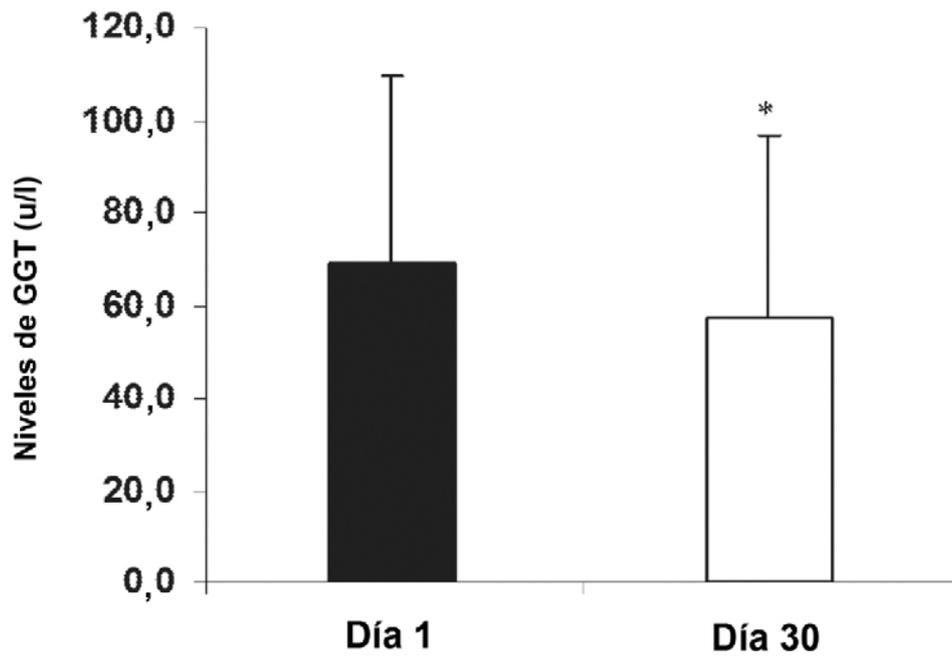


FIGURA 31B

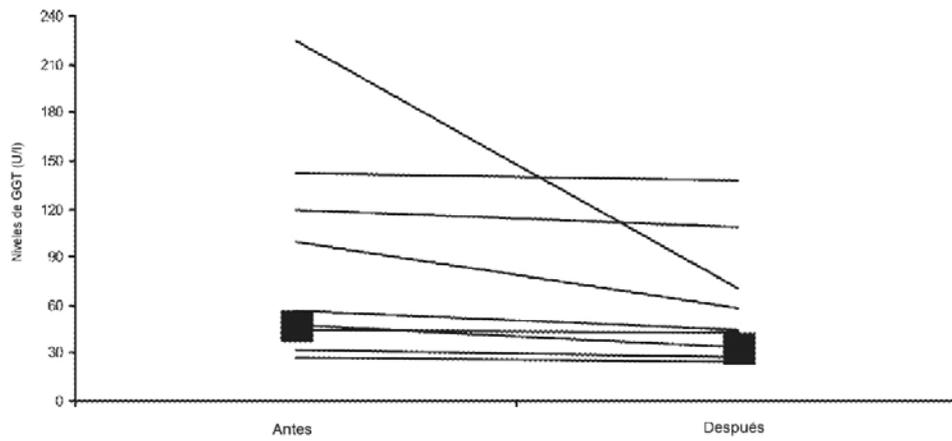


FIGURA 32A

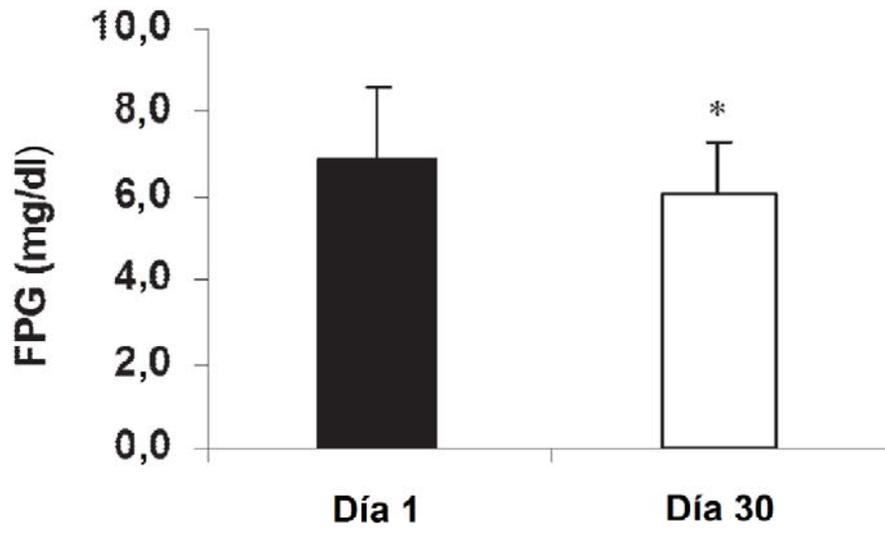


FIGURA 32B

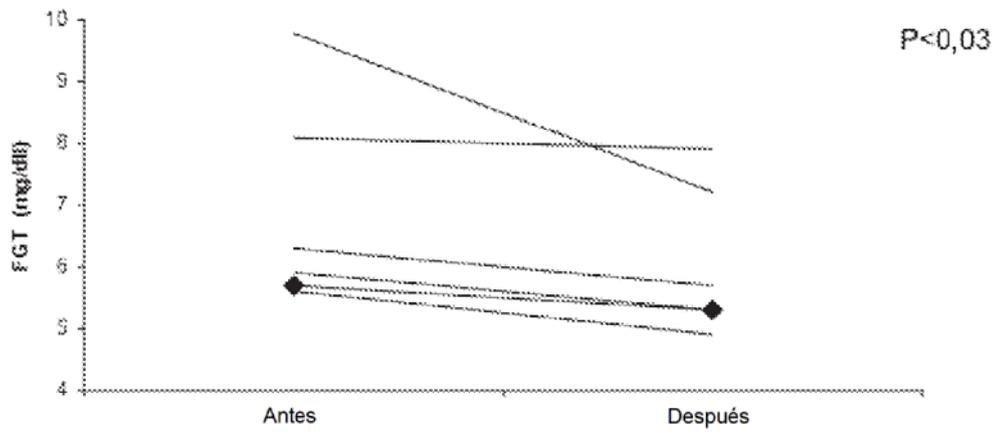


FIGURA 33A

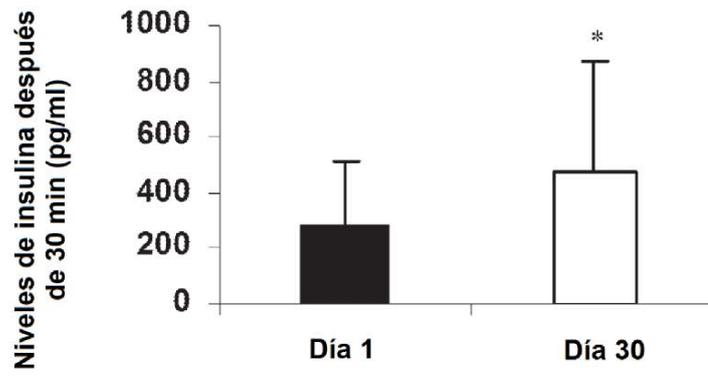


FIGURA 33B

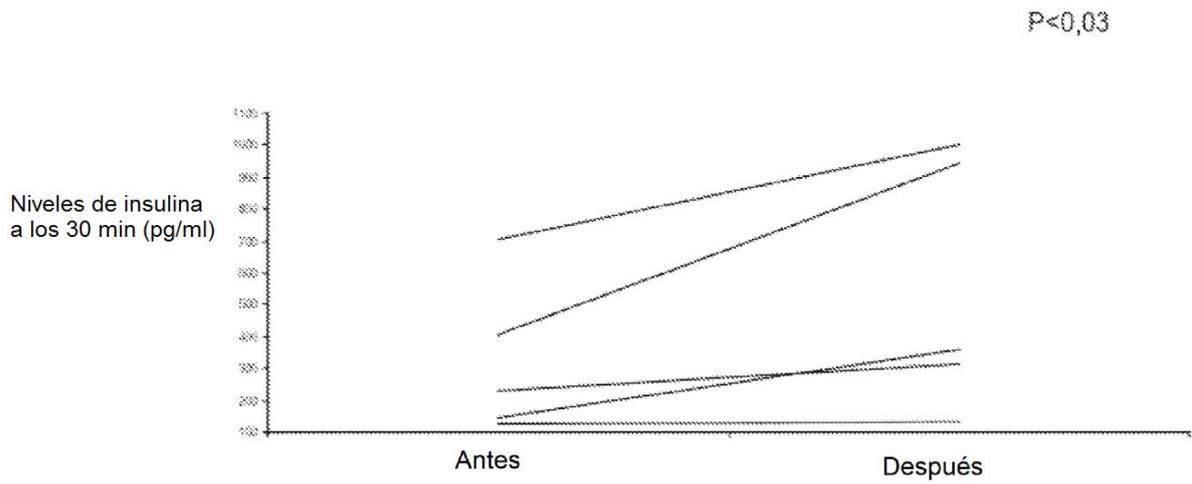


