

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 734**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2011 PCT/US2011/061708**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12071346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2011 E 11843171 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2643017**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento en aplicaciones clínicas de espectro general, no diferenciadas o mixtas**

30 Prioridad:

23.11.2010 US 416667 P

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

17.02.2020

73 Titular/es:

**PANTHERYX, INC. (100.0%)
5480 Valmont Rd. Suite 325
Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:

STARZL, TIMOTHY, W.

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 742 734 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para el tratamiento en aplicaciones clínicas de espectro general, no diferenciadas o mixtas

5

SECTOR DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación da a conocer composiciones y procedimientos para la inmunización pasiva. Se dan a conocer composiciones que comprenden una combinación sinérgica de anticuerpos policlonales específicos con una matriz portadora. La presente divulgación da a conocer composiciones y procedimientos efectivos y económicos para el tratamiento de infecciones patógenas en aplicaciones clínicas de amplio espectro, no diferenciadas o mixtas. Específicamente, se dan a conocer composiciones y procedimientos para el tratamiento de diarrea e infecciones entéricas.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Los anticuerpos, inmunoglobulinas y otros factores inmunes biológicos (en el presente documento, denominados colectivamente anticuerpos), tanto naturales como sus análogos sintéticos, son agentes terapéuticos conocidos en seres humanos y animales. Los anticuerpos operan mediante la unión (a través de fuerzas no covalentes) entre el sitio de combinación del antígeno sobre el anticuerpo y una parte del antígeno llamada el determinante antigénico o epítipo. Los anticuerpos son capaces de altos grados de especificidad. Por ejemplo, el sector de los anticuerpos monoclonales se ha desarrollado en gran medida en el ímpetu de producir características de unión cada vez más específicas y precisas. Sin embargo, esta alta especificidad puede conducir a atributos de unión excesivamente limitados, en los que los agentes o antígenos que son funcionalmente idénticos no reaccionan de manera idéntica con el agente inmunorreactivo o inmunoterapéutico. Por otro lado, la reactividad cruzada, que generalmente se considera un error o un fracaso para conseguir la especificidad de unión, es la reacción entre un antígeno y un anticuerpo que se ha generado contra un antígeno similar pero distinto. La reactividad cruzada controlada puede utilizarse constructivamente para ampliar el intervalo de unión del anticuerpo.

20

25

30

El calostro ha evolucionado naturalmente en los mamíferos específicamente para administrar sus componentes a los neonatos, hacia el tracto gastrointestinal y a través del mismo, en una forma muy concentrada de bajo volumen. Se sabe que el calostro contiene anticuerpos, tales como la IgA, la IgG y la IgM. Entre otros componentes del calostro se incluyen lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa, complemento y polipéptidos ricos en prolina (PRP). También se encuentran en el calostro varias citocinas (péptidos mensajeros pequeños que controlan el funcionamiento del sistema inmunológico), entre las que se incluyen las interleucinas, el factor de necrosis tumoral, las quimiocinas y otros. El calostro también contiene una serie de factores de crecimiento, tales como los factores de crecimiento tipo insulina I y II, los factores de crecimiento transformante alfa, beta 1 y beta 2, factores de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento estimulante de macrófagos de granulocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular y factor-I estimulante de colonias.

35

40

Los anticuerpos y cofactores en el calostro pueden, a través de la lactancia materna, proporcionar una inmunidad pasiva al receptor. Normalmente, los anticuerpos y cofactores se transmiten al neonato de la madre y brindan la primera protección contra los patógenos. Los factores de crecimiento también estimulan el desarrollo y reparan el intestino.

45

Una afección que podría abordarse mediante la utilización de inmunidad pasiva es la diarrea. La diarrea está provocada principalmente por la ingestión de patógenos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el ochenta y ocho por ciento de los casos de diarrea en todo el mundo son atribuibles a agua insegura, saneamiento inadecuado o higiene insuficiente. Estos casos dan como resultado, aproximadamente, 1,5 millones de muertes cada año, la mayoría de las cuales son muertes de niños. (Pruss-Ustun et al., Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote world health. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2008. ISBN 9789241596435).

50

De preocupación mundial particular, son los casos de diarrea infecciosa en el mundo en desarrollo, que son causa de una tremenda morbilidad y mortalidad continua, particularmente entre la población pediátrica. Por ejemplo, la India tiene una de las tasas de mortalidad infantil más elevadas del mundo, según un informe de las Naciones Unidas sobre Desarrollo Humano de 2009. Por ejemplo, Save the Children, una organización sin ánimo de lucro mundial informa que un niño muere cada 15 segundos en la India, y el 90 % de estas muertes se deben a dolencias prevenibles, tales como la diarrea. La OMS recomienda las vacunas contra el rotavirus y el sarampión, el lavado de manos con jabón, el suministro mejorado de agua potable y el saneamiento en toda la comunidad para prevenir la diarrea. Sin embargo, estas medidas no son eficaces para tratar la dolencia.

