

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 107**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 35/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2007 PCT/US2007/078947**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2008 WO08042604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2007 E 07814934 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2068913**

54 Título: **Inmuno-reguladores, preparaciones y composiciones que incluyen los inmuno-reguladores, pruebas para evaluar la actividad de los inmuno-reguladores y preparaciones y composiciones que incluyen los mismos y métodos**

30 Prioridad:

**29.09.2006 US 848348 P**  
**14.09.2007 US 855944**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LISONBEE, DAVID;**  
**MCCAUSLAND, CALVIN W.;**  
**BENNETT, RICHARD H.;**  
**VAUGHAN, BRENT M. y**  
**LEFLER, SHANE M.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 658 107 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

Inmuno-reguladores, preparaciones y composiciones que incluyen los inmuno-reguladores, pruebas para evaluar la actividad de los inmuno-reguladores y preparaciones y composiciones que incluyen los mismos y métodos

### Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a moléculas que regulan (por ejemplo, promueven, mejoran, suprimen la actividad indeseable, etc.) de la inmunidad portada por las células en un sujeto, incluyendo métodos para generar y obtener dichas moléculas, preparaciones y composiciones que incluyen dichas moléculas, métodos para evaluar la efectividad de dichas moléculas y métodos para utilizarlas. Más específicamente, la presente invención se refiere a moléculas pequeñas, a las cuales nos referimos en la presente invención como moléculas de "nanofracción", que regulan la inmunidad portada por las células.

### Antecedentes de la Invención

La capacidad de los anticuerpos para producir y transferir la inmunidad es bien conocida y ampliamente investigada, ya que son las características de los anticuerpos y los mecanismos por los cuales son producidos los anticuerpos.

15 No tan bien conocidos o investigados ampliamente, se encuentran los roles de los factores de transferencia los cuales incluyen una familia de moléculas que tienen pesos moleculares entre 3,500 Da y 7,500 Da, que juegan un rol en la regulación de la inmunidad celular, o la inmunidad portada por la célula T. Con el paso del tiempo, el entendimiento de aquellos expertos en la técnica pertinente tiene aproximadamente las características de los factores de transferencia y sus roles en un sistema inmune de un organismo que ha mejorado y continúa mejorando. Los documentos WO02/24746 y US 2002/0044942 describen composiciones que comprenden factores de transferencia.

Mientras continúa la investigación adicional para proporcionar la luz en las características y funciones de una amplia variedad de componentes del sistema inmune, puede existir un número grande no completamente entendido, y aún de moléculas ignoradas que pueden tener un impacto en la manera en la cual la inmunidad es desarrollada, mantenida, transportada y transferida, así como en los efectos de la inmunidad en la longevidad.

### Breve Descripción de la Invención

La efectividad de diferentes moléculas en la regulación de la inmunidad portada por las células ha sido caracterizada recientemente de una manera cuantificable. Las moléculas que pueden directa o indirectamente regular la inmunidad portada por las células son conocidas en la técnica como "inmuno-reguladores". Una clase de inmuno-reguladores incluye moléculas de nanofracción, peso molecular bajo o pequeñas (hasta de 3,000 Da, de 250 Da a 2,000 Da, de 2,000 Da a 3,000 Da), que promueven, mejoran, suprimen o regulan de otra manera una respuesta inmune portada por las células. Debido al tamaño relativamente pequeño o los pesos moleculares de dichos inmuno-reguladores, a ellos nos referimos en la presente descripción como inmuno-reguladores de "nanofracción" y como moléculas de "nanofracción".

35 La presente invención proporciona composiciones de acuerdo con la reivindicación 1, que son adecuadas para mejorar la función inmunitaria, Más particularmente, la presente invención proporciona composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 2 a la 9.

Los inmuno-reguladores de nanofracción pueden ser obtenidos de una variedad de tipos diferentes de fuentes animales. Los ejemplos de las fuentes animales incluyen mamíferos (por ejemplo, vacas) y aves (por ejemplo, pollos). Los inmuno-reguladores de nanofracción de acuerdo con la invención se obtienen del calostro producido por un mamífero y/o de los huevos producidos por las aves o cualquier otro tipo de animal. El calostro y los huevos son a los que nos referimos colectivamente en la presente descripción como "fuentes de nanofracción". El documento WO 02/38164 Fernandi E.S. y otros, "Virulizin – A review of its antineoplastic activity" Expert opinion on investigative drugs, Ashley Publications Ltd., London GB, vol. 8, no. 10, (1999-10-01), págs 1721-1735, el documento XP008000884 describen composiciones que comprenden moléculas de nanofracción extraídas de la bilis de animales.

La producción natural de los inmuno-reguladores de nanofracción por una fuente animal puede ser mejorada exponiendo la fuente animal a una cantidad o concentración mayor de uno o más antígenos que la cantidad de dicho antígeno al cual la fuente animal generalmente estaría expuesta. Por ejemplo, si un tipo particular de fuente animal, o aún una fuente animal específica, estaría expuesta, en su ambiente típico, normalmente a cierta cantidad o concentración de un antígeno determinado, la producción de la fuente animal de los inmuno-reguladores, incluyendo las moléculas de nanofracción, puede ser mejorada exponiendo la fuente animal a una cantidad todavía mayor (por ejemplo, concentración) de ese antígeno (por ejemplo, vacunando la fuente animal, colocando la fuente animal dentro de un ambiente en donde está presente una cantidad mayor o concentración de ese antígeno, etc.). Como otro ejemplo, si un tipo particular de fuente animal, o aún una fuente animal específica, fueran generalmente vacunadas con un antígeno determinado, la producción de la fuente animal de uno o más inmuno-reguladores de nanofracción podría ser mejorada aumentando la exposición de la fuente animal a un antígeno (por ejemplo,

exponiendo la fuente animal a una concentración aumentada del antígeno, una forma más efectiva o más virulenta del antígeno, etc.), aunque no se considera que las moléculas de nanofracción por sí mismas sean específicas del antígeno.

5 Los procesos conocidos pueden ser utilizados para purificar parcial, substancialmente o completamente los inmuno-  
reguladores de nanofracción de otras moléculas presentes en la fuente animal de nanofracción de las cuales son  
obtenidos y, opcionalmente, para concentrar los inmuno-reguladores de nanofracción. Dichos procesos incluyen, sin  
limitación, la separación mecánica, separación de fase (por ejemplo, separación de componentes acuosos y no  
acuoso entre ellos), precipitación, centrifugación, filtración (incluyendo microfiltración, con un corte de peso de  
10 molécula (MWCO) en el rango de aproximadamente 12,000 Da hasta 4,000 Da, y la nanofiltración con un MWCO de  
menos de aproximadamente 4,000 Da), los procesos de diálisis, cromatográficos y de purificación electroforética.  
Dichos procesos pueden ser efectuados individualmente en cualquier combinación para producir una preparación en  
la cual están presentes uno o más tipos de inmuno-reguladores.

En un aspecto, la presente invención incluye composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la  
1 a la 12 que incluyen moléculas de nanofracción. Además de moléculas de nanofracción, dichas composiciones  
15 pueden incluir otros componentes que son útiles para soportar o regular el sistema inmune de un sujeto (por  
ejemplo, el factor de transferencia, anticuerpos, etc.), así como componentes que pueden beneficiar al sujeto de  
otras maneras. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona además composiciones de  
acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 3 a la 9. Se describen métodos que incluyen el uso o  
20 administración de las moléculas de nanofracción o composiciones que incluyen las mismas, solas o con otros  
inmuno-reguladores. Los métodos de uso incluyen la administración de uno o más tipos de inmuno-reguladores (por  
ejemplo, en su forma natural, parcialmente purificada, substancialmente purificada o completamente purificada, en  
una preparación, en una composición, etc.) a un sujeto (por ejemplo, un humano o cualquier tipo de animal que se  
considera que se beneficie de la inmuno-regulación proporcionada por las moléculas de nanofracción). Los inmuno-  
25 reguladores son administrados a un sujeto en una cantidad que aumenta el nivel (por ejemplo, la concentración) de  
un inmuno-regulador de un tipo particular administrado en el cuerpo del sujeto en una cantidad superior a la normal  
para el sujeto. Un sujeto puede recibir una cantidad de uno o más inmuno-reguladores que son clínicamente  
efectivos para ocasionar que el sistema inmune del sujeto promueva una respuesta inmune portada por las células o  
una cantidad que mejore de manera efectiva la respuesta inmune portada por las células del sujeto.  
30 Preferentemente, las composiciones de la invención se usan de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-  
11.

Además, se describen pruebas y métodos de prueba que evalúan la efectividad de los inmuno-reguladores. Como  
un ejemplo, un ensayo de función inmune de la célula T puede ser utilizado para evaluar la capacidad de un inmuno-  
regulador potencial para regular la actividad de (por ejemplo, la producción de trifosfato de adenosina (ATP) por uno  
o más tipos de células que participan en la inmunidad portada por las células, ya sea solas o en conjunto con otras  
35 moléculas (por ejemplo, antígenos, mitógenos (los cuales inducen la mitosis o la duplicación de las células, etc.)).