FIGURA 34A

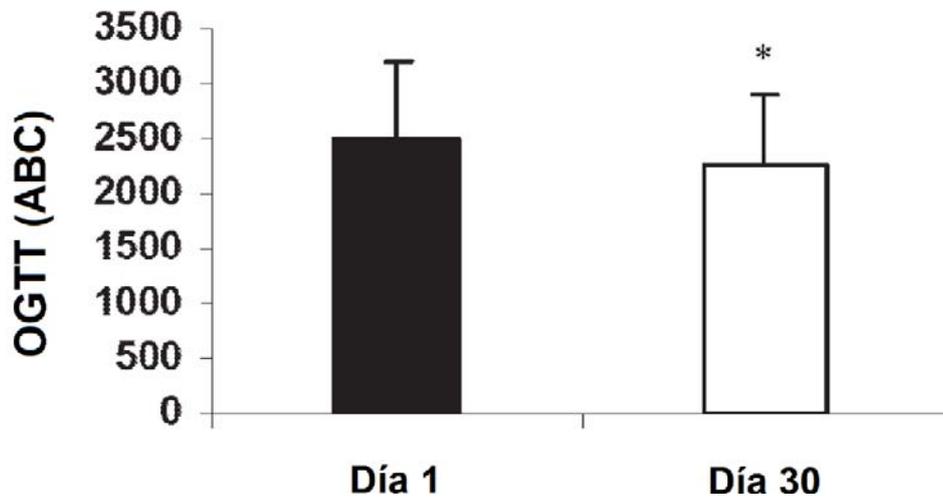


FIGURA 34B

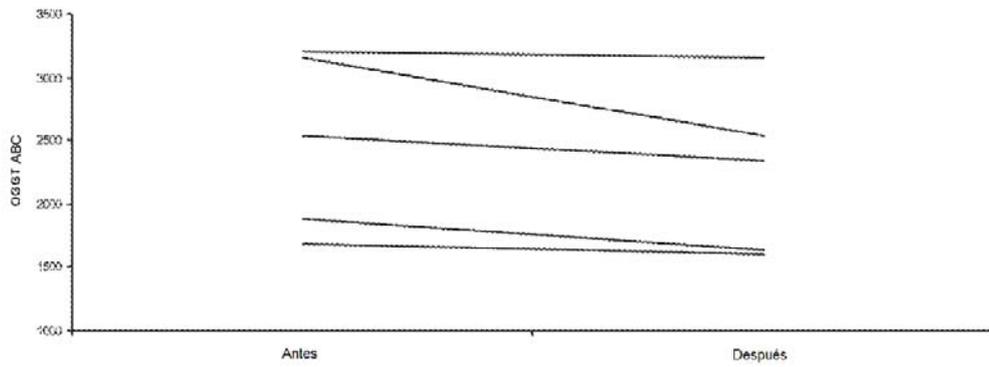


FIGURA 35A

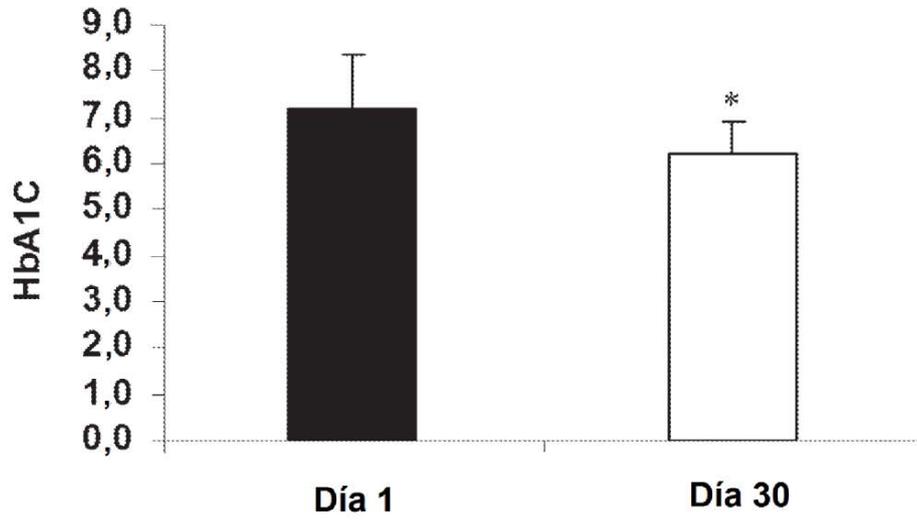


FIGURA 35B

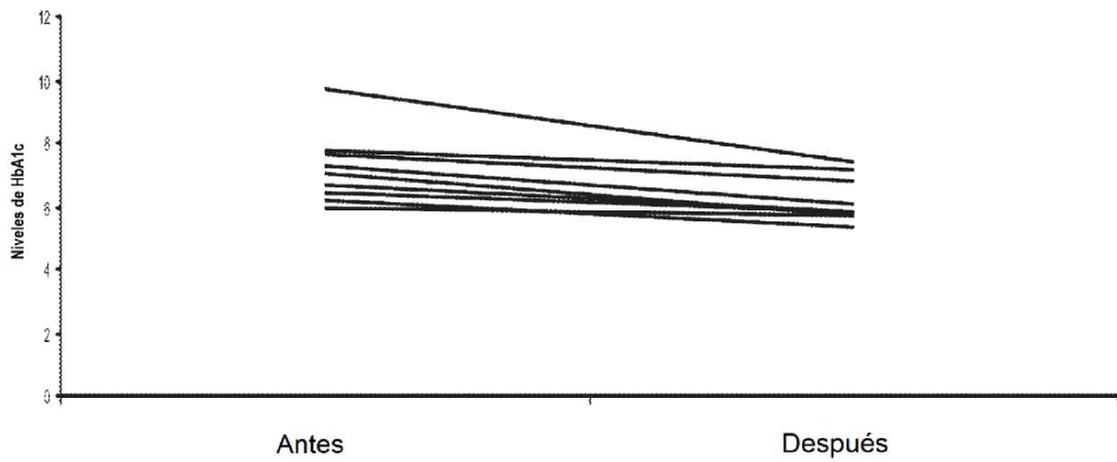


FIGURA 36A

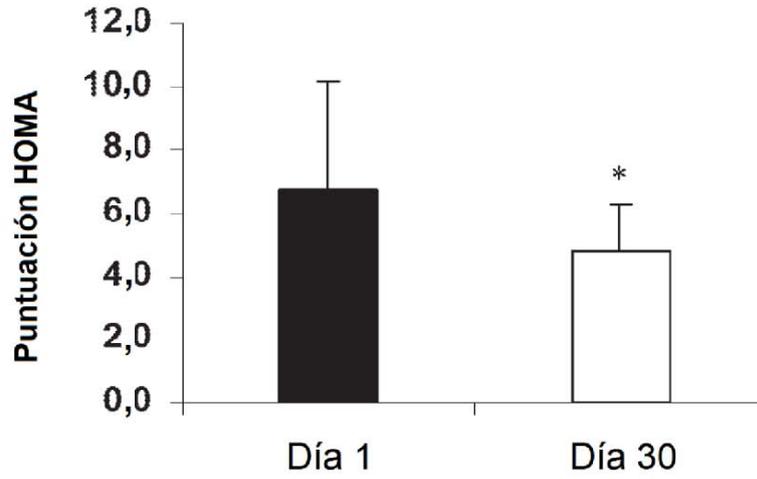


FIGURA 36B