55

60

El protocolo de tratamiento estándar en gran parte del mundo para la diarrea pediátrica incluye una administración simultánea de antibióticos y terapia rehidratante oral. Por muchas razones, los antibióticos son un medicamento recetado. Los antibióticos no son efectivos en el tratamiento de infecciones virales. Por ejemplo, se estima que el rotavirus causa, aproximadamente, el 40 por ciento de todos los ingresos hospitalarios debido a diarrea entre los niños

65

menores de cinco años en todo el mundo. (Weekly Epidemiological Record, vol. 83, n.º 47, 21 de noviembre de 2008). La utilización inadecuada de antibióticos puede promover cepas resistentes de bacterias. A su vez, la infección puede estar provocada por una cepa resistente de bacterias. Incluso en las mejores circunstancias, la utilización de un antibiótico apropiado puede tardar varios días para reducir la gravedad de los síntomas de la diarrea.

Otra desventaja de los antibióticos es que la administración puede inducir la destrucción de bacterias patógenas y benignas encontradas en el tracto GI, lo que puede dar como resultado la liberación de lipopolisacáridos endotóxicos. (Holzheimer, The significance of endotoxin release in experimental and clinical sepsis in surgical patients--evidence for antibiotic-induced endotoxin release? Infection. 1998 Mar-Abr; 26 (2): 77-84) Estas endotoxinas tienen una gran cantidad de efectos sistémicos adversos, entre los que se incluyen fiebre, cambios en los recuentos de glóbulos blancos, coagulación intravascular diseminada, hipotensión, choque y muerte, malabsorción; de hecho, la inyección directa de dosis bastante pequeñas de endotoxinas produce la muerte en la mayoría de los mamíferos. Todar K. Bacterial Endotoxin. Textbook of Bacteriology. 2008. textbookofbacteriology.net.

Según la OMS, la terapia de rehidratación oral y el cinc con alimentación continua, incluida la lactancia materna, se recomienda para el tratamiento de la diarrea infantil. Se utiliza el jarabe de cinc o la solución de rehidratación oral fortificada con cinc (ORS, "Oral Rehydration Solution", 40 mg/l) normalmente en una dosis de, aproximadamente, 15 a 30 mg por día. El cinc es barato, pero tiene una eficacia modesta. El jarabe de cinc da como resultado sólo una reducción de, aproximadamente, el 25 por ciento en la duración de la diarrea aguda y una reducción del 40 por ciento en el fracaso del tratamiento o la muerte. (Bhutta et al. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. The American Journal of Clinical Nutrition. 2000; 72 (6): 1516-22). Un estudio evaluó la eficacia y seguridad de una ORS fortificada con cinc (40 mg/l) entre 1.219 niños con diarrea aguda. Los resultados clínicos en el grupo de ORS fortificado con cinc mejoraron moderadamente, en comparación con los del grupo de control, que sólo recibieron ORS estándar. En ese estudio, el número total de heces fue menor entre el grupo de ORS-cinc en comparación con el número total para el grupo de control. No se observó ningún efecto sustancial sobre la duración de la diarrea o el riesgo de diarrea prolongada. (Bahl R, Bhandari N, Saksena M, et al. Efficacy of zinc-fortified oral rehydration solution in 6- to 35-month-old children with acute diarrhea. J Pediatr 2002; 141: 677-82).

La Patente US 2007/264264 describe una composición y un procedimiento para la inmunización de mamíferos, que contiene anticuerpos de los huevos/yemas de huevo de pollos, u otra fuente aviar adecuada, hiperinmunizada contra uno o más patógenos o inmunógenos seleccionados, y una cantidad de anticuerpos no específicos de mamíferos, tal como los de los productos comerciales de calostro o suero, que se combinan para producir una composición que proporciona protección contra el patógeno seleccionado. Las aplicaciones incluyen infecciones virales, bacterianas y parasitarias.

Se sabe que los antibióticos son ineficaces para tratar una infección viral, tal como una infección por rotavirus. Otras intervenciones tienen efectividad limitada. Además, las herramientas de diagnóstico adecuadas para distinguir la causa de la diarrea no siempre están disponibles o son asequibles.

Claramente, es deseable una alternativa rápida, eficaz y económica para el tratamiento de la diarrea indiferenciada. Sigue habiendo una necesidad de composiciones y procedimientos efectivos y económicos para el tratamiento de diarrea e infecciones entéricas en aplicaciones clínicas de amplio espectro, no diferenciadas o mixtas.