Otras características y ventajas podrán ser apreciadas por aquellos expertos en la técnica a través de la  
consideración de la descripción siguiente y las reivindicaciones adjuntas.

### **Breve Descripción de los Dibujos**

40 En los dibujos, las figuras de la 1 a la 4 son ilustraciones gráficas de los resultados de varias pruebas realizadas en  
composiciones que incorporan las enseñanzas de la presente invención.

### **Descripción Detallada de la Invención**

Recientemente se ha descubierto que las moléculas pequeñas en una variedad de rangos y pesos moleculares son  
útiles para regular la actividad de las células inmunes. Los siguientes ejemplos presentados establecen las acciones  
que fueron realizadas para alcanzar estas conclusiones.

#### **45 Ejemplo 1**

Utilizando procesos conocidos, incluyendo la separación de fase, precipitación, filtración, microfiltración o  
nanofracción y diálisis, una variedad de fracciones de peso molecular fueron preparadas de ambos el calostro  
bovino y los huevos de gallina. Las fracciones de peso molecular que fueron obtenidas del calostro de bovino fueron  
de: 250 Da a 2,000 Da, de 2,000 Da a 4,000 Da, de 4,000 Da a 8,000 Da (los cuales incluyen el factor de  
50 transferencia y fueron incluidos por razones de comparación), y de 8,000 Da a 12,000 Da. De un modo similar, se  
prepararon fracciones de peso molecular de 2,000 Da a 4,000 Da, de 4,000 Da a 8,000 Da (las cuales incluyen el  
factor de transferencia, y fueron incluidas por razones de comparación), y fracciones de peso molecular de 8,000 Da  
a 12,000 Da fueron preparadas de las yemas de huevo de gallinas. Las fracciones de peso molecular fueron  
entonces secadas hasta formar un polvo (por ejemplo, por medio de secado por rociado o secado por congelación,  
55 etc.).

Los ensayos entonces fueron realizados utilizando estas preparaciones para evaluar los efectos de las moléculas en  
cada fracción para regular la actividad de las células que transportan la inmunidad celular (por ejemplo, células

auxiliadoras T CD4+). Específicamente, los ensayos del tipo descrito en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,773,232 y 6,630,316 y en la Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2005/0260563, fueron modificadas y utilizadas para evaluar las actividades de las fracciones de diferentes pesos moleculares del Ejemplo 1 en una variedad de condiciones. Los ensayos anteriormente mencionados son utilizados para evaluar la producción de trifosfato de adenosina (ATP) por las células inmunes (por ejemplo, células auxiliadoras T CD4+, células CD3+ (las cuales incluyen todas las células T), etc.). La cantidad de ATP producido por las células puede ser medida de una manera conocida en la técnica (por ejemplo, mediante el uso del lumenómetro de la denominada "Reacción de Luciferina").

## Ejemplo 2

Una primera serie de ensayos fueron realizados utilizando las células de glóbulos blancos de personas saludables que incluyen o expresan las glicoproteínas denominadas "CD4" en sus superficies utilizando el ensayo ImmuKnow™ de Cylex Incorporated de Columbia, Maryland. Estas células de glóbulos blancos son a las que también nos referimos como células "CD4+" debido a su expresión de las glicoproteínas CD4. La expresión de la glicoproteína CD4 distingue las células denominadas "auxiliadoras T" de otros tipos de células de glóbulos blancos incluyendo otras células T.

Los componentes del equipo de prueba del ensayo ImmuKnow™ fueron: una "Placa de Ensayo" estándar de 96 depósitos, incluyendo ocho tiras removibles; un "Diluyente de Muestra", el cual incluye el medio de crecimiento y un conservador; un "Estimulante", el cual incluye fitohemaglutinina-L (PHA-L) (una sustancia de los frijoles (por ejemplo, frijoles de riñón rojo), que son conocidos para estimular no específicamente la mitosis (un proceso en el cual la célula crece y se divide en dos nuevas células), y por lo tanto, la producción preparatoria del trifosfato de adenosina (ATP) en las células de los glóbulos blancos (por ejemplo, un "mitógeno")), diluido en el medio de crecimiento y un conservador; "Dynabeads® CD4", los cuales son cuentas de purificación de muestra magnética recubiertas con anticuerpos CD4 monoclonales de ratón anti-humano y son llevadas por una solución salina regulada con una albúmina de suero bovino (BSA) y el conservador; un "Regulador de Lavado", el cual incluye una solución salina regulada con BSA; un "Reactivo de Lisis", el cual incluye una solución básica hipotónica con detergente, un "Panel Calibrador" con concentraciones de ATP de 0, 1, 10, 100 y 1,000 ng/ml; un "Reactivo Luminiscente" que incluye luciferina y luciferaza en una solución regulada las cuales reaccionan con el ATP para crear luz en una cantidad indicadora de la cantidad de ATP al cual ha sido expuesto el Reactivo de Luminiscencia, y una "Placa de Medición" con 96 depósitos que tienen límites opacos (por ejemplo, paredes y bases).

Una tira de ocho depósitos de la Placa de Ensayo de 96 depósitos, a la cual nos podemos referir como una "tira de control", fue utilizada para proporcionar controles, incluyendo cuatro depósitos de control "no estimulados" (NS) y cuatro depósitos de control "estimulados".

Otra tira de ocho depósitos de una Placa de Ensayo de 96 depósitos, a la cual nos podemos referir como una "tira de prueba", fue utilizada por cada muestra que iba a ser probada. Cuatro de los depósitos de cada tira fueron designados como depósitos "no estimulados", mientras que los otros cuatro depósitos de cada tira fueron depósitos "estimulados". Se introdujeron 50 microlitros (50 µl) del Diluyente de Muestra en cada uno de los cuatro depósitos "no estimulados" de la tira de control, mientras que 25 µl de Diluyente de Muestra fueron introducidos en cada uno de los depósitos "no estimulados" de cada tira de prueba. Se introdujeron veinticinco microlitros (25 µl) de Estimulante en cada uno de los cuatro depósitos "estimulados" de la tira de control y dentro de cada uno de los cuatro depósitos "estimulados" de cada tira de prueba.

Además del Diluyente de Muestra o Estimulante, una muestra de 25 µl de una de las fracciones de peso molecular identificada en el Ejemplo 1, fue introducida en cada uno de los ocho depósitos de cada tira de prueba. Más específicamente, cada una de las fracciones de peso molecular del Ejemplo 1 fue reconstituida en el Diluyente de Muestra y diluida con un volumen del Diluyente de Muestra para producir tres diferentes concentraciones que finalmente, al momento de la adición de 25 µl de muestra a un depósito, se sumarían respectivamente a la adición de 10 µg, 100 µg y 1,000 µg del polvo secado al depósito.

Fue preparada una dilución de 1:3 (sangre: "Diluyente de Muestra"), de una muestra de sangre, la cual había sido agitada suavemente para distribuir de manera uniforme sus constituyentes, incluyendo las células de glóbulos blancos. Se agregaron setenta y cinco microlitros (75 µl) de la sangre diluida a cada depósito de cada tira. El contenido de los depósitos fue entonces mezclado (por ejemplo, colocando la placa en una placa agitadora durante aproximadamente 30 segundos), luego incubado a una temperatura de 37°C en un ambiente de CO2 al 5% por aproximadamente 18 horas.

Una vez que estuvo completa la incubación, el contenido de los depósitos fue nuevamente mezclado (por ejemplo, colocando la placa en una placa agitadora por aproximadamente tres minutos). Posteriormente, la solución incluyendo las cuentas de purificación de muestra Dynabeads® fueron mezcladas para suspender de manera homogénea las cuentas de purificación de muestra Dynabeads® dentro del líquido por medio del cual fueron portadas (por ejemplo, con un remolino). Como se observó anteriormente, las cuentas de purificación de muestra Dynabeads® en este ejemplo incluyen cuentas magnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales de ratón anti-humanos CD4. Se agregaron cincuenta microlitros (50 µl) de la solución portadora de las cuentas de purificación de

muestra Dynabeads® a cada depósito de cada tira.

El contenido de los depósitos de cada tira fueron nuevamente mezclados (por ejemplo, en una placa agitadora por aproximadamente 15 segundos), luego se permitió que se asentará, o incubará a temperatura ambiente durante una duración de aproximadamente 15 minutos. El proceso de mezcla e incubación entonces fue repetido. Los anticuerpos de ratón anti-humanos CD4 en las cuentas de purificación de muestra Dynabeads® se enlazan solamente a las células de glóbulos blancos exhibiendo la glucoproteína CD4. Durante esta incubación, las células de glóbulos blancos CD4+, incluyen las células auxiliaoras T, que fueron inmovilizadas por, o enlazadas a, los anticuerpos monoclonales de ratón anti-humanos CD4 en las cuentas de purificación de muestra Dynabeads®.