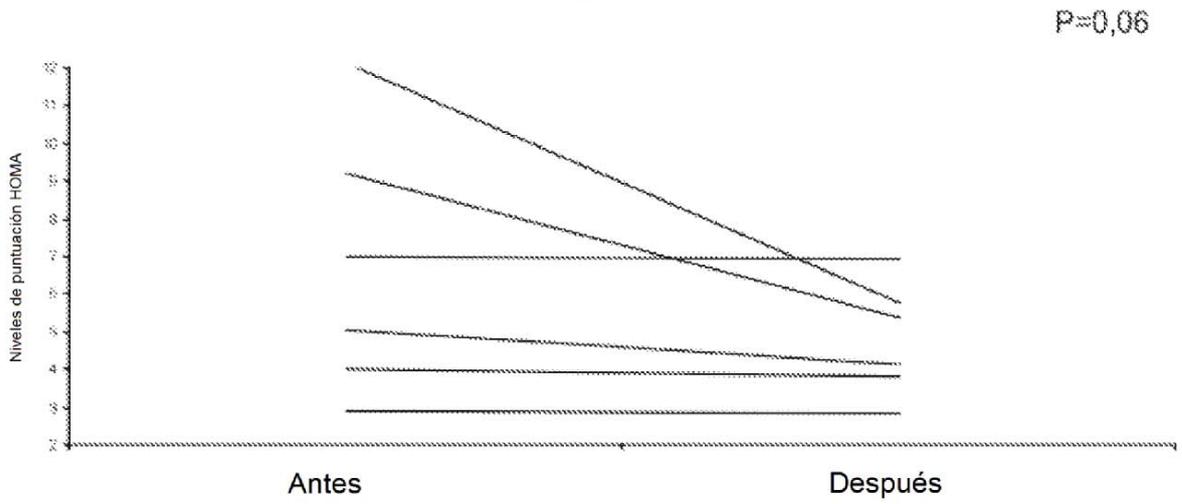


FIGURA 37A

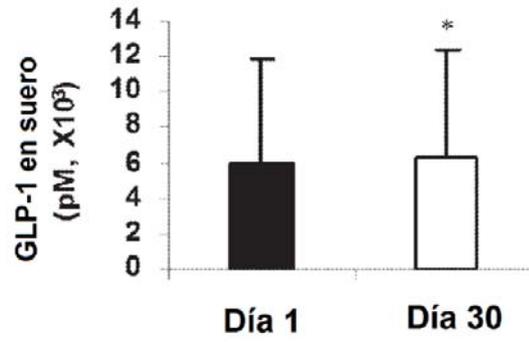


FIGURA 37B

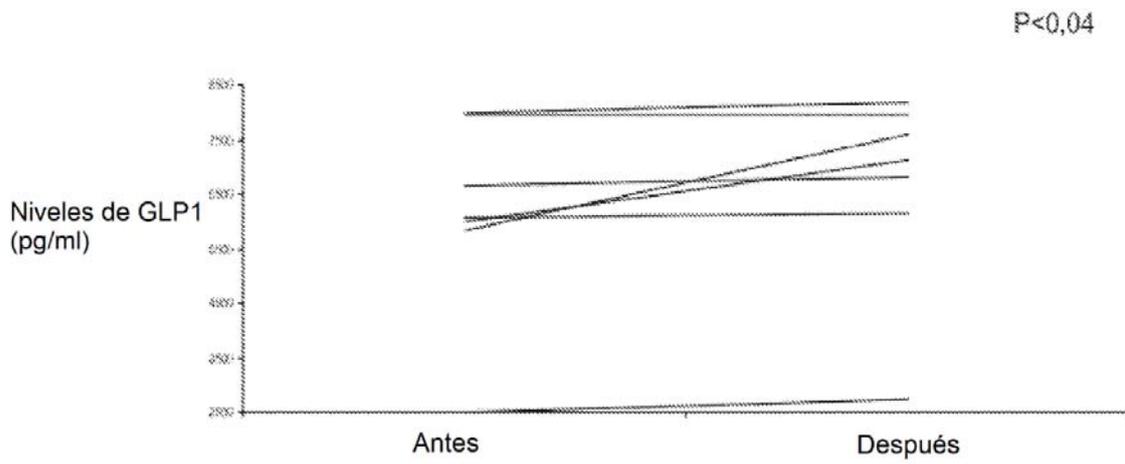


FIGURA 38A

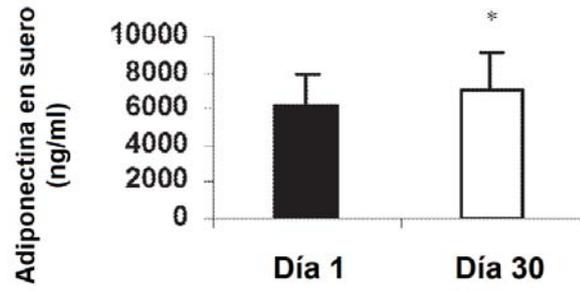


FIGURA 38B

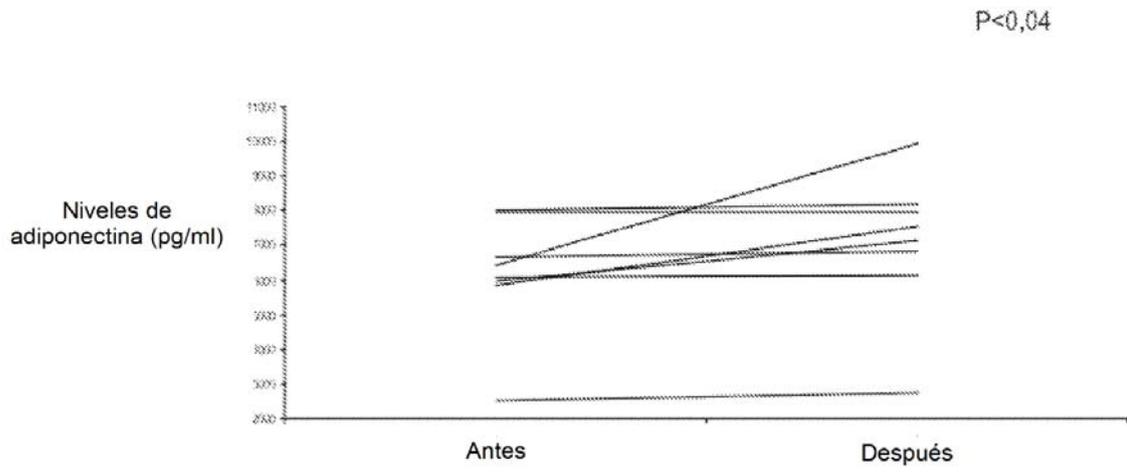


FIGURA 39A

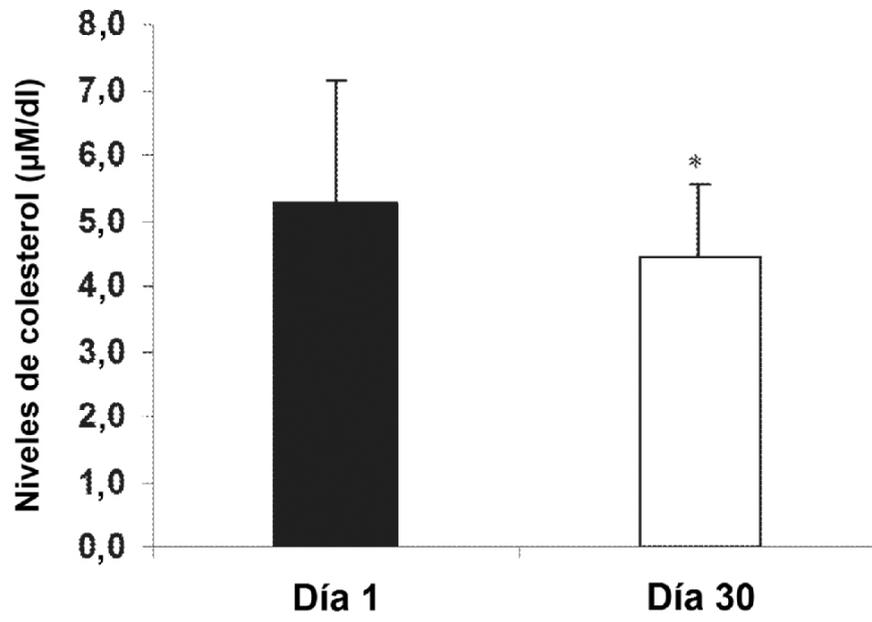