45 **CARACTERÍSTICAS DE LA DIVULGACIÓN**

La presente invención se refiere a una composición para su utilización en el tratamiento de diarrea inducida por un patógeno o infecciones entéricas en un ser humano no neonatal, según la reivindicación 1. Realizaciones preferentes de la presente invención se definen en las reivindicaciones dependientes. La composición comprende:

- 50 a) una cantidad eficaz para seres humanos no neonatales de moléculas de unión específica que se unen específicamente a un antígeno, en la que las moléculas de unión específicas comprenden un conjunto de IgY, derivado de pollos inmunizados, específico para, como mínimo, *E. coli spp* enterotoxigénica, factor de adherencia de pilos de *E. coli K99*, toxoide de *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, rotavirus y coronavirus; y
- 55 b) una matriz portadora que comprende calostro bovino.

También se describe, pero no se reivindica, un procedimiento para preparar la composición de la presente divulgación mediante las etapas de (a) obtener a partir de un animal, como mínimo, una molécula de unión específica o un fragmento de la misma que se une a un antígeno específico, en el que la molécula de unión se selecciona de una inmunoglobulina, un anticuerpo, un péptido, un receptor de linfocitos variables, un factor de transferencia y una mezcla de los mismos; (b) obtener, como mínimo, una matriz portadora, que comprende, como mínimo, dos componentes obtenidos de un animal no humano seleccionados entre el grupo que comprende enzimas, lactoferrina, transferrina, inmunoglobulinas no específicas, citocinas, glóbulos blancos, componentes del complemento, interferones y fibronectina; c) preparar una forma sólida de la matriz portadora y de la molécula de unión específica o fragmento de la misma; y (d) mezclar la forma sólida de la matriz portadora con la forma sólida de la molécula de unión específica o fragmento de la misma.

También se describe, pero no se reivindica, un procedimiento para preparar una composición que confiere inmunidad. El procedimiento incluye (a) obtener, como mínimo, un factor inmune específicamente dirigido de origen exógeno; (b) preparar una forma en polvo del, como mínimo, un factor inmune específicamente dirigido de origen exógeno; (c) obtener, como mínimo, una matriz portadora de origen exógeno, matriz portadora de origen exógeno mezclada opcionalmente con una mezcla de agentes para soportar e interactuar con el factor inmune específicamente dirigido de origen exógeno; (d) preparar una forma en polvo de la, como mínimo, una matriz portadora de origen exógeno; y (e) mezclar la forma en polvo de la etapa (b) con la forma en polvo de la etapa (d), obteniendo de este modo la composición que confiere inmunidad pasiva. En un aspecto, la composición que confiere inmunidad pasiva incluye una formulación de dosis controlada. En diversos aspectos, la composición que confiere inmunidad pasiva incluye un portador farmacéuticamente aceptable. En diversos aspectos, la composición que confiere inmunidad pasiva no incluye un polímero, copolímero, liposoma, hidrogel o fibrina. En diversos aspectos, la composición que confiere la inmunidad pasiva no incluye microesferas o microcápsulas. En diversos aspectos, la composición que confiere la inmunidad pasiva no incluye un inmunógeno o antígeno.

La presente divulgación incluye, como mínimo, uno de los siguientes atributos: (a) permite el diseño personalizado de la matriz, los factores específicos y los eventos de activación para dolencias específicas o dirigidas; (b) permite la formulación de dosis controladas de una variedad de mezclas de componentes, que pueden ajustarse o modularse para su efecto; (c) permite una formulación de dosis controlada que proporciona componentes específicos por encima de los niveles fisiológicos normales que pueden conseguirse en sistemas naturales; (d) utiliza interacciones complejas multicomponente en múltiples vías para crear un efecto de sistemas que emula una respuesta nativa del sistema inmunitario; (e) permite la creación de una respuesta inmune pasiva precondicionada o potenciada que puede administrarse en su estado potenciado y, posteriormente, activar mediante la presencia de los patógenos, toxinas, estado de dolencia o síndrome diana; (f) permite la creación de formulaciones que tienen una especificidad definida o un efecto de amplio espectro, para satisfacer las necesidades del estado o síndrome de la dolencia diana específica, o del entorno práctico en el que se utilizará el producto; y (g) permite la creación de formulaciones que pueden ser dirigidas tanto para la profilaxis como para la intervención terapéutica.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la frecuencia de las heces diaria promedio durante un período de cinco días para dos grupos de examen de prueba de campo en comparación con el control negativo para la composición del ejemplo 1A. En la prueba 1 (n=29) y la prueba 2 (n=31), la composición del ejemplo 1A se administra una vez al día durante tres días con antibióticos y sales de rehidratación oral (ORS). En el control negativo (n=28), sólo se administran antibióticos y ORS sin una composición de la presente divulgación.

La figura 2 muestra la consistencia promedio diaria de las heces en una escala de 1 a 5 (1=normal y 5=líquida) durante el mismo período de cinco días para los mismos tres grupos de la figura 1.

La figura 3 muestra el bienestar promedio evaluado por un médico en una escala de 1 a 5 (1=normal y 5=gravemente enfermo) durante el mismo período de cinco días para los mismos tres grupos de la figura 1.