Después de la incubación, el contenido de cada uno de los depósitos fue mezclado nuevamente (por ejemplo, durante aproximadamente 15 segundos a aproximadamente 30 segundos en una placa agitadora) para volver a suspender las cuentas de purificación de muestra Dynabeads®. El contenido de cada depósito entonces fue introducido en un campo magnético (por ejemplo, colocando cada tira de ocho depósitos en una charola de magneto que se consigue en Cylex), de acuerdo con el protocolo establecido en las instrucciones que acompañan el ensayo ImmuKnow™. Cuando son sometidas al campo magnético, las cuentas de purificación de muestra Dynabeads® son jaladas a un lado de cada depósito en el cual están presentes. El contenido restante del depósito puede entonces ser removido (por ejemplo, aspirado con una pipeta, etc.) y las células auxiliaoras T lavadas una o más veces (por ejemplo, tres veces, cada una con 200 µl de Regulador de Lavado) para purificar las mismas substancialmente.

Entonces se agregaron doscientos microlitros (200 µl) de Reactivo de Lisis a cada depósito. Después de la remoción del contenido de cada depósito del campo magnético, el contenido de cada depósito (por ejemplo, las cuentas de purificación de muestra Dynabeads®, las células adheridas a las mismas, y el Reactivo de Lisis) fueron mezclados (por ejemplo, por aproximadamente cinco minutos en un agitador de placa). El Reactivo de Lisis rompió las membranas de las células CD4+ que fueron inmovilizadas por el anticuerpo en las cuentas de purificación de muestra Dynabeads®. Entre otras cosas, el ATP fue liberado de las células lisadas.

Una vez que estuvo terminada la lisis de las células, el contenido de cada depósito fue nuevamente sometido a un campo magnético, jalando las cuentas de purificación de muestra Dynabeads® dentro de cada depósito a un lado del depósito. Una muestra de 50 µl fue entonces transferida de cada depósito a un depósito correspondiente de la Placa de Medición. Además de transferir las muestras, varios depósitos de la Placa de Medición de 96 depósitos fueron reservados para muestras de 50 µl de las diferentes concentraciones de ATP de las soluciones del Panel Calibrador.

Entonces se agregaron ciento cincuenta microlitros (150 µl) de Reactivo de Luminiscencia a cada depósito de la Placa de Medición que incluyó, ya sea la muestra de prueba o una muestra de la solución del Panel Calibrador. La luminiscencia de cada depósito fue entonces medida. La luminiscencia medida de cada depósito proporciona una indicación de la cantidad del ATP presente en ese depósito. La cantidad de ATP presente en cada depósito es, a la vez, indicadora de una cantidad de actividad metabólica dentro de las células (por ejemplo, células CD4+), de las cuales se calcularon los contenidos de cada depósito de la Placa de Medición. En las muestras que fueron derivadas de las células que fueron estimuladas de una manera no específica con PHA, se esperaba que estuviera presente un nivel relativamente alto de ATP. La adición del inmuno-regulador (por ejemplo, de una de las fracciones identificadas en el Ejemplo 1) aumentaría o disminuiría, o regularía la actividad metabólica de las células CD4+ que fueron estimuladas de una manera no específica por el PHA.

Los resultados de dichas pruebas se establecen en la siguiente tabla, representando los números ilustrados, la cantidad media (promedio) de ATP producido por las células de glóbulos blancos de cada subconjunto:

TABLA 1

Muestra		Control	10 µg por depósito	100 µg por depósito	1000 µg por depósito
Fracción de Calostro de 250 Da a 2,000 Da	(NS) No Estimulado	14	52	50	37
	Estimulado con PHA	388	336	253	127
	% de reducción en el estímulo de PHA		13.4	34.8	67.3
Fracción de Calostro de 2,000 Da a 4,000 Da	NS	14	52	62	42

(continuación)

Muestra		Control	10 µg por depósito	100 µg por depósito	1000 µg por depósito
	Estimulado con PHA	388	388	377	339
	% de reducción en el estímulo de PHA		0	2.8	12.6
Fracción de Calostro de 4,000 Da a 8,000 Da (incluye TF)	NS	14	69	50	46
	Estimulado con PHA	388	378	250	207
	% de reducción en el estímulo de PHA		2.6	35.6	46.6
Fracción de Calostro de 8,000 Da a 12,000 Da	NS	14	49	45	39
	Estimulado con PHA	388	337	237	181
	% de reducción en el estímulo de PHA		13.1	38.9	53.4
Fracción de Huevo de 2,000 Da a 4,000 Da	NS	14	49	33	44
	Estimulado con PHA	388	228	161	148
	% de reducción en el estímulo de PHA		41.2	58.5	61.9
Fracción de Huevo de 4,000 Da a 8,000 Da (incluye TF)	NS	14	54	47	44
	Estimulado con PHA	388	354	230	158
	% de reducción en el estímulo de PHA		8.8	40.7	59.3

- 5 Estos datos muestran que las pruebas no estimuladas, en donde las células no fueron expuestas al PHA, cada una de las fracciones de peso molecular de 4,000 Da a 8,000 Da (de calostro y huevo), ambos de los cuales es conocido que contienen el factor de transferencia, estimularon la actividad metabólica adicional en las células de glóbulos blancos CD4+. Estos datos confirman la capacidad del factor de transferencia para regular de manera ascendente la inmunidad portada por la célula.
- 10 Por el contrario, las fracciones de calostro y huevo de 4,000 Da a 8,000 Da redujeron la regulación de la capacidad no específica del PHA para estimular la actividad metabólica en las células CD4+. Debido a que el PHA es un estimulante no específico artificial, no es sorprendente la baja regulación de su actividad por el factor de transferencia, el cual participa en la inmunidad portada por la célula. Se considera, e investigaciones anteriores han demostrado, que el factor de transferencia ayuda a equilibrar y hasta a enfocar, la actividad inmune de las células T (por ejemplo, ayudando a las células a "recordar" su propósito principal, reduciendo la autoinmunidad y los padecimientos asociados, mientras que se mejora la actividad contra las entidades no deseables, tales como la infección del cuerpo del sujeto por microorganismos (bacterias, virus, etc.), etc.). La baja regulación de la actividad estimulada por el PHA por las células T parece confirmar este rol de factor de transferencia en la inmunidad portada por las células.
- 15
- 20 Se vieron resultados similares en un número de otras fracciones de peso molecular que no incluyen el factor de transferencia, incluyendo la fracción de calostro de 250 Da a 2,000 Da (ambas la regulación ascendente y la regulación descendente), la fracción de calostro de 2,000 Da a 4,000 Da (regulación ascendente), y la fracción de

huevo de 2,000 Da a 4,000 Da (regulación ascendente y regulación descendente). La fracción de calostro de 8,000 Da a 10,000 Da también ocasionó la regulación ascendente de la actividad de las células de glóbulos blancos CD4+ que no fueron estimuladas con PHA y la regulación descendente del estímulo de PHA de la actividad metabólica en las células de glóbulos blancos CD4+.

5 Estos datos establecen que los inmuno-reguladores diferentes al factor de transferencia están presentes en por lo menos la fracción de calostro de 250 Da a 2,000 Da, la fracción de calostro de 2,000 Da a 4,000 Da y la fracción de huevo de 2,000 Da a 4,000 Da. Las capacidades de inmuno-regulación de las "moléculas de nanofracción" presentes en cada una de estas fracciones han sido por lo menos confirmadas parcialmente por el experimento que se establece en el Ejemplo 3.

10 **Ejemplo 3**

Una segunda serie de ensayos de actividad inducida en células de glóbulos blancos de individuos saludables que exhiben una glicoproteína CD3 (por ejemplo, células CD3+), la cual es conocido que incluye todas las células T, incluyendo las denominadas células de "memoria T". Específicamente, se utilizó el ensayo T-Cell Memory™ de Cylex. El protocolo del ensayo T-Cell Memory™ de Cylex es muy similar al establecido en el Ejemplo 2, con las siguientes excepciones: solamente se introdujeron 25 µl del Estimulante, el cual incluyó Concanavalina A (ConA) en vez de PHA, en los depósitos "estimulados" de la tira de control, mientras que se agregaron 25 µl de una dilución de 1:10 de vacuna de citomegalovirus (CMV) agregadas a los depósitos "estimulados" de cada tira de prueba (para una dilución final, por depósito de 1:50); se inmovilizaron anticuerpos de ratón anti-humano CD3 a las superficies de las cuentas magnéticas (de acuerdo con las instrucciones del equipo de prueba T-Cell Memory™), para preparar las cuentas de purificación de muestra Dynabeads® y las cuentas de purificación de muestra Dynabeads® fueron agregadas a las muestras de sangre, el Diluyente de Muestra, el Estimulante (si lo hay) y la fracción de muestra (si la hay) antes de la incubación inicial.