FIGURA 39B

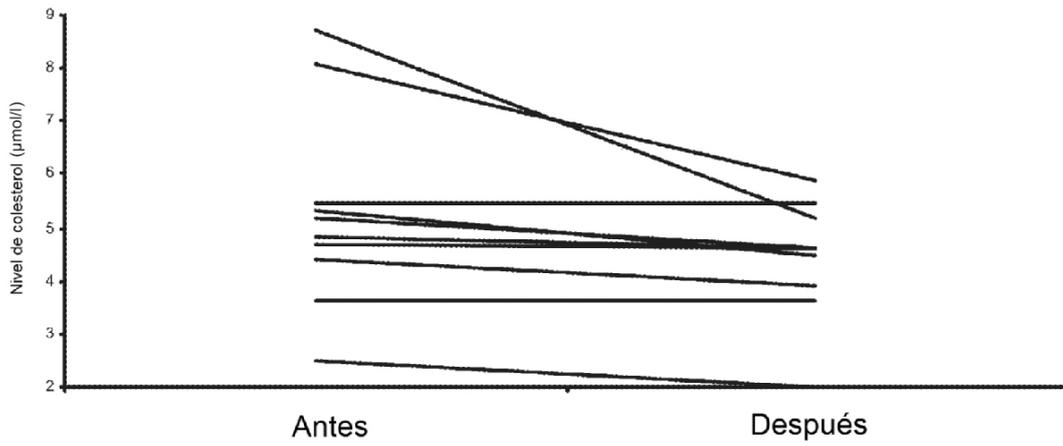


FIGURA 40A

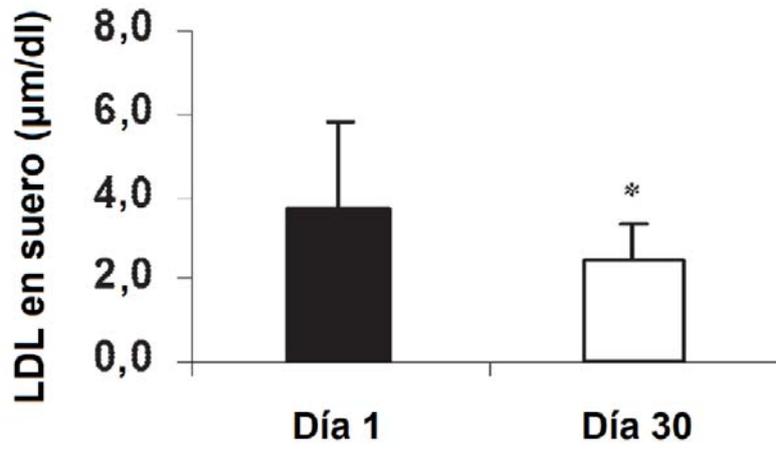


FIGURA 40B

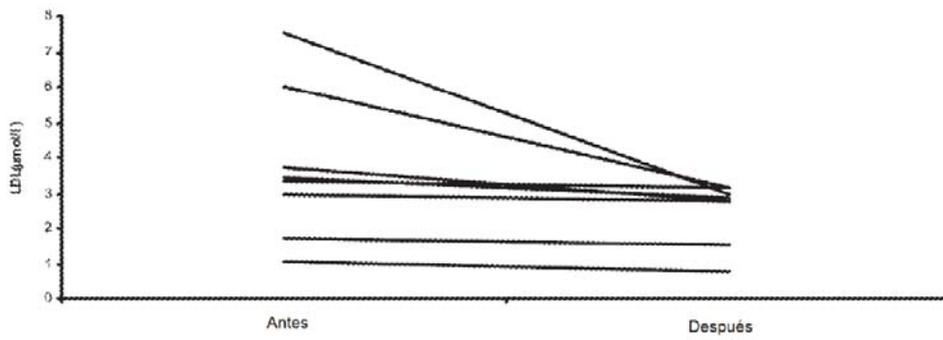


FIGURA 41A

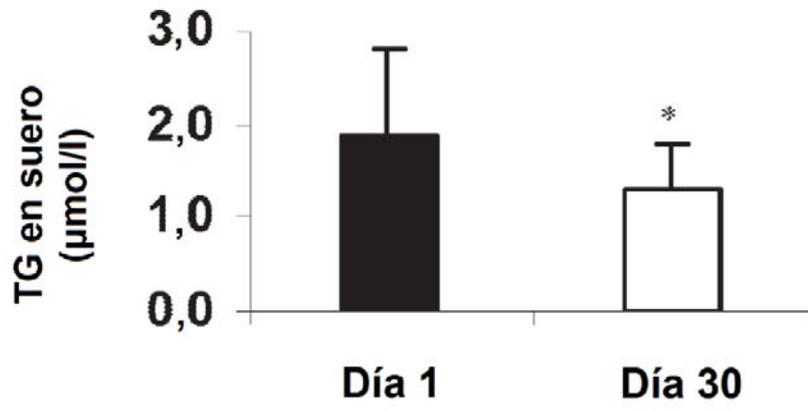


FIGURA 41B

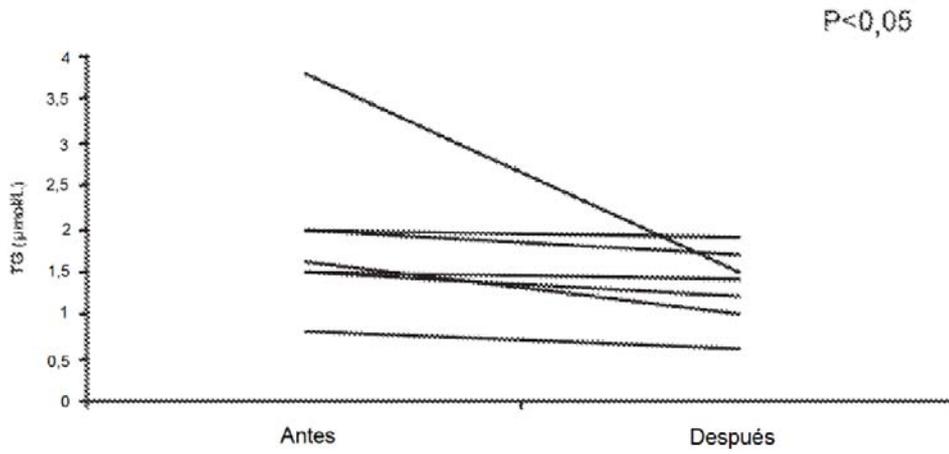


FIGURA 42A