La figura 4 muestra la frecuencia promedio diaria de las heces durante un período de cinco días para tres grupos de examen de estudio de campo (prueba). Las pruebas 1 y 2, y el control negativo, son tal como se describen para la figura 1. En la prueba 3 (n=140), a los pacientes se les administró la composición del ejemplo 1B con antibióticos y ORS.

La figura 5 muestra la consistencia promedio diaria de las heces en una escala de 1 a 5 (1=normal y 5=líquida) durante el mismo período de cinco días para los mismos cuatro grupos de la figura 4.

La figura 6 muestra el bienestar promedio evaluado por un médico en una escala de 1 a 5 (1=normal y 5=gravemente enfermo) durante el mismo período de cinco días para los mismos cuatro grupos de la figura 4.

La figura 7 muestra la frecuencia promedio diaria de las heces durante un período de cinco días para las pruebas 1 y 2, control negativo, la prueba 3 se divide en 6 subgrupos (ES204A): 2 g de huevo secado por pulverización con 4 g de calostro administrado durante 3 días; (ES204B): 2 g de huevo secado por pulverización con 4 g de calostro administrado durante 2 días; (MT204A) 2 g de huevo secado térmicamente con 4 g de calostro durante 3 días; (MT304A) 3 g de huevo secado térmicamente con 4 g de calostro durante 3 días; (MS204A) 2 g de huevo secado por pulverización con 4 g de calostro durante 3 días; (MS304A) 3 g de huevo secado por pulverización con 4 g de calostro durante 3 días.

La figura 8 muestra la consistencia promedio diaria de las heces en una escala de 1 a 5 (1=normal y 5=líquida) durante el mismo período de cinco días para los mismos grupos de la figura 7.

La figura 9 muestra el bienestar promedio evaluado por un médico en una escala de 1 a 5 (1=normal y 5=gravemente enfermo) durante el mismo período de cinco días para los mismos grupos de la figura 7.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

Los términos "prevención", "prevenir", "que previene", "profilaxis" y tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a un curso de acción (tal como la administración de un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación) iniciado antes del inicio de una manifestación clínica de un estado o afección de dolencia para

prevenir o reducir dicha manifestación clínica del estado o afección de la dolencia. Esta prevención y supresión no necesitan ser absolutas para ser útiles.

5 Los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a un curso de acción (tal como la administración de un compuesto o una composición farmacéutica) iniciado después del inicio de una manifestación clínica de un estado o afección de dolencia para eliminar o reducir dicha manifestación clínica del estado o afección de la dolencia. Este tratamiento no necesita ser absoluto para ser útil.

10 La expresión "en necesidad de tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un juicio hecho por un cuidador sobre que un paciente requiere o se beneficiará del tratamiento. Este juicio se basa en una variedad de factores que se encuentran dentro del ámbito de la experiencia de un cuidador, pero entre estos se incluyen el conocimiento de que el paciente está enfermo, o estará enfermo, como resultado de una afección que se puede tratar con un procedimiento, compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación.

15 El término "en necesidad de prevención", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un juicio hecho por un cuidador de que un paciente requiere o se beneficiará de la prevención. Este juicio se basa en una variedad de factores que se encuentran dentro del ámbito de la experiencia de un cuidador, pero entre estos se incluyen el conocimiento de que el paciente estará enfermo o puede enfermarse, como resultado de una afección que se puede prevenir con un procedimiento, compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación.

20 Los términos "individuo", "individuo" o "paciente", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a cualquier animal, entre los que se incluyen aves o mamíferos, tales como ratones, ratas de Noruega, ratas del algodón, jerbos, conejos de indias, hámsteres, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos o primates, y seres humanos. El término puede especificar hombre o mujer o ambos, o excluir hombre o mujer. En un aspecto, el paciente es un ser humano adulto. En otro aspecto, el paciente es un ser humano niño no neonatal. En otro aspecto, el paciente es un niño pequeño, un niño o un adolescente.

30 El término "neonatal", o recién nacido, se refiere a un bebé en los primeros 28 días después del nacimiento. El término "no neonatal" se refiere a un animal mayor de 28 días.

35 La expresión "cantidad eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente, ya sea solo o como parte de una composición farmacéutica, que puede tener cualquier efecto positivo detectable en cualquier síntoma, aspecto o características de un estado o afección de dolencia. Este efecto no necesita ser absoluto para ser beneficioso.

La expresión "que incluye", tal como se utiliza en el presente documento, no tiene un alcance limitativo, de modo que se contemplan elementos adicionales como posibles además de los enumerados; este término se puede leer en cualquier caso como "incluido, pero sin que constituya limitación".

40 Las expresiones "inmunizar", "inmunizar activamente", "inmunizar activamente" e "inmunización activa" significan inmunizar a propósito a un individuo exponiendo a un individuo a un antígeno, por ejemplo, un antígeno derivado de un microorganismo, tal como, pero sin que constituya limitación, un virus o una bacteria; dicha exposición se puede llevar a cabo exponiendo al individuo a un organismo intacto, un organismo atenuado, una parte del organismo, uno o más antígenos presentes en el organismo o una combinación de los anteriores.