En el ensayo T-Cell Memory™, se utilizó el antígeno en lugar del mitógeno (por ejemplo, PHA) de modo que pudiera ser evaluada la capacidad de las células de memoria T para reconocer un antígeno particular. De manera importante, la intensidad de la luz emitida de cada depósito de la Placa de Medición es menor, conforme las células de memoria T forman solamente una porción de las células que han sido enlazadas a las moléculas del anticuerpo de las Dynabeads®.

Los resultados de estos ensayos se establecieron en la siguiente tabla, representando a los números ilustrados la cantidad media (promedio) del ATP producido por las células de glóbulos blancos para cada muestra (y cantidad) probada:

TABLA 2

Muestra		Control	10 µg	100 µg	1000 µg
Fracción de Calostro de 250 Da a 2,000 Da	(NS) No Estimulado	12	14	12	17
	Estimulado con CMV	316	468	338	345
	% de aumento en el estímulo de CMV		48.1	7.0	9.2
Fracción de Calostro de 2,000 Da a 4,000 Da	NS	12	15	12	15
	Estimulado con CMV	316	501	503	440
	% de aumento en el estímulo de CMV		58.5	59.1	39.2
Fracción de Calostro de 4,000 Da a 8,000 Da (incluye TF)	NS	12	22	16	19
	Estimulado con CMV	316	473	476	475
	% de aumento en el estímulo de CMV		49.7	50.6	50.3
Fracción de Calostro de 8,000 Da a 12,000 Da	NS	12	14	18	26

(continuación)

Muestra		Control	10 µg	100 µg	1000 µg
	Estimulado con CMV	316	453	404	370
	% de aumento en el estímulo de CMV		43.4	27.8	17.1
Fracción de Huevo de 2,000 Da a 4,000 Da	NS	12	26	61	108
	Estimulado con CMV	316	305	349	350
	% de aumento en el estímulo de CMV		-3.5	10.4	10.8
Fracción de Huevo de 4,000 Da a 8,000 Da (incluye TF)	NS	12	34	39	108
	Estimulado con CMV	316	310	280	381
	% de aumento en el estímulo de CMV		-1.9	-11.4	20.6

5 Los datos obtenidos de la prueba realizada en este Ejemplo 3 demuestran que, la presencia de un antígeno (por ejemplo, un estimulante específico, opuesto a la falta de especificidad de un mitógeno, tal como el ConA ó PHA), las tres fracciones de calostro que contienen el factor de no transferencia mejoran la actividad de las células de memoria T para el CMV hasta un grado que es comparable con (las muestras de fracciones de calostro de 10 µg de 250 Da a 2,000 Da y de 8,000 Da a 12,000 Da) o excede (las muestras de 10 µg y 100 µg de fracciones de calostro de 2,000 Da a 4,000 Da) la capacidad de las muestras dimensionadas de manera comparable con la fracción de calostro que contienen factor de transferencia de 4,000 Da a 8,000 Da, para mejorar la actividad de las células probadas cuando están expuestas al CMV.

**Ejemplo 4**

15 Se realizó otro conjunto de ensayos para determinar si cualquiera de las moléculas de inmuno-reguladoras de nanofracción (por ejemplo, los inmuno-reguladores de fracción de calostro de 2,000 Da a 4,000 Da), o la fracción que contiene el factor de transferencia (por ejemplo, la fracción de calostro de 4,000 Da a 8,000 Da) podrían regular (por ejemplo, mejorar) la memoria inmune de un sujeto el cual había estado expuesto recientemente a una alta dosis de un antígeno particular. Específicamente, se obtuvo una muestra de sangre de un individuo que había estado expuesto al virus de la influenza, el cual ocasiona una infección sistémica y sufrió de los síntomas de la influenza durante cuatro semanas.

20 El ensayo fue realizado de la manera descrita en el Ejemplo 3, utilizando el ensayo T-Cell Memory™ de Cylex de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el ensayo y establecidas en el Ejemplo 3, excepto que fue utilizado un antígeno de influenza, en la forma de una dilución de 1:25 de una vacuna de influenza manufacturada por Aventis Pasteur of Paris, Francia, para la estación de gripes del 2006 al 2007 (para una dilución final por depósito de 1:125), en lugar de la vacuna de CMV del Ejemplo 3.

25 Los resultados de este ensayo se establecen en la tabla siguiente:

TABLA 3

Muestra		Control	10 µg	100 µg	1000 µg
Fracción de Calostro de 2,000 Da a 4,000 Da	NS	4	10	3	4
	Estimulado con antígeno de influenza	827	1003	906	936
	ConA	694			
	% de aumento en el estímulo del antígeno de influenza		21.3	9.6	13.2

30

(continuación)

Muestra		Control	10 µg	100 µg	1000 µg
Fracción de Calostro de 2,000 Da a 4,000 Da	NS	4	10	3	4
Fracción de Calostro de 4,000 Da a 8,000 Da (incluye TF)	NS	4	36	24	11
	Estimulado con antígeno de influenza	827	989	997	830
	ConA	694			
	% de aumento en el estímulo del antígeno de influenza		19.6	20.6	0.4

5 Los resultados mostrados en la Tabla 3 (los cuales también están mostrados gráficamente en la Figura 1) indican que, cuando las células de memoria T de un sujeto que ha estado expuesto recientemente a un antígeno particular son expuestas a ese antígeno, particularmente en la presencia de las moléculas de nanofracción o el factor de transferencia, la actividad de las células de memoria T CD3+ aumenta de manera importante. De hecho, las cantidades relativamente pequeñas de las moléculas de nanofracción y del factor de transferencia ocasionaron un aumento de aproximadamente el 20% en la actividad de la célula de memoria T. De hecho, parece que los inmunoreguladores de la fracción de 2,000 Da a 4,000 Da son casi tan efectivos como el factor de transferencia y cualesquiera otras moléculas presentes en la fracción de 4,000 Da a 8,000 Da para regular la actividad de las células probadas.

10 Los resultados de los Ejemplos del 1 al 4 indican que los inmunoreguladores que tienen pesos moleculares en los rangos de 250 Da a 2,000 Da, 2,000 Da a 4,000 Da, y 8,000 Da a 12,000 Da son efectivos para regular la actividad inmune de diferentes tipos de células T. Por lo tanto, administrando dichos inmunoreguladores o preparaciones o composiciones que incluyen los inmunoreguladores a un sujeto, se puede regular la inmunidad portada por las células del sujeto.

15 Basados en estos resultados, se desarrolló un proceso para producir varios suplementos dietéticos del calostro (bovino) y/o huevo (gallina) que incluyen moléculas de un MWCO previamente determinadas. Una preparación líquida de una fuente de inmunoreguladores de nanofracción, de las cuales por lo menos las partículas macroscópicas (por ejemplo, sólidos del calostro, cascarones de huevo y membranas, etc.) (por ejemplo, mediante la separación de fase, procesos de filtración, etc.) han sido removidas, se hace pasar a través de un filtro con poros que tienen una dimensión que proporciona un MWCO superior previamente determinado (corte de peso molecular) de aproximadamente 3,000 Da. Alternativamente, pueden ser utilizados los procesos de diálisis, que incluyen el uso de membranas de diálisis que tienen poros que proporcionan el MWCO deseado. El uso de dichos procesos proporciona una "nanofracción" de la cual las moléculas más grandes incluyen el factor de transferencia, anticuerpos y una variedad de otras moléculas que tienen pesos moleculares mayores de aproximadamente 3,000 Da, que son excluidos. (Por ejemplo, son producidos el calostro, el huevo de gallina y varias composiciones en polvo). El filtrado (por ejemplo, la porción del líquido que ha pasado a través del filtro) puede entonces ser procesada adicionalmente por técnicas conocidas (por ejemplo, secado por congelación, secado rociado, evaporación para formar un líquido más concentrado, la incorporación en un gel, etc.). El "producto de nanofracción" puede entonces ser utilizado solo o incorporado en otras composiciones.

20 Se considera que incluyendo las moléculas de nanofracción, aún en cantidades muy pequeñas, en las preparaciones que también incluyen el factor de transferencia (y las cuales también pueden incluir niveles de línea de base (por ejemplo, aquellos niveles ya presentes en la fuente (por ejemplo, calostro, huevo, etc.) del cual es obtenido el factor de transferencia), las composiciones resultantes regularán de manera descendente la actividad no deseada de las células T (por ejemplo, la autoinmunidad y las enfermedades asociadas, etc.), mientras que se mejora o se regula de manera ascendente la actividad deseada de la célula T. Las composiciones que fueron desarrolladas de nanofracción y el factor de transferencia son establecidas en las Tablas 4 y 5.