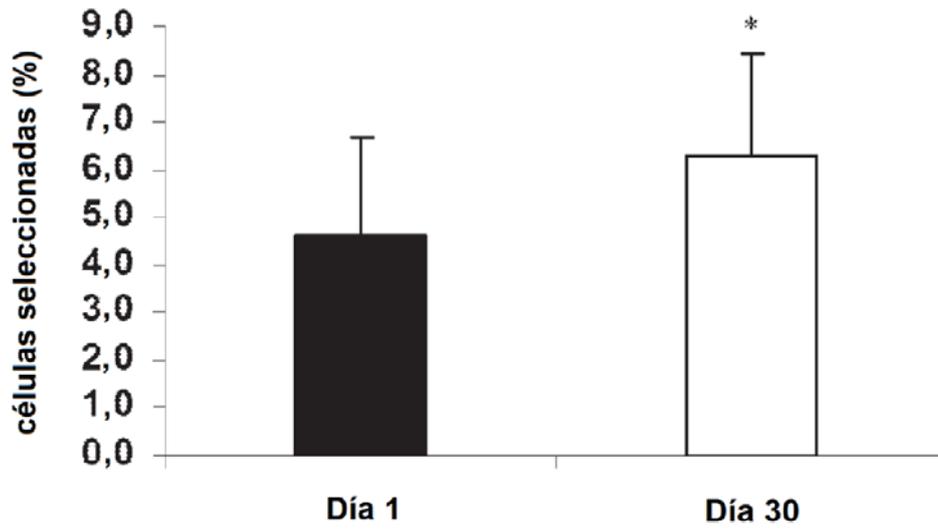


FIGURA 42B

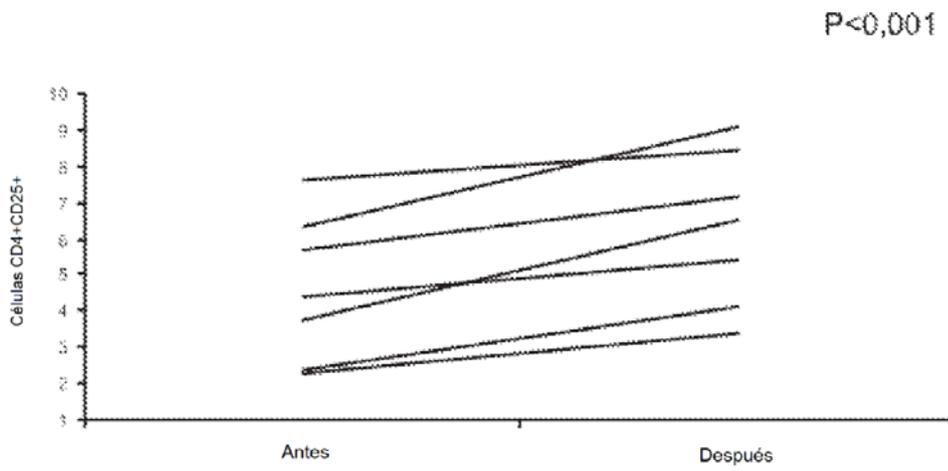


FIGURA 42C

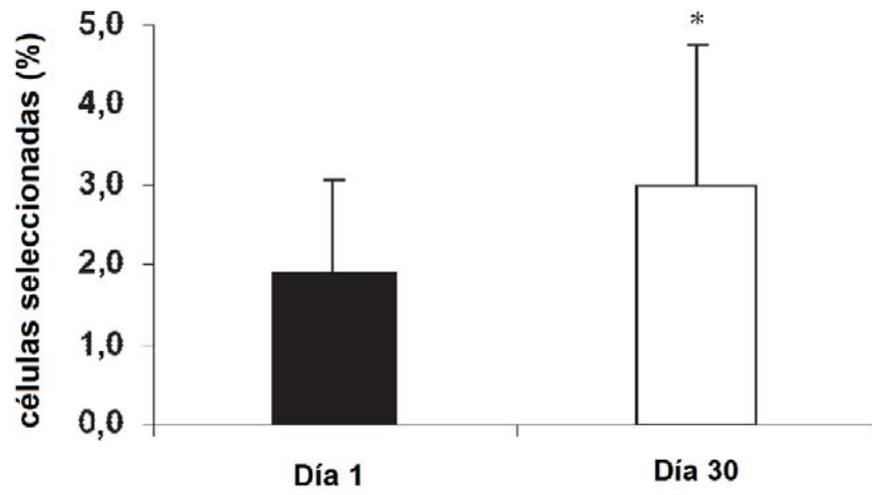


FIGURA 42D

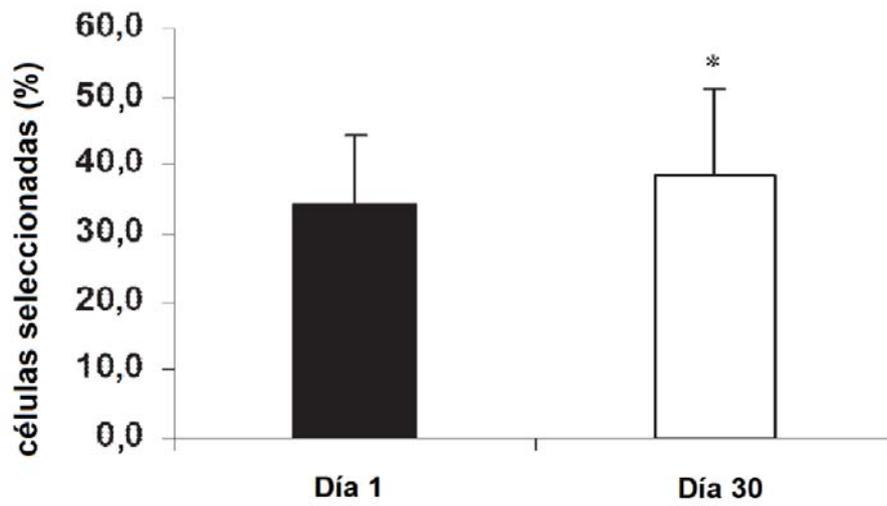


FIGURA 43A

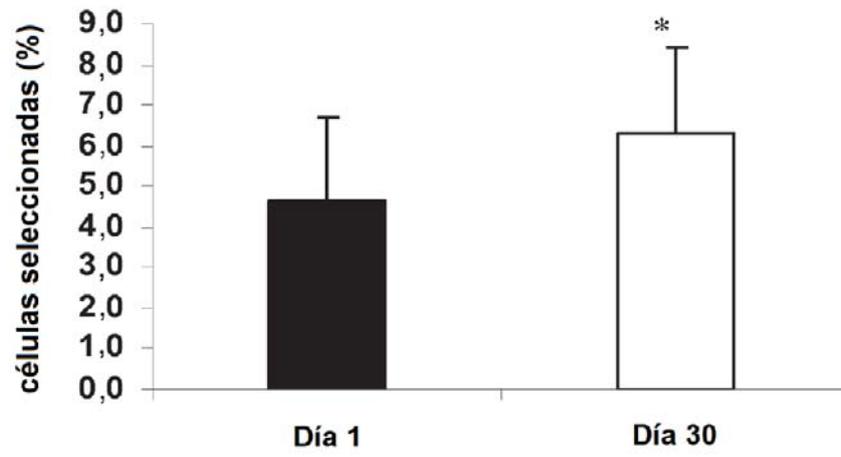


FIGURA 43B

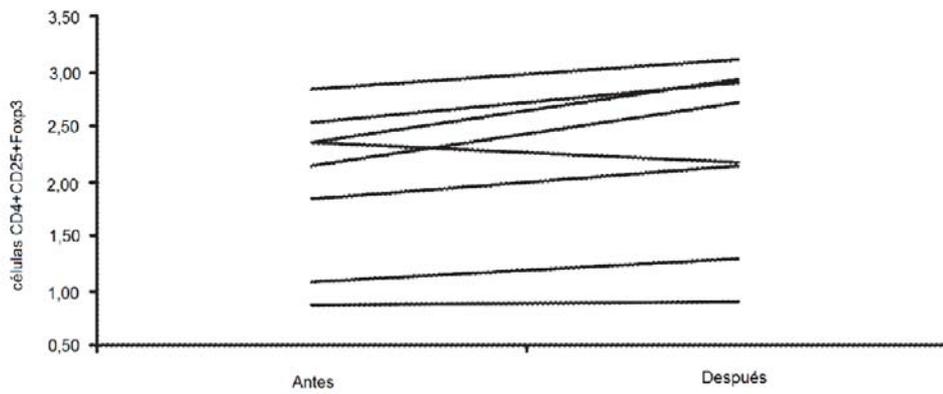