45 Las expresiones "inmunizar pasivamente", "inmunizar pasivamente" y "inmunización pasiva" significan proporcionar anticuerpos contra un antígeno, por ejemplo, un antígeno derivado de un microorganismo, tal como, sin que constituyan limitación, un virus o una bacteria, a un individuo sin provocar necesariamente una respuesta inmune al organismo en el individuo. La inmunización pasiva proporciona protección inmediata, pero el individuo no desarrolla células de memoria como resultado.

50 La expresión "inmunidad pasiva", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la inmunidad adquirida artificialmente obtenida mediante la transferencia de anticuerpos al individuo. Los términos "huevo" o "producto de huevo" significan, cada uno, un huevo de cáscara integral de origen aviar (convencional, inmunizado o no) o cualquier producto o fracción derivada de los mismos.

Las expresiones "huevo inmune" o "producto de huevo inmune" significan cada huevo entero o cualquier producto o fracción derivada del mismo, obtenido de un animal productor de huevo mantenido en un estado inmunizado.

60 El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento del mismo que puede inducir una respuesta inmune en un organismo, particularmente un animal. El término incluye inmunógenos y sus regiones responsables de la antigenicidad o determinantes antigénicos.

65 El término "anticuerpo policlonal" se refiere a anticuerpos que son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse diversos animales huésped mediante

inyección con el antígeno. Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped.

5 El término "anticuerpo monoclonal" está bien reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que se produce en masa en el laboratorio a partir de un solo clon y que reconoce sólo un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se producen normalmente mediante la fusión de una célula B, normalmente de vida corta que produce anticuerpos, a una célula de rápido crecimiento, tal como una célula cancerosa (a veces denominada célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo. Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones sustancialmente homogéneas de anticuerpos dirigidos
10 contra un antígeno o epítipo particular. Pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler, et al., Nature 256: 495-497, 1975, y la Patente US N.º 4.376.110.

15 El término "cristalino" se refiere a un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal que se ha purificado mediante cristalización, tal como mediante cristalización discontinua. Los anticuerpos cristalinos se pueden utilizar para generar un volumen pequeño, formas altamente concentradas. (Yang et al., 2003, Crystalline antibodies for subcutaneous delivery. PNAS 100 (12): 6934-6939).

20 La expresión "diarrea indiferenciada" significa que el agente causante de la diarrea no está diagnosticado.

La expresión "fragmento de anticuerpo" abarca cualquier proteína sintética o modificada genéticamente que actúa como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados, fragmentos "Fv", que comprenden las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, moléculas polipeptídicas recombinantes de cadena simple en las que las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas están conectadas por un conector peptídico ("proteínas scFv"), y unidades de reconocimiento mínimas que comprenden los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen una parte de un anticuerpo, tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, sFv y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.
25
30

La expresión "factor de transferencia" se refiere a una molécula inmune de, aproximadamente, 5000 Dalton, formada por aminoácidos, que provoca inmunidad mediada por células específicas de antígeno, hipersensibilidad principalmente retardada y la producción de linfocinas, así como la unión a los antígenos en sí mismos. (Kirkpatrick 1993, Structural nature and functions of transfer factors. Ann. NY Acad. Sci. 685: 362-368).
35

La expresión "receptores variables de linfocitos" se refiere a las moléculas derivadas de linfocitos descubiertas en vertebrados sin mandíbulas, tales como la lamprea y el mixino. Estos animales poseen una gran variedad de receptores de linfocitos variables que se producen a partir de sólo un pequeño número de genes y que se unen a antígenos patógenos de manera similar a los anticuerpos, y con el mismo grado de especificidad. (Alder et al., 2005 Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. Science, 310 (5756): 1970-1973)
40

La expresión "receptor celular" se refiere al resto de unión al ligando del receptor de células B; una molécula de inmunoglobulina unida a membrana de un isotipo (por ejemplo, IgD, IgM, IgE). Con la excepción de la presencia de un dominio de membrana integral, estos son idénticos a sus formas secretadas.
45

La expresión "unión específica" en el contexto de las características de las moléculas de unión específica, también conocidas como factores inmunitarios específicos, tales como un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, receptor de linfocitos variable o factor de transferencia, se refiere a la capacidad de unirse preferencialmente a un antígeno particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes antígenos. Una interacción de unión específica puede discriminar entre antígenos deseables e indeseables (por ejemplo, antígenos "diana" y "no diana") en una muestra, por ejemplo, más de, aproximadamente, 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de, aproximadamente, 1000 o 10.000 veces). La molécula de unión específica puede unirse específicamente a un epítipo compartido entre diferentes especies o cepas de un microorganismo en comparación con los epítopos no compartidos. La afinidad entre un anticuerpo y un antígeno, cuando se unen específicamente en un complejo antígeno-anticuerpo, puede caracterizarse por una K_D (constante de disociación) de menos de 10^{-6} M, menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 10^{-11} M, o menos de, aproximadamente, 10^{-12} M o menos.
50
55