TABLA 4  
COMPOSICIÓN A

Ingrediente	Cantidad Relativa (en peso)
Fracción de Calostro Bovino, MWCO superior 10,000 Da (secado rociado)	68%
Fracción de Calostro Bovino, MWCO superior 3,000 Da (nanofracción) (secado rociado)	2%
Yema de Huevo de Gallina (secado rociado)	30%

5 A la composición de la tabla 4, también nos podemos referir como “un componente de inmuno-regulación”. Dicho “componente de inmuno-regulación” puede consistir esencialmente de una combinación de fuente de inmuno-reguladores (incluyendo fuentes de inmuno-reguladores de nanofracción) o extracto de fuentes del inmuno-regulador inmune, tales como aquellos de la lista de la tabla 4 o pueden incluir otros ingredientes.

10 De un modo similar, una composición que incorpora las enseñanzas de la presente invención puede consistir esencialmente de un “componente de inmuno-regulación”, tal como el que se describe en la tabla 4, o puede incluir otros ingredientes, como se establecen en la tabla 5.

TABLA 5

COMPOSICION B	
Ingrediente	Cantidad (por servicio, tamaño de servicio = una cápsula)
Composición A	150 mg
Zinc (en la forma de monometionina)	5 mg
Complejo de polisacárido propiedad de Cordyvant™	440 mg
IP-6 (hexafosfato de inositol)	
Extracto de frijol soya (fitosteroles)	
<i>Cordyceps sinensis</i> (ácidos cordicépticos al 7%)	
Beta-glucano (levadura de pastelería) ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	
Beta-glucano (de avena) ( <i>Avena sativa</i> )	
Extracto de <i>Agaricus blazeii</i>	
Mananos (de aloe vera) (hoja)	
Extracto de Hoja de Oliva ( <i>Olea europaea</i> )	
Hongo Maitake ( <i>Grifola frondosa</i> ) (planta completa)	
Hongo Shiitake ( <i>Lentinus edodes</i> )(planta completa (extracto 5:1))	

15 Una composición de acuerdo con la presente invención puede estar incorporada como un líquido (por ejemplo dentro de una bebida RioVida® que se consigue en 4Life Research, LC, de Sandy, Utah), un polvo (el cual puede incluir ingredientes adicionales para proporcionar un sabor deseable, propiedades de disolución y similares), una tableta (la cual incluye adicionalmente otros ingredientes tales como enlazadores (por ejemplo, almidón)) y similares, un gel (en el cual la gelatina y otros ingredientes pueden ser agregados, o en cualquier otra forma adecuada. Deberá quedar entendido que, para propósitos de esta descripción, los ingredientes adicionales que son usados para la

20 manufactura de dichas modalidades de una composición de la presente invención pueden, ser considerados únicamente como opcionales y no esenciales para la composición, a menos que lo requieran de otro modo las reivindicaciones adjuntas.

**Ejemplo 5**

La sangre fue recolectada de un individuo que había estado sufriendo de síntomas de (infección por el virus de varicela zoster (VZV)), por aproximadamente cuatro semanas. La sangre fue analizada utilizando el ensayo ImmuKnow™ de la manera descrita en el EJEMPLO 2, teniendo las fracciones de muestra del EJEMPLO 2 que ser reemplazadas por las siguientes: (a) un control que no incluyó inmuno-reguladores; (b) una fracción de calostro que tiene un MWCO de aproximadamente 3,000 Da que ha sido secado por rociado; (c) Transfer Factor XF®, el cual se consigue actualmente en 4Life Research e incluye el extracto de calostro bovino con un MWCO superior de aproximadamente 10,000 Da, el cual fue agregado; (d) la composición de la TABLA 4, la cual está marcada como "Composición A"; y (e) la composición de la TABLA 5, la cual está marcada como "Composición B". Cada uno de los puntos del (b) al (e), fue reconstituido en el Diluyente de Muestra que acompañó el ensayo ImmuKnow™ y diluido a una concentración que dio como resultado final una concentración por depósito de 1 mg/ml una vez que las muestras de sangre y todos los otros líquidos habían sido vertidos en cada depósito.

Los resultados de esos ensayos se establecen en la siguiente tabla:

TABLA 6

	Control	Nanofracción	TF XF	Composición A	Composición B
No estimulada (NS)	26	35	77	47	19
Estimulada con PHA	220	234	150	140	27

15

Estos resultados también aparecen en la gráfica de la figura 2.

Se reitera que estos resultados fueron obtenidos en un punto del tiempo (aproximadamente cuatro semanas después de la infección inicial; es decir durante la convalecencia) en donde, en ausencia del estímulo, la actividad de la célula auxiliadora T (CD4+) se espera que disminuya, aunque un número más grande de células auxiliaadoras T permanezcan en la sangre del sujeto. La actividad de la célula estimuladora T fue estimulada solo ligeramente, en ausencia del estimulante PHA no específico, por la nanofracción, TF XF, una Composición A, y no parece que haya sido estimulada por la Composición B. Sin embargo, El estímulo no específico de las células auxiliaadoras T por el PHA, fue reducido de manera importante por el TF XF y la Composición A y todavía en un grado más alto por la composición B, como podría ser esperado de los resultados del EJEMPLO 2, como se establecen en la TABLA 1.

**Ejemplo 6**

En un punto más temprano de tiempo (aproximadamente una semana después de la presentación de los síntomas de varicela) se esperaría que las células de memoria T, aunque no estén presentes en la sangre del sujeto en grandes concentraciones debido a la naturaleza localizada de las infecciones de VZV que ocasiona la varicela (por ejemplo, títulos de sangre relativamente bajo de VZV), ya habría reconocido la infección de VZV y serían fácilmente estimulados por la presencia del antígeno de VZV. De acuerdo con un ensayo de T-Cell Memory™ que fue realizado para determinar los efectos de la nanofracción, TF XF, la Composición A y la Composición B en las células de memoria T de la sangre del mismo paciente que fue probado en el EJEMPLO 5. Se siguió el protocolo establecido en el EJEMPLO 3, con las siguientes excepciones: fue usada la vacuna VZV, la cual había sido diluida 1:10, en lugar de la vacuna de CMV (para una dilución final por depósito de 1:50); y las fracciones de muestra del EJEMPLO 3 fueron reemplazadas por el control y los inmuno-reguladores utilizados en el EJEMPLO 5, habiendo sido diluido cada inmuno-regulador a una concentración final por depósito de 100 µg/ml.

La tabla siguiente establece los resultados del ensayo:

TABLA 7

	Control	Nanofracción	TF XF	Composición A	Composición B
No estimulada (NS)	1	2	13	27	51
Estimulada con VZV	1	5	30	32	69
Estimulada con ConA	288				

Estos datos también están ilustrados gráficamente en la figura 3.

Como se esperaba, el factor de transferencia, el cual está presente en el TF XF, estimuló la actividad de las células de memoria T. La adición de una pequeña cantidad de moléculas de nanofracción extra al factor de transferencia aumentó de manera importante la actividad en las células de memoria T, tanto, con cómo sin, el estímulo de VZV

adicional. Por lo tanto, los resultados de los EJEMPLOS 5 y 6 confirman que la adición de unas moléculas de nanofración extras a las preparaciones que también incluyen el factor de transferencia, aún en cantidades muy pequeñas, regularán de manera descendente la actividad no deseada de las células T (por ejemplo, la autoinmunidad y los padecimientos asociados, etc.), mientras que mejoran o regulan de manera ascendente la actividad deseada de la célula T.

### Ejemplo 7

En otro estudio, el cual fue realizado para determinar las habilidades de las diferentes composiciones, incluyendo las composiciones que incluyen el factor de transferencia y las moléculas de nanofración extra establecidos en las TABLAS 4 y 5, se evaluó para estimular la actividad de las célula exterminadoras naturales (NK) contra la línea celular K-562 del eritoblasto de leucemia, la cual es sensible a las células NK. Por consiguiente, las células NK son a las que también nos referimos en la presente descripción como "células efectoras", mientras que a las células K-562 también nos referimos en la presente descripción como "células de tumor", y como "células objetivo". Específicamente, se utilizó la tecnología de Ensayo MTT, la cual, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual es amarillo, se reduce a formazan, el cual es morado por medio de las enzimas de reductasa en la mitocondria activa de las células vivas. Justamente antes del análisis de la citotoxicidad, se agrega a cada depósito una solución (por ejemplo, sulfóxido de dimetilo, sulfato de sodio dodecilo (SDS) en ácido clorhídrico diluido (HCl), etc.) que disolverá el formazan en cada depósito. La espectrofotometría en la cual es medida la cantidad de luz de una longitud de onda determinada (por ejemplo, la longitud de onda en el rango de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 600 nm) absorbida por la solución de cada depósito, y luego es utilizada para determinar los números de células vivas en los depósitos de ensayo, en relación con el número de células vivas en uno o más depósitos de control dentro de los cuales no se agregaron composiciones de prueba.