FIGURA 44

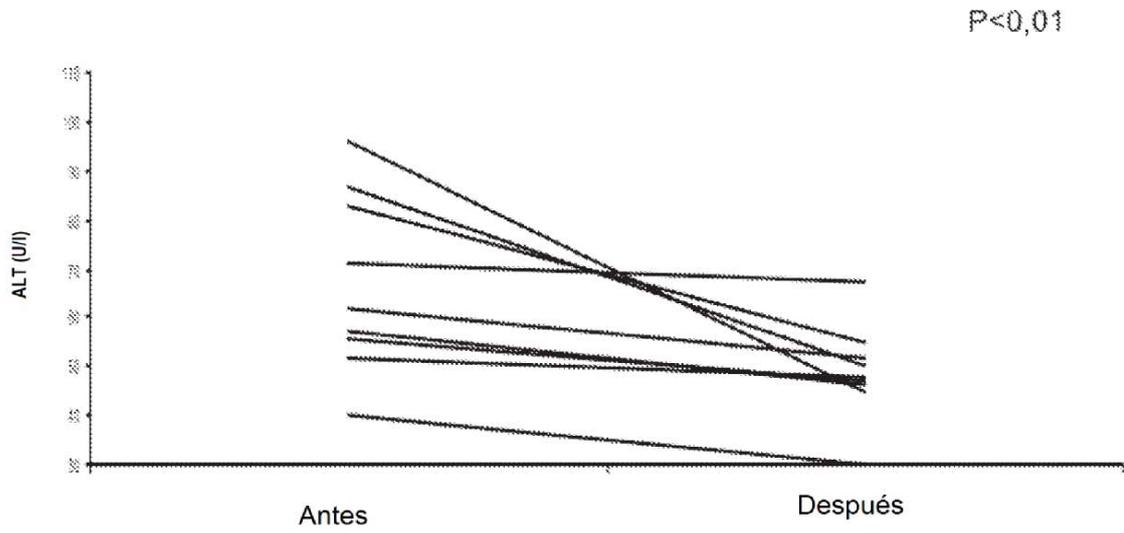


FIGURA 45

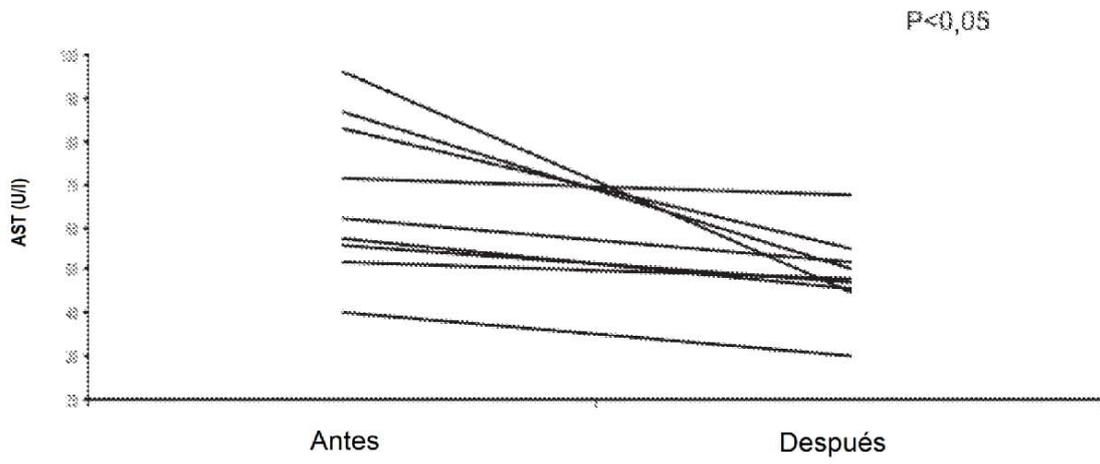


FIGURA 46

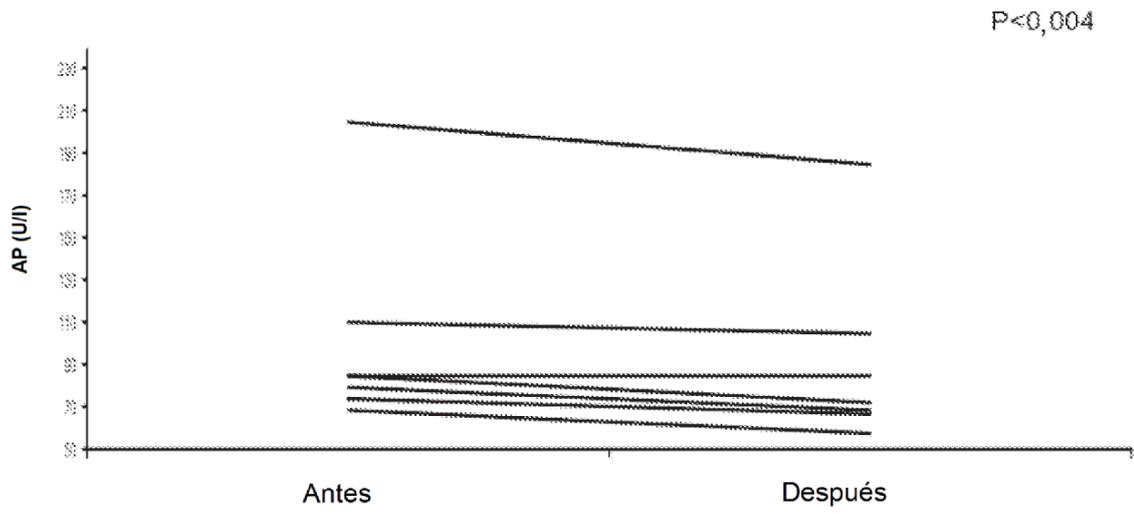


FIGURA 47

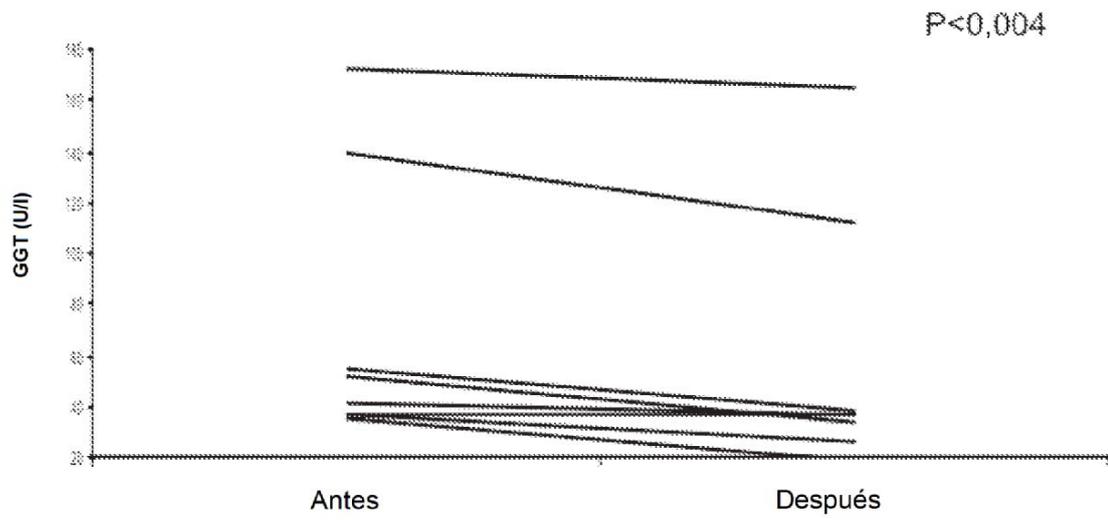


FIGURA 48

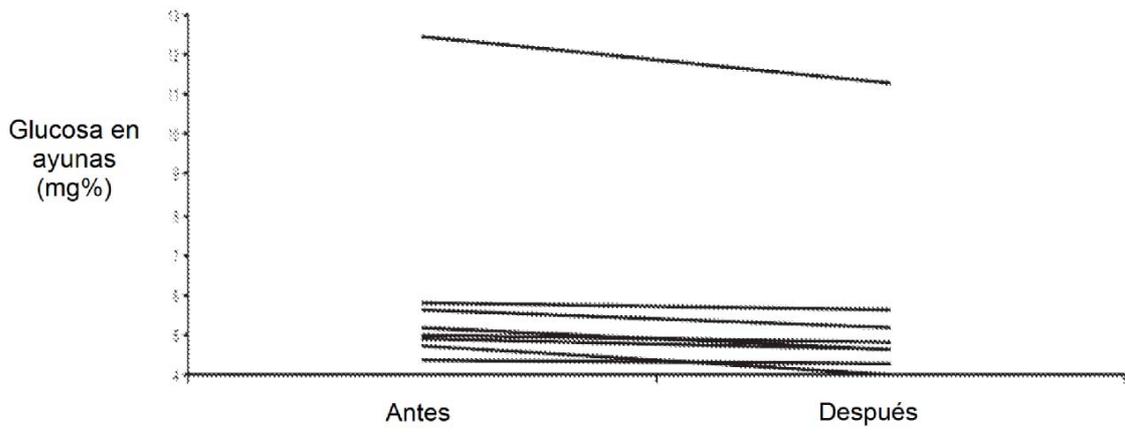


FIGURA 49

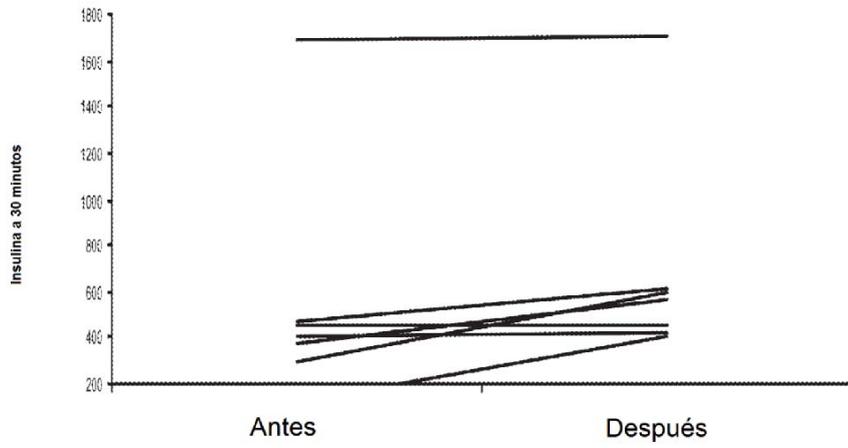