La expresión "sistema inmune innato", o sistema inmune no específico, se refiere a las células, componentes moleculares y mecanismos que defienden al huésped de la infección por otros organismos de una manera no específica. Las células y los componentes moleculares del sistema inmunitario innato reconocen y responden a los patógenos de una manera genérica, pero a diferencia del sistema inmunitario adaptativo, no confiere inmunidad protectora o duradera al individuo. Los sistemas inmunes innatos proporcionan una defensa inmediata contra la infección. Los vertebrados poseen una segunda capa de protección, el sistema inmune adaptativo, que se activa mediante la respuesta innata.
60
65

La expresión "sistema inmune adaptativo" se refiere a células sistémicas y procesos altamente especializados que reconocen y responden a un antígeno, por ejemplo, para eliminar, neutralizar o prevenir el crecimiento patógeno. El sistema es altamente adaptable debido a la hipermutación somática (un proceso de mutación somática acelerada) y la recombinación V(D)J (una recombinación genética irreversible de los segmentos génicos del receptor de antígeno). La inmunidad adaptativa también se conoce como inmunidad adquirida y crea una memoria inmunológica. Una respuesta inmune adaptativa es específica de patógenos y antígenos y hay un tiempo de retraso entre la exposición y la respuesta máxima. Una respuesta inmune adaptativa se basa en el principio del reconocimiento clonal, de modo que, al exponerse por primera vez a un antígeno, los linfocitos cebados se diferencian en células efectoras inmunitarias o forman un grupo expandido de células de memoria que responden a la exposición secundaria al mismo antígeno mediante el montaje de una respuesta amplificada y más rápida.

El término "animal" se refiere a la definición del reino animal.

Se pretende que todos los pronombres tengan su significado más amplio. A menos que se indique lo contrario, los pronombres femeninos abarcan el masculino, los pronombres masculinos abarcan el femenino, los pronombres singulares abarcan el plural y los pronombres plurales abarcan el singular.

Los intervalos numéricos, tal como se utilizan en el presente documento pretenden incluir cada número y subconjunto de números contenidos dentro de ese intervalo, ya esté específicamente descrito o no. Además, estos intervalos numéricos deben interpretarse como soporte para una reivindicación dirigida a cualquier número o subconjunto de números en ese intervalo. Por ejemplo, una descripción de 1 a 10 se debe interpretar como que admite un intervalo de 2 a 8, de 3 a 7, de 5 a 6, de 1 a 9, de 3,6 a 4,6, de 3,5 a 9,9, etc.

MODOS DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación da a conocer composiciones y procedimientos útiles en el manejo de cepas indeseables o microorganismos patógenos.

La presente divulgación da a conocer también un procedimiento para crear una formulación basada en un anticuerpo dirigido incorporado o introducido dentro de una matriz portadora, en el que los anticuerpos utilizan una forma controlada de reactividad cruzada a múltiples agrupaciones de antígenos diana relacionados, y en el que la matriz portadora contiene un soporte y cofactores que potencian el efecto de los anticuerpos. La utilidad de estas formulaciones de anticuerpos/matrices puede incluir proporcionar intervenciones terapéuticas de amplio espectro en condiciones en las que se conozca o se sospeche la clase de agente causante, pero no el agente causal preciso o específico, o en circunstancias en las que haya múltiples agentes causales (mixtos) activos.

Se ha desarrollado un nuevo enfoque para la utilización de anticuerpos de esta manera, que aprovecha tanto los atributos de especificidad como de reacción cruzada de los anticuerpos, y posteriormente utiliza los componentes dentro de la matriz del portador para generar una respuesta inmune multicomponente *in situ*. En este enfoque, los anticuerpos están diseñados para unirse a todos los diversos epítomos estrechamente relacionados que representan un grupo de antígenos relacionados estructuralmente. Estos antígenos pueden diferir notablemente en otros aspectos y pueden provenir de diversas fuentes, organismos o especies.

La presente divulgación da a conocer el procedimiento de unión específica de moléculas (factores inmunes, por ejemplo, anticuerpos), dentro de la matriz portadora, en la que las moléculas de unión específicas tienen especificidad para una clase de antígenos relacionados, y tienen reactividad cruzada específicamente a diferentes instancias de miembros de ese grupo. Existe un grado de similitud estructural en grupos relacionados de antígenos diana, sin tener en cuenta el organismo o patógeno que es la fuente del antígeno. La similitud en la estructura puede dar lugar a un fenómeno conocido como "reactividad cruzada" (la unión estérica de una molécula reactiva a un antígeno distinto del antígeno pretendido). La reactividad cruzada es a menudo no intencional, y en la mayoría de los casos se considera una fuente de error y no especificidad. Sin embargo, la extensión y el grado de reactividad cruzada pueden controlarse por diversos medios para limitar y canalizar su expresión para proporcionar las características deseadas.