Las composiciones que fueron evaluadas incluyeron el Transfer Factor Advanced™, que se consigue en 4Life Research; Transfer Factor Plus Advanced™, también que se consigue en 4Life Research; la Composición A, la cual incluye tanto el factor de transferencia como una cantidad elevada de moléculas de nanofración; Composición B, la cual incluye el factor de transferencia, una cantidad elevada de moléculas de nanofración y otros ingredientes que se considera que mejora la actividad del sistema inmune; moléculas de nanofración de calostro bovino; moléculas de nanofración de huevo de gallina, e interleucina-2 (IL-2), que se consigue bajo la marca comercial de Proleukin de Chiron de los Países Bajos, la cual es sabido que tiene una lista de las células NK contra las células cancerosas.

La sangre fue obtenida de cinco donantes saludables. Se utilizaron procesos conocidos para aislar las células de glóbulos blancos y otros constituyentes de la sangre. Las técnicas de centrifugación de gradiente de densidad conocida (por ejemplo, utilizando un gradiente de densidad Histopaque® que se consigue en Sigma-Aldrich Corporation de St. Louis, Missouri) son utilizados para aislar las células mononucleares, incluyendo las células NK y otros tipos de células de glóbulos blancos. Las células mononucleares fueron introducidas en el medio de crecimiento RPMI 1640 con suero fetal de becerro (FCS) al 10%. Volúmenes iguales de esta mezcla, incluyendo una concentración de aproximadamente 60,000 células de glóbulos blancos en 100 µl de medio de cultivo, se introdujeron dentro de diferentes depósitos en una placa estándar de 96 depósitos. Las muestras reconstituidas del factor de transferencia y/o las composiciones que contienen la molécula de nanofración identificadas anteriormente, teniendo una concentración cada una de 0.100 mg de polvo a 1 ml de solución estéril, se agregó agua desionizada a tres diferentes depósitos con un contenido de células de glóbulos blancos y medio de crecimiento, por un total de dieciocho depósitos. Además, se introdujeron 1,000 IU/ml de IL-2 en tres depósitos de control positivo que contienen la mezcla de medio de crecimiento de la célula mononuclear. Tres depósitos de control negativo incluyeron solamente la mezcla del medio de crecimiento de células mononucleares, sin inmuno-reguladores. También se incluyeron tres controles negativos solamente de células efectoras en la mezcla del medio de crecimiento de la célula mononuclear, mientras que se incluyeron depósitos de control negativos solamente de tres células objetivo de 100 µl de medio de crecimiento.

Las células mononucleares fueron incubadas por sus composiciones de inmuno-regulación respectivas (excepto los tres depósitos de control negativo) en la presencia de CO<sub>2</sub> al 5% a una temperatura de 37°C y 100% de humedad durante 48 horas.

Después de la incubación, se introdujeron aproximadamente 30,000 células K-562 en cada depósito, excepto en los tres depósitos de control negativos solamente de células efectoras, que contenían células mononucleares y medio de crecimiento. La placa de 96 depósitos y las mezclas en sus depósitos fueron nuevamente incubadas en la presencia del CO<sub>2</sub> al 5%, en una temperatura de 37°C y una humedad de 100% durante 48 horas.

La solución MTT, que tiene una concentración de 5 mg MTT/ml solución salina de Henk, fue preparada de acuerdo con técnicas estándar conocidas. Treinta microlitros (20 µl) de la solución MTT fueron introducidas en cada depósito que contiene células de tumor-medio de crecimiento celular mononuclear de la placa de 96 depósitos. La placa y el contenido de sus depósitos fueron nuevamente incubados en la presencia de CO<sub>2</sub> al 5% a una temperatura de 37°C y 100% de humedad, esta vez por aproximadamente cuatro horas.

Después de esta incubación final, la placa de 96 depósitos fue centrifugada a una velocidad de aproximadamente 1,500 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, el sobrenadante (líquido) fue removido de cada depósito y se introdujeron 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) en cada depósito que contenía células mononucleares y células de

tumor. Entonces se utilizó un espectrofotómetro para medir la densidad óptica, en una longitud de onda de 540 nm de cada depósito que contenía las células. La densidad óptica medida entonces fue utilizada para determinar el índice de citotoxicidad (%) (CI (%)) de las células NK, como fueron activadas por cada una de las sustancias probadas, utilizando la siguiente fórmula:

$$CI (\%) = [1 - (ODE_{+t} - ODE) / OD_t] \times 100,$$

en donde ODE<sub>+t</sub> es la densidad óptica de cada depósito de prueba correspondiente a una composición probada, incluyendo la IL-2 del control positivo, ODE es la densidad óptica promedio de los tres depósitos de control negativo solamente de células efectoras; y OD<sub>t</sub> es la densidad óptica promedio de los tres depósitos de control negativo de solamente de tres células objetivo. El CI(%) representa el porcentaje de células objetivo que habían sido exterminadas por las células NK en cada depósito que también contenía la composición de inmuno-regulación probada. Los resultados se representan en la siguiente tabla:

TABLA 8

Composición de inmuno-regulación	CI (%)	Actividad Relativa
Transfer Factor Advanced®	43.1	55
Transfer Factor Plus Advanced®	38.5	49
Composición A	60.3	77
Composición B	57.9	74
Moléculas de nanofracción, calostro	77.9	100
Moléculas de nanofracción, huevo	68.7	88
IL-2	77.0	84

Estos datos, los cuales también están ilustrados en la gráfica de la figura 4, muestran las composiciones que incluyen las moléculas de nanofracción, particularmente aquellas del calostro bovino, que son aproximadamente tan efectivas como o más efectivas que la IL-2 para obtener la actividad de la célula NK contra las células de tumor K-562, mientras que las composiciones que incluyen el factor de transferencia de calostros y huevos y las moléculas de nanofracción del calostro (por ejemplo, la Composición A y la Composición B) activan las células NK de una manera más efectiva que las composiciones que carecen de las moléculas de nanofracción.

Agregando tan poco como el 2% en peso más de moléculas de nanofracción a una composición que incluye el factor de transferencia, las moléculas de nanofracción pueden impulsar la acción de los componentes no específicos (por ejemplo, células NK) de la porción portada por las células de un sistema inmune del sujeto, complementando la capacidad del factor de transferencia para promover la actividad de los componentes específicos del antígeno de la porción portada por las células del sistema inmune de dicho sujeto.

Cuando se consideran juntos, los resultados de los EJEMPLOS del 5 al 7 demuestran que los factores de transferencia regulan y preparan las células auxiliaoras T, lo cual hace posible que un sistema inmune de un sujeto responda más rápidamente y de manera más eficiente a los patógenos y otras entidades no deseadas. Además, los EJEMPLOS del 5 al 7 ilustran que el factor de transferencia puede mejorar la actividad de las células de memoria T.

Los EJEMPLOS del 5 al 7 también muestran que la adición de moléculas extra del inmuno-regulador de nanofracción a las composiciones que incluyen el factor de transferencia puede fortificar y mejorar la inmuno-regulación (por ejemplo, de las células auxiliaoras T, células de memoria T, y células NK) del factor de transferencia y de las composiciones existentes que incluyen el factor de transferencia.

Un método para regular la inmunidad portada por la célula de un sujeto incluye la administración (por ejemplo, de manera enteral, parenteral, etc), de una composición que incluye moléculas de nanofracción al sujeto. Las moléculas de nanofracción pueden ser administradas solas, o como parte de una composición que consiste esencialmente de moléculas de nanofracción o pueden ser administradas por una composición (por ejemplo, una composición tal como la que se establece en las TABLA 4 o TABLA 5) que incluye el factor de transferencia. La administración puede ocurrir en una base regular en un esfuerzo para mantener un equilibrio general de la inmunidad portada por las células del sujeto, y puede ser efectuada en respuesta a una infección, un padecimiento auto-inmune, un trasplante de tejidos, u otro evento que afecta (activa o suprime) la inmunidad portada por las células de un sujeto.

La administración de las composiciones que incluyen el inmuno-regulador de nanofracción de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se considera que regulan la actividad inmune portada por las células basada en la necesidad fisiológica. Por ejemplo, la actividad inmune no deseada portada por la célula (por ejemplo, auto-inmunidad, etc) puede ser reducida. Como otro ejemplo, la capacidad de las células T para eliminar los patógenos

5 indeseables, así como otras entidades indeseables, tales como células cancerosas y otras células aberrantes o mutadas del cuerpo de un sujeto (por ejemplo, activando las células auxiliaoras T (CD4+), las cuales a la vez activan las células exterminadoras naturales (NK), aumentando la inmunidad específica al antígeno haciendo posible que las células de memoria T, etc.) puedan también enfocarse y mejorar, particularmente cuando es administrado el factor de transferencia con una cantidad adicional de moléculas del inmuno-regulador de nanofracción.