FIGURA 50

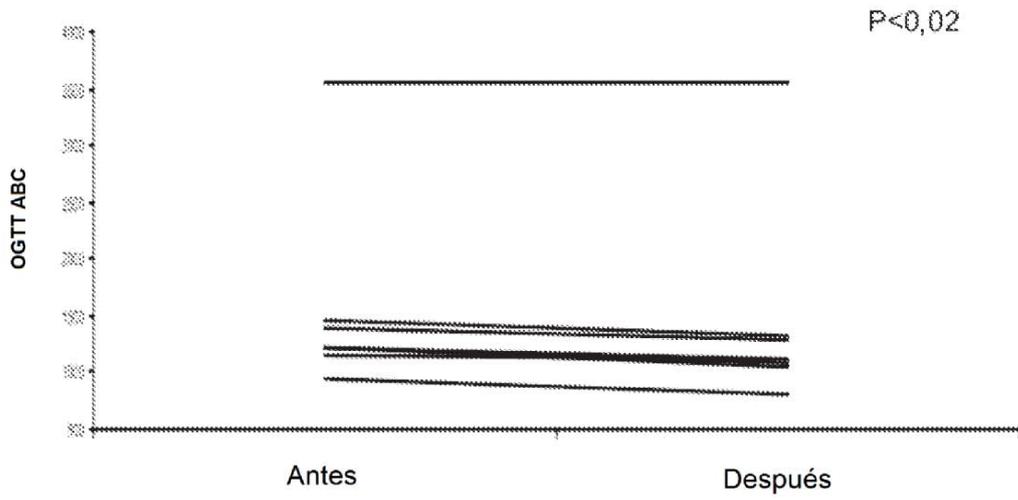


FIGURA 51

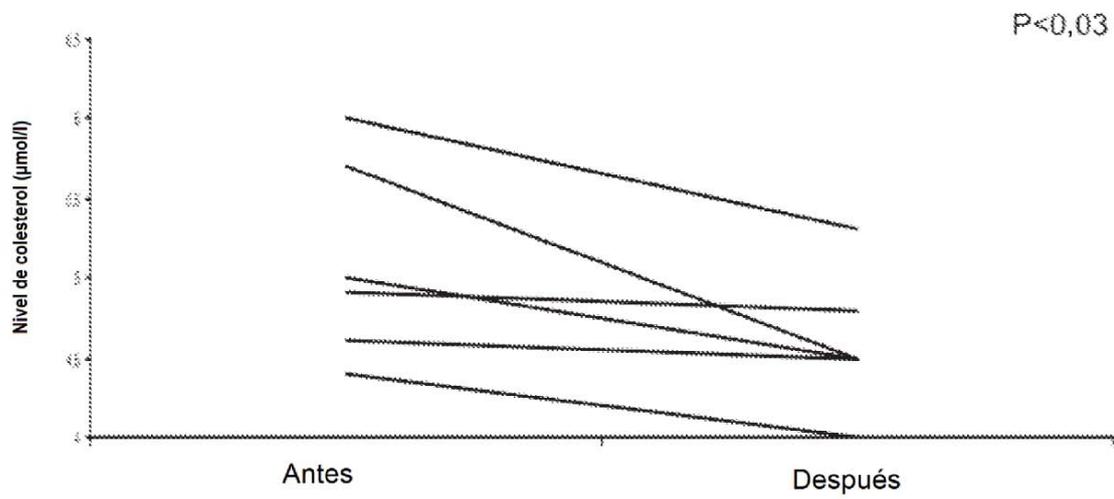


FIGURA 53

P<0,003



FIGURA 54

Cepa única

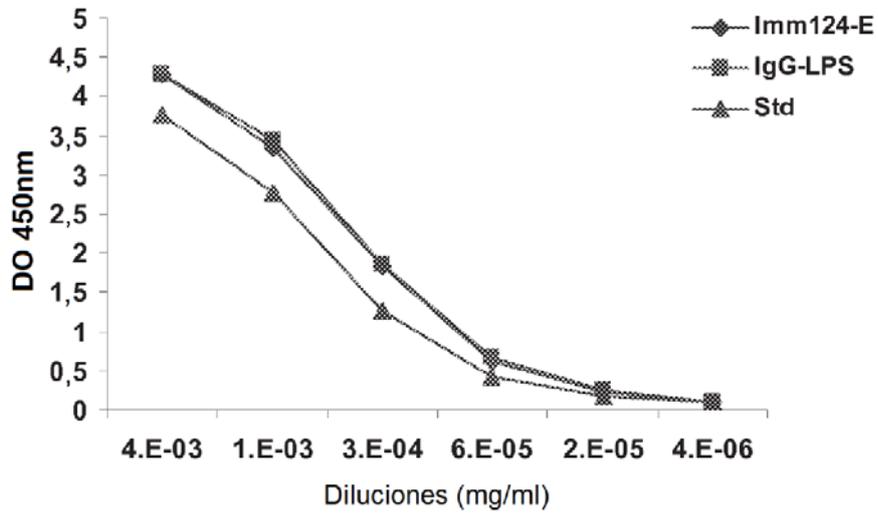


FIGURA 55

Cepa única

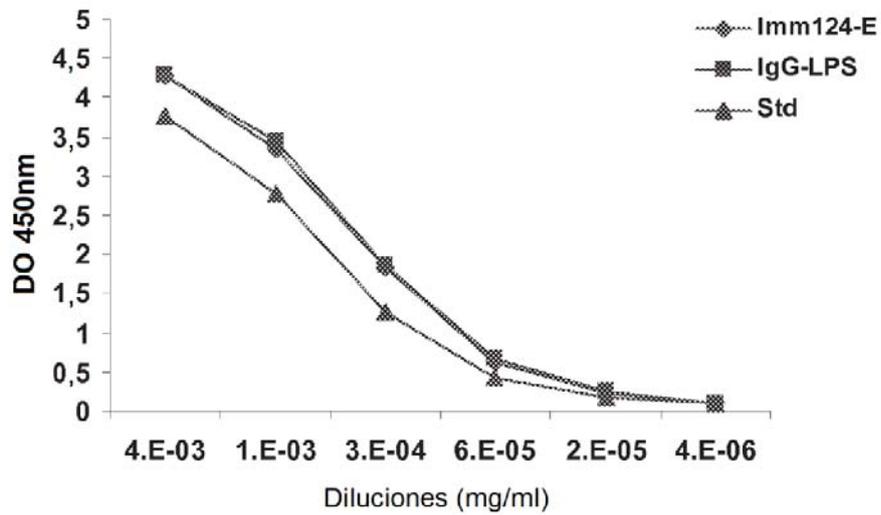


FIGURA 56