Este tratamiento proporciona inmunidad pasiva a los pacientes. La naturaleza del tratamiento hace que los factores de riesgo asociados sean comparables a los de comer alimentos de la fuente en la que se recolectaron los anticuerpos (por ejemplo, los factores de riesgo serían similares a los de comer un huevo y un vaso de leche). Este es un tratamiento efectivo con menos toxicidad que las intervenciones alternativas disponibles actualmente.

La presente divulgación se basa en el descubrimiento seminal de que la utilización de una matriz portadora de origen exógeno (que contiene componentes obtenidos de un animal diferente del animal a tratar) en combinación con factores inmunes específicamente dirigidos de origen exógeno (factores inmunes obtenidos o correspondientes a los obtenidos de un animal diferente al animal a tratar) se pueden utilizar para transportar e introducir una inmunidad multiparamétrica eficaz a un individuo que lo necesite.

En un aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición que comprende: a) una cantidad eficaz en un

ser humano no neonatal de, como mínimo, una molécula de unión específica, o un fragmento de la misma obtenida de un animal y que se une específicamente a un antígeno, en la que la molécula de unión específica se selecciona entre una inmunoglobulina, un anticuerpo, un péptido, un receptor de linfocitos variables, un factor de transferencia y una mezcla de los mismos y, b) una matriz portadora que comprende, como mínimo, dos componentes obtenidos de un animal no humano seleccionados entre el grupo que comprende enzimas, lactoferrina, transferrina, inmunoglobulinas no específicas, citocinas, glóbulos blancos, componentes del complemento, interferones y fibronectina, en la que la, como mínimo, una molécula de unión específica y los, como mínimo, dos componentes de la matriz portadora se obtienen de diferentes animales.

En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer un procedimiento para preparar la composición que comprende (a) obtener, como mínimo, una molécula de unión específica o un fragmento de la misma de un animal que se une a un antígeno específico, en la que la molécula de unión específica se selecciona entre una inmunoglobulina, anticuerpo, péptido, receptor variable de linfocitos, factor de transferencia y una mezcla de los mismos; (b) obtener, como mínimo, una matriz portadora, que comprende, como mínimo, dos componentes obtenidos de un animal no humano seleccionados entre el grupo que comprende enzimas, lactoferrina, transferrina, inmunoglobulinas no específicas, citocinas, glóbulos blancos, componentes del complemento, interferones y fibronectina; (c) preparar una forma sólida de la matriz portadora y de la molécula de unión específica o fragmento de la misma; y (d) mezclar la forma sólida de la matriz portadora con la forma sólida de la molécula de unión específica o fragmento de la misma.

En otro aspecto adicional, las composiciones de la presente divulgación son útiles en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas. En las realizaciones, las infecciones microbianas incluyen las causadas por *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Salmonella enterica serovar Typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli*, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* hemorrágica, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio* O139, *Vibrios* No-O1, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Helicobacter* enterohepático, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, rotavirus, coronavirus, norovirus, calicivirus, adenovirus entérico, citomegalovirus, y astrovirus. Las composiciones pueden ser útiles para tratar o prevenir afecciones tales como diarrea indiferenciada, diarrea del viajero, diarrea por rotavirus, diarrea mediada por toxinas, cólera, infección por *C. difficile*, disentería, fiebre tifoidea, úlceras pépticas, vaginitis o para el manejo de la flora gastrointestinal.

Las composiciones y procedimientos de la presente divulgación se utilizan en el tratamiento o prevención de la diarrea. Hay múltiples organismos que causan diarrea, entre los que se incluyen virus, bacterias, parásitos y protozoos. Entre las principales causas de infección bacteriana, por ejemplo, en la India, se incluyen *Escherichia coli* spp., *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* entero-adherente. *Aeromonas* spp., *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Yersinia enterocolitica*. Entre las causas secundarias se incluyen *Clostridium difficile* (toxina A o B). La causa principal de la diarrea viral es la infección por Rotavirus; aunque también se sabe que Calicivirus, Astrovirus, el virus de Norwalk y Adenovirus causan diarrea. Entre las causas secundarias de la diarrea viral se incluyen el adenovirus entérico, el virus del herpes simple y la hepatitis viral. (John B. Sullivan y Gary R. Krieger, *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*, 2ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2001, página 1040).