10 Aunque la descripción anterior contiene muchos puntos específicos, estos no deben ser interpretados como que limitan el alcance de la presente invención, sino que únicamente proporcionan ilustraciones de algunas de las modalidades actualmente preferidas. De un modo similar, se pueden preveer otras modalidades de la presente invención las cuales no se salgan del espíritu o alcance de la presente invención. Las características de las diferentes modalidades pueden ser empleadas en combinación. El alcance de la presente invención es, por lo tanto, indicado y limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales, en vez de por la descripción anterior. Todas las adiciones, eliminaciones y modificaciones a la presente invención como se describe en el presente documento que se encuentra dentro del significado y el alcance de las reivindicaciones deberán ser incluidas por las mismas.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición adecuada para mejorar la función inmunitaria que consiste en un extracto seleccionado de un extracto de calostro o de un extracto de huevos, careciendo el extracto de factor de transferencia y consistiendo en moléculas de nanofracción que tienen pesos moleculares de a lo sumo 3.000 Da.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el calostro es calostro bovino y los huevos son huevos de gallina.
3. Una composición adecuada para mejorar la función inmunitaria, que comprende:
  - a. un primer extracto que comprende un componente inmunomodulador, siendo el primer extracto un extracto de calostro que tiene un límite superior de peso molecular de aproximadamente 10.000 Da e incluyendo factor de transferencia y moléculas inmunomoduladoras de nanofracción que tienen pesos moleculares de 3.000 Da o inferiores; y
  - 10 b. un segundo extracto, siendo el segundo extracto el extracto como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que el segundo extracto es un extracto de calostro bovino.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que el primer y segundo extractos son extractos en polvo de calostro bovino y la composición incluye además un extracto de huevos de gallina que es de yema de huevo en polvo.
- 15 6. La composición de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que el segundo extracto comprende al menos aproximadamente el dos por ciento del peso del componente inmunomodulador.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que:
  - a. el primer extracto comprende aproximadamente el 68% del peso del componente inmunomodulador; y
  - 20 b. el extracto de huevos de gallina comprende aproximadamente el 30% del peso del componente inmunomodulador.
8. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en la que la mejora de la función inmunitaria comprende aumentar la actividad de al menos uno de linfocitos T de memoria T, linfocitos T auxiliares y linfocitos citolíticos naturales contra patógenos, células cancerosas y células aberrantes o mutadas.
- 25 9. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en la que la mejora de la función inmunitaria comprende la disminución de la actividad inmunitaria mediada por células no deseables.
10. Uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para la producción de un complemento dietético.
11. Uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, como un complemento dietético.