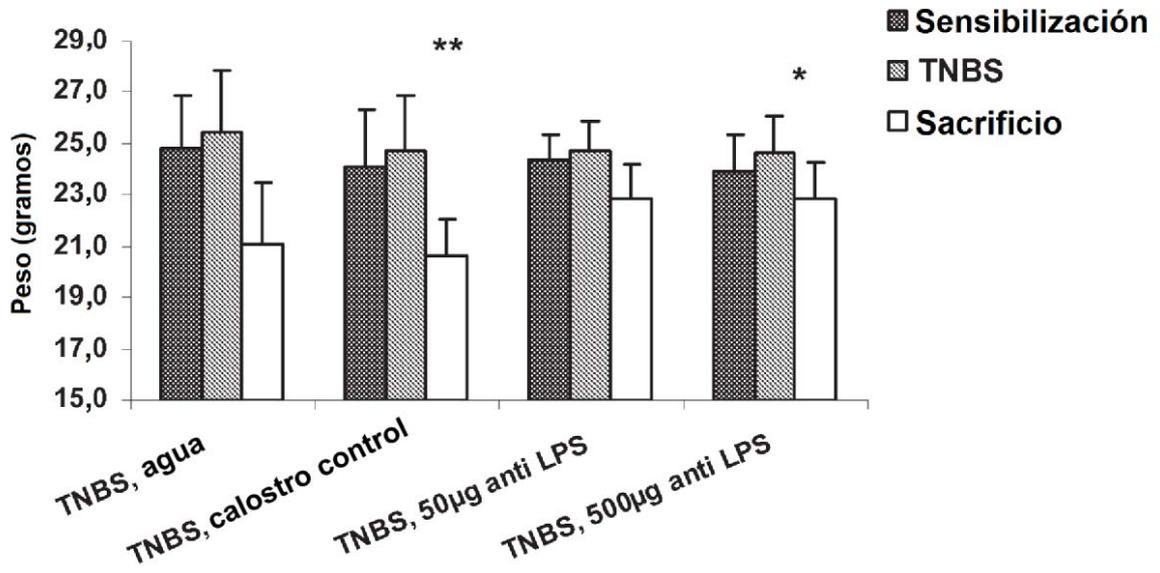


FIGURA 57

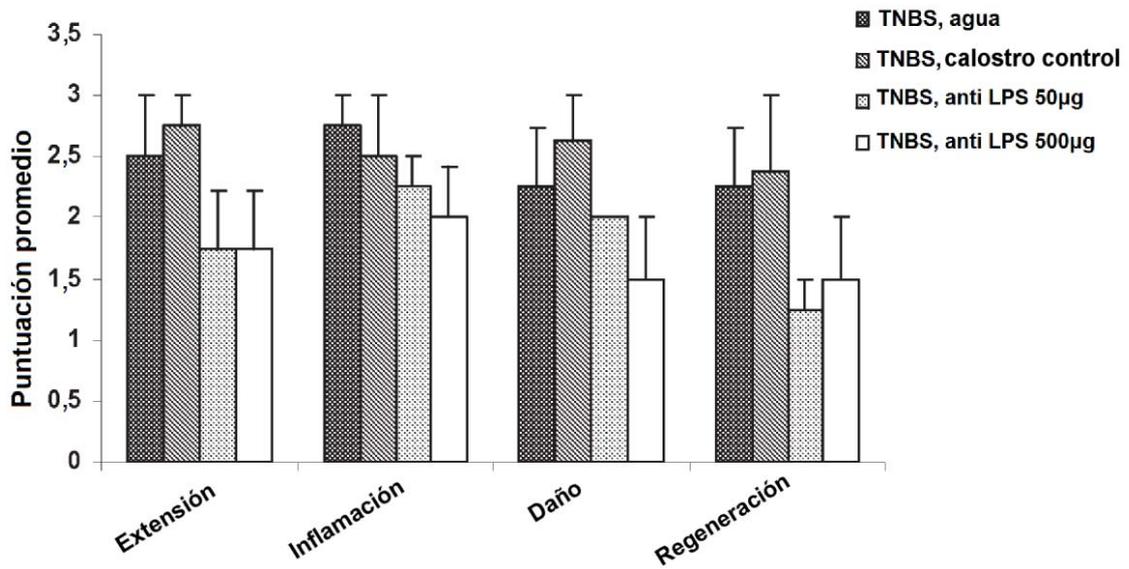


FIGURA 58

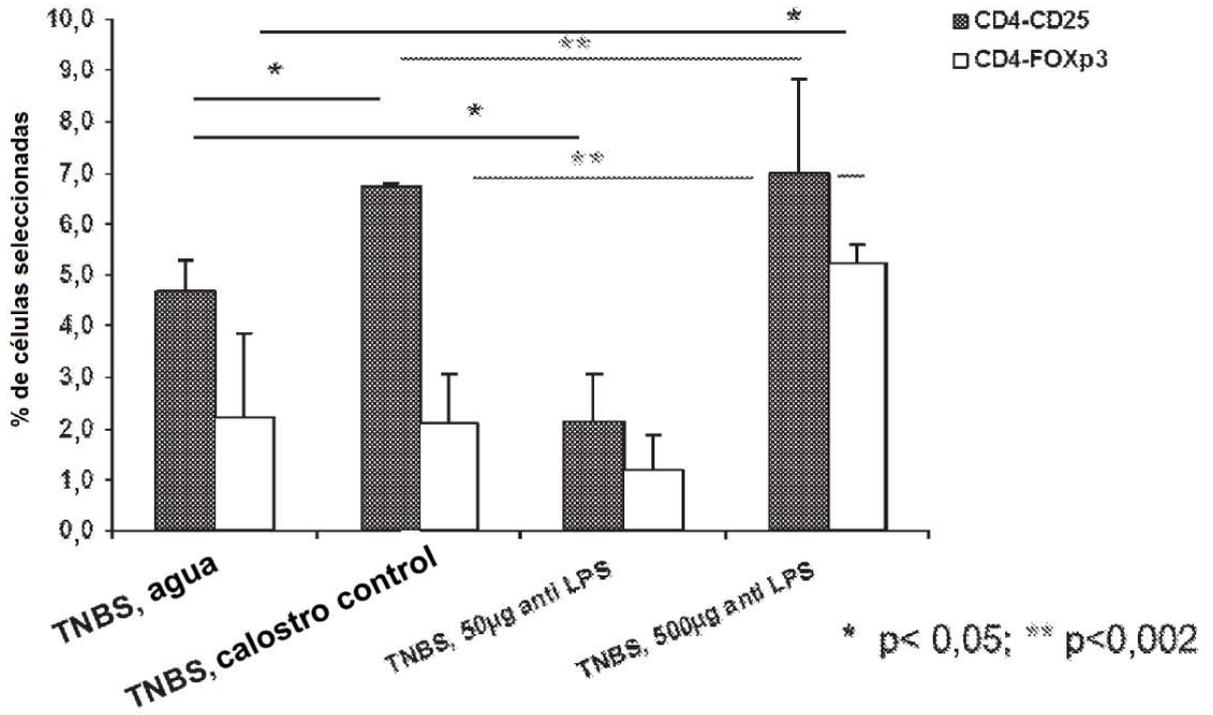


FIGURA 59

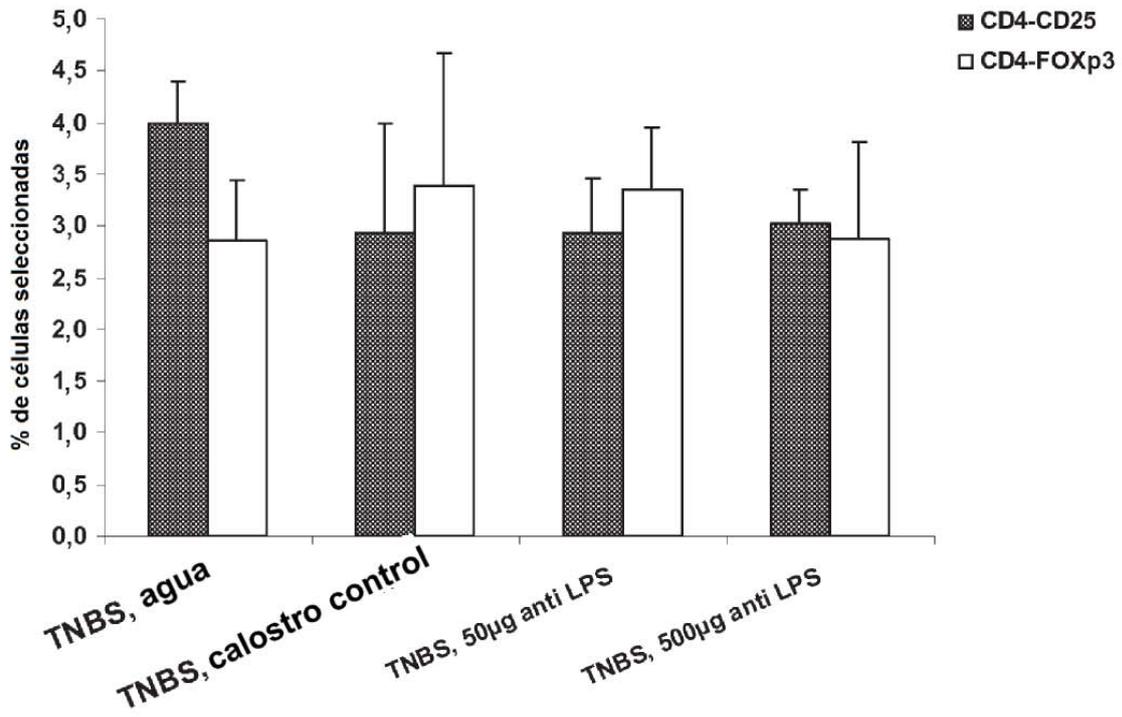


FIGURA 60

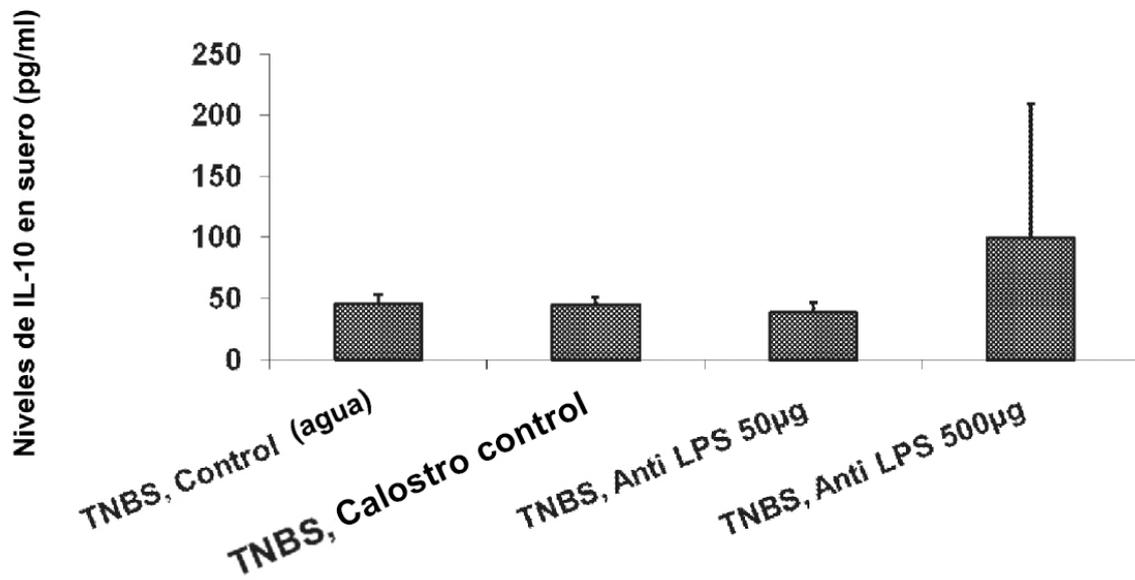


FIGURA 61

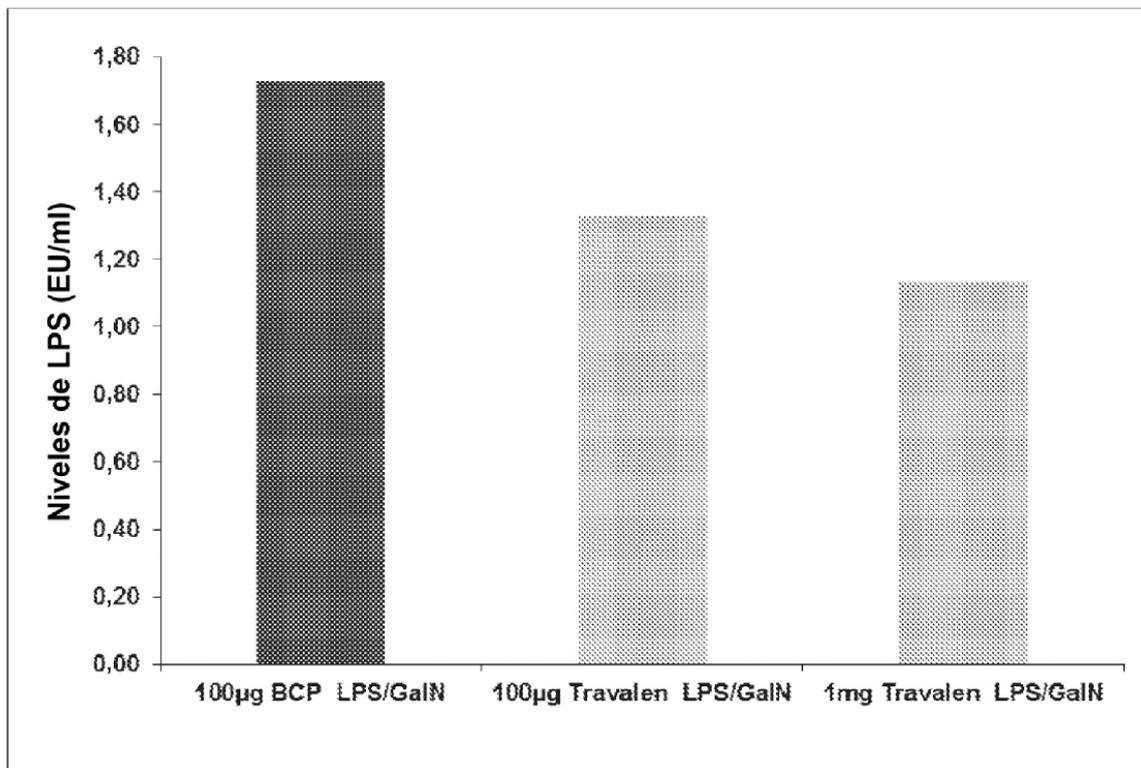


FIGURA 62