30

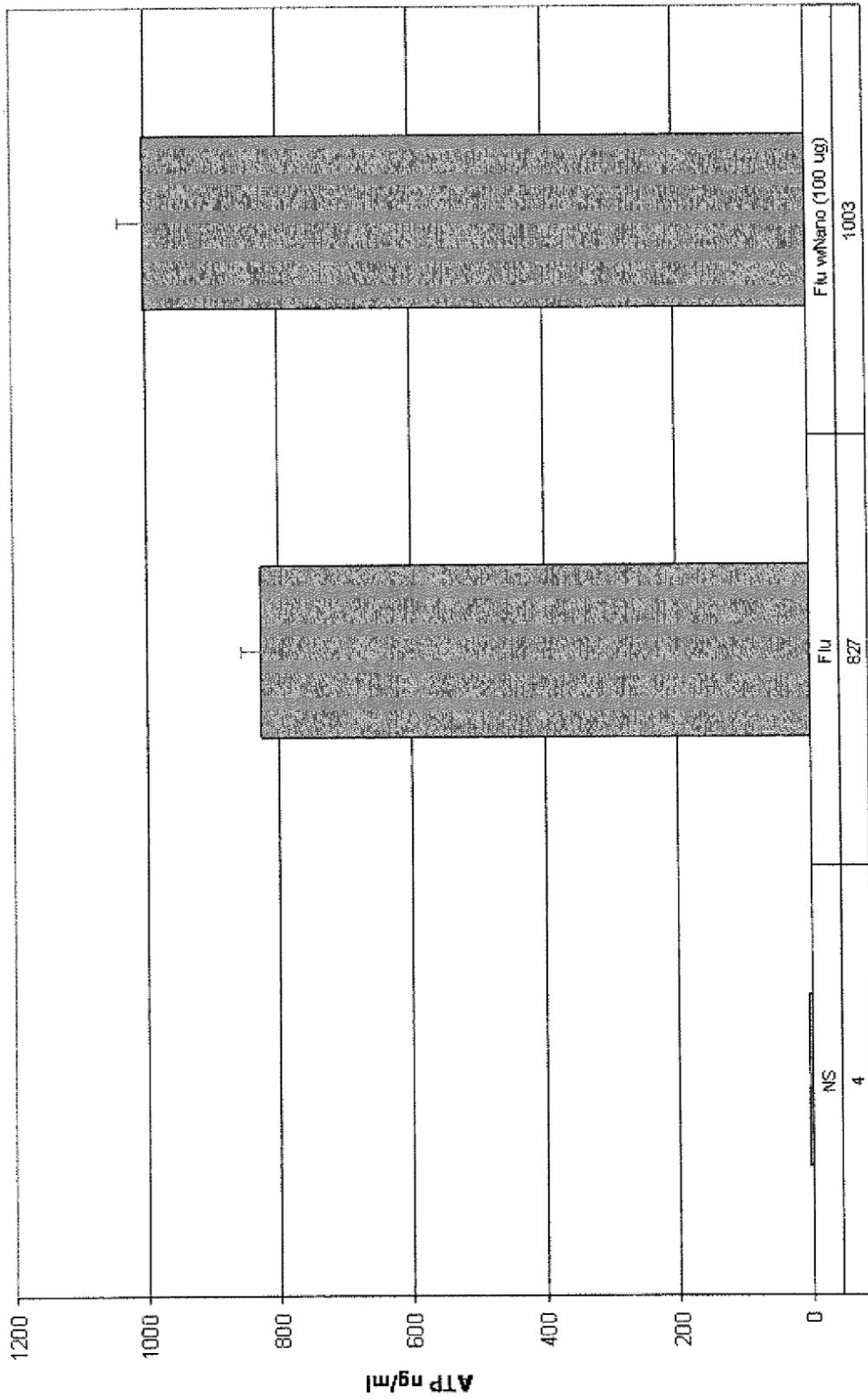


FIG. 1

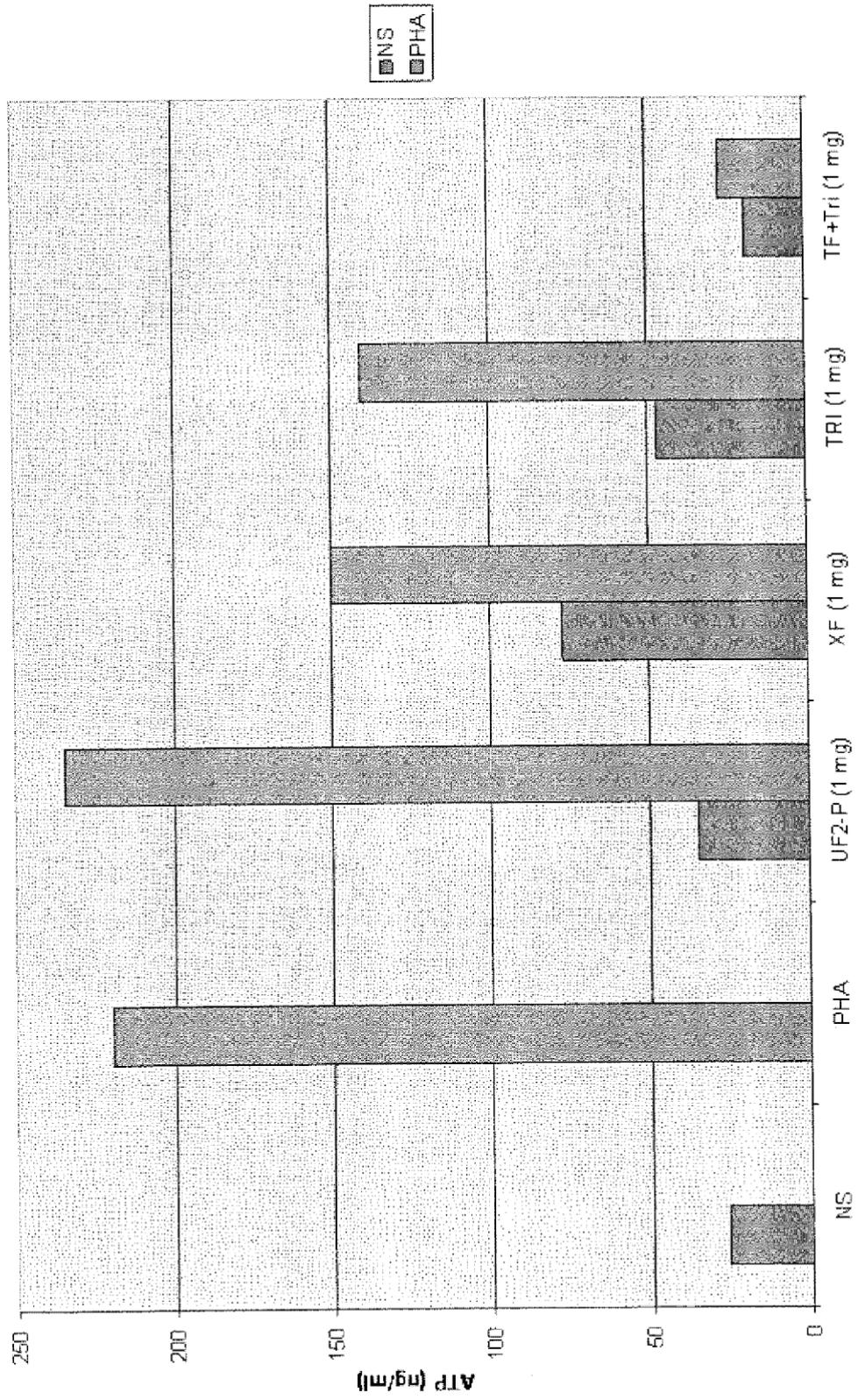


FIG. 2

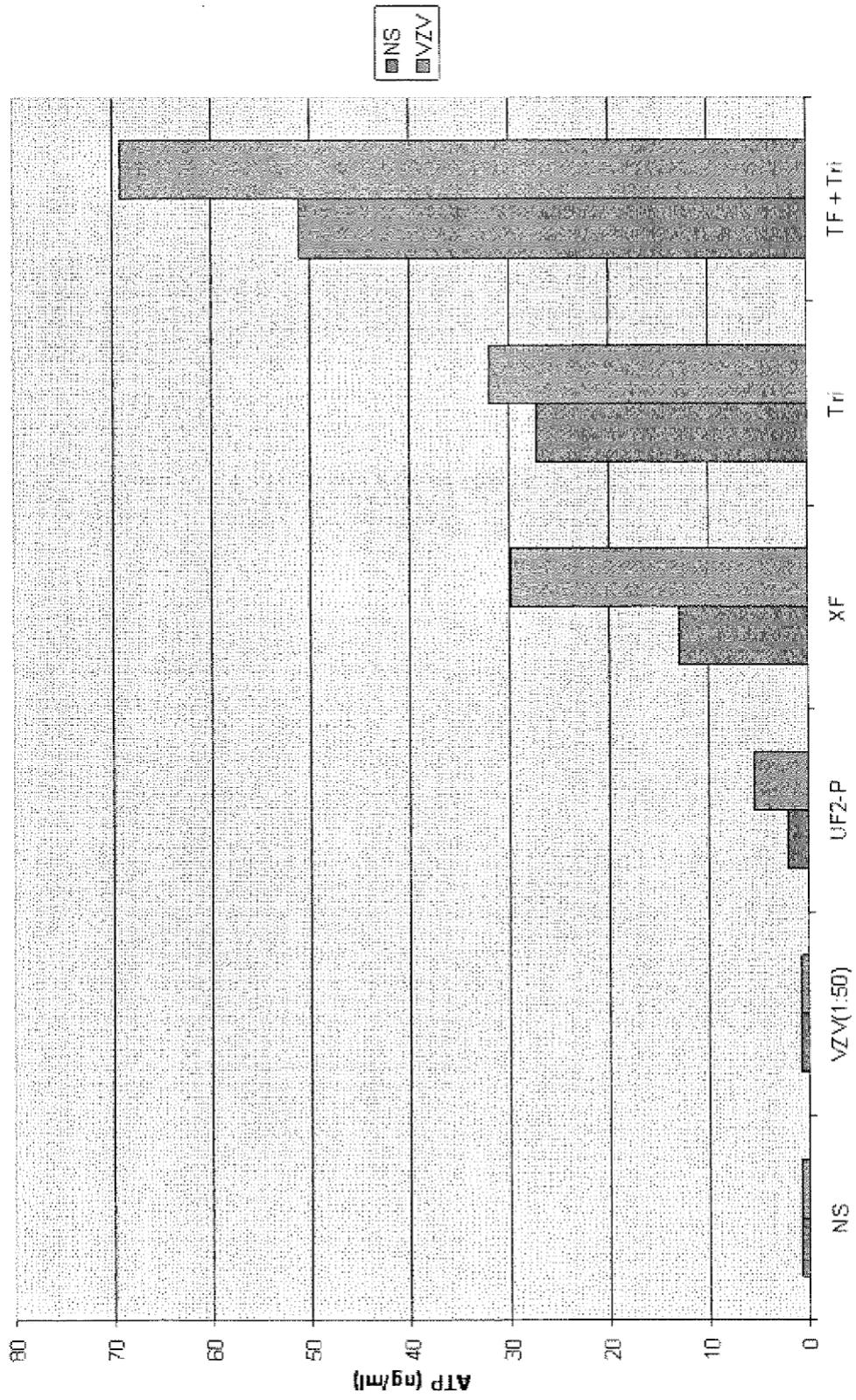


FIG. 3

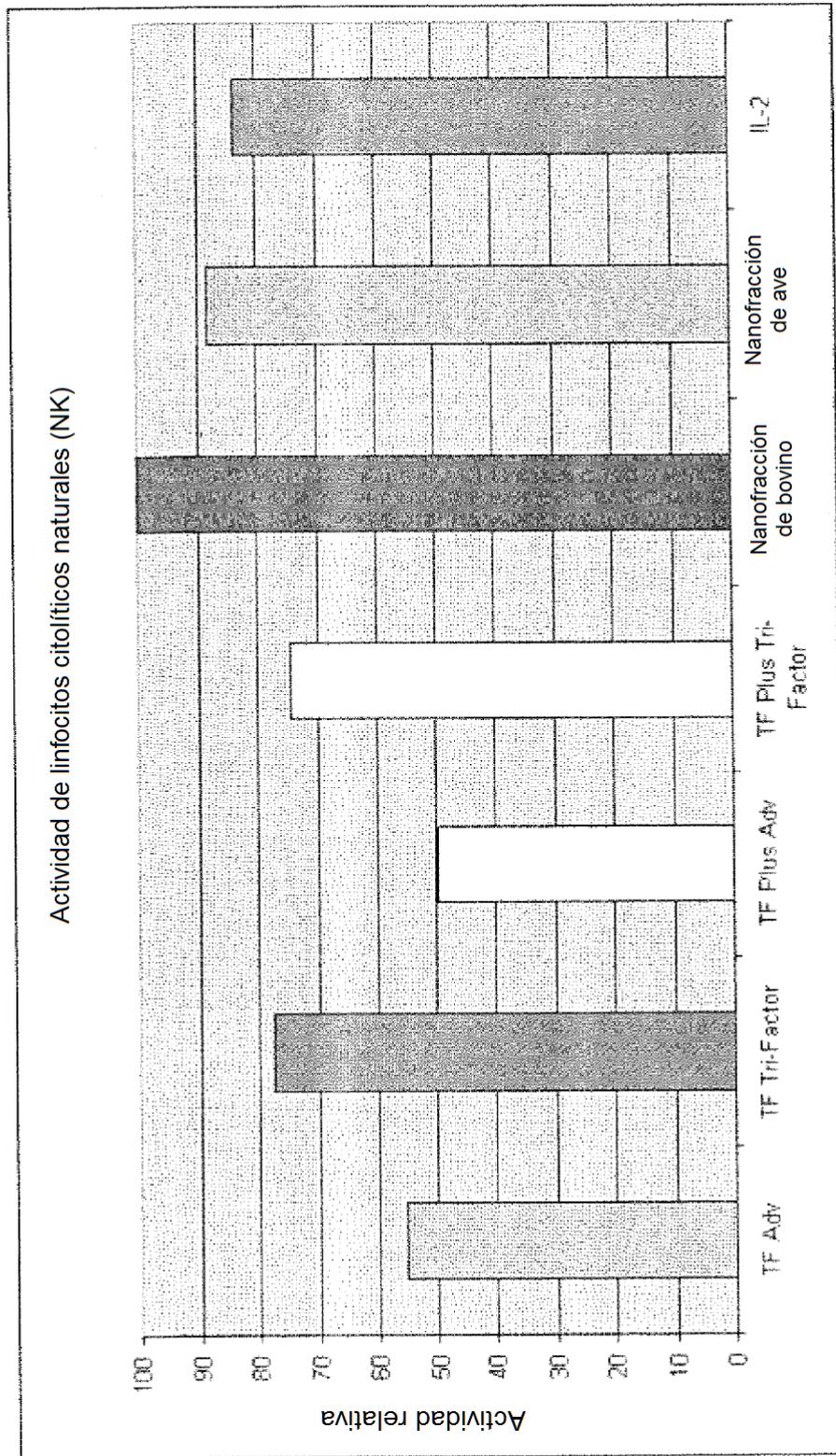


FIG. 4