También se sabe que existen diferencias regionales y estacionales en la prevalencia. Por ejemplo, en Pranam, India, un estudio informó que el rotavirus representó un promedio del 15-25 % de los casos infantiles de diarrea. La *E. coli* enterotoxigénica fue responsable del 10 al 20 % del total de casos de diarrea, y la *E. coli* enteropatógena causó, aproximadamente, del 1 al 5 % de los casos. La infección por *Campylobacter jejuni* causó, aproximadamente, del 10 al 15 %, y *Shigella* causó, aproximadamente, del 5 al 15 % de los casos de diarrea infantil. *Vibrio cholera* causó, aproximadamente, del 5 al 10 % de los casos. La salmonela (no tifoidea) causó, aproximadamente, del 1 al 5 % de los casos. La infección por protozoos fue causada principalmente por *Cryptosporidium* (5-15 %). No se identificó ninguna causa patógena en, aproximadamente, del 20 al 30 % de los casos. (Fricker, *Children in the Tropics, Putting an end to diarrheal diseases*, 1993-No. 204: 1-66).

Diferentes regiones dentro de la India atribuyen casos bacterianos de diarrea infantil a diferentes patógenos con diferente grado de prevalencia. Por ejemplo, un estudio en Orissa, India, encontró entre 866 muestras de cultivo positivas en *E. coli* sp. (75,5 %), *E. coli* patógena (13,2 %), *Aeromonas* spp. (2 %), *Shigella* spp. (4,5 %), *Vibrio cholerae* O1 (17,3 %), *V. cholerae* O139 (1 %) y *Salmonella* spp. (0,7 %). find-health-articles.com/rec_pub_18806340-incidence.

Debido a la amplia variedad de etiología, se desea un procedimiento eficaz, de amplio espectro, económico y seguro para tratar la diarrea indiferenciada. La mayoría de los casos de diarrea infantil parecen estar causados por una infección bacteriana y viral, pero es deseable una alternativa a los antibióticos y los agentes antivirales.

A. Composiciones

Un aspecto de la presente divulgación implica una composición útil en el tratamiento, prevención o manejo de la flora microbiana. Las composiciones son útiles para tratar infecciones patógenas, en particular del tracto gastrointestinal.

La presente divulgación da a conocer una composición que comprende:

- 5 a) una cantidad eficaz no neonatal de, como mínimo, una molécula de unión específica, o un fragmento de la misma obtenida de un animal y que se une específicamente a un antígeno, en la que la molécula de unión específica se selecciona entre una inmunoglobulina, un anticuerpo, un péptido, un receptor variable de linfocitos, un factor de transferencia y una mezcla de los mismos; y,
- 10 b) una matriz portadora que comprende, como mínimo, dos componentes obtenidos de un animal no humano seleccionado entre el grupo que comprende enzimas, lactoferrina, transferrina, inmunoglobulinas no específicas, citocinas, glóbulos blancos, componentes del complemento, interferones y fibronectina, en la que, como mínimo, una molécula de unión específica y los, como mínimo, dos componentes de la matriz portadora se obtienen de diferentes animales.

15 **Moléculas de unión específica**

Las composiciones y los procedimientos de la presente divulgación dan a conocer moléculas de unión específica o fragmentos de las mismas obtenidos de un animal y que se unen específicamente a un antígeno. Una molécula de unión específica incluye un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido, un receptor de linfocitos variable, un factor de transferencia y una mezcla de los mismos.

20 **Anticuerpos**

25 Los anticuerpos, las inmunoglobulinas y otros factores inmunes biológicos (denominados colectivamente como anticuerpos), tanto naturales como sus análogos sintéticos, son agentes terapéuticos conocidos en humanos y animales.

30 Los anticuerpos operan mediante la unión (a través de fuerzas no covalentes) entre el sitio de combinación de antígeno en el anticuerpo y una parte del antígeno llamado el determinante antigénico o epítipo. Los anticuerpos son capaces de altos grados de especificidad. Por ejemplo, el sector de los anticuerpos monoclonales se ha desarrollado en gran medida con el ímpetu de producir características de unión cada vez más específicas y precisas. Sin embargo, esta alta especificidad puede llevar a atributos de unión excesivamente limitados, en los que los agentes o antígenos que son funcionalmente idénticos no reaccionan de manera idéntica con el agente inmunorreactivo o inmunoterapéutico. Por otro lado, la reactividad cruzada, generalmente considerada como un error o fallo, es la reacción entre un antígeno y un anticuerpo que se ha generado contra un antígeno similar pero distinto. La reactividad cruzada controlada puede utilizarse constructivamente para ampliar el intervalo de unión del anticuerpo.

40 La presente divulgación da a conocer un procedimiento para crear una formulación basada en un anticuerpo dirigido incorporado o introducido dentro de una matriz portadora, en el que los anticuerpos utilizan una forma controlada de reactividad cruzada a múltiples agrupaciones de antígenos diana relacionados, y en el que la matriz portadora contiene soporte y cofactores que potencian el efecto de los anticuerpos. La utilidad de estas formulaciones de anticuerpo/matriz puede incluir proporcionar intervenciones terapéuticas de amplio espectro en condiciones en las que sea conocida o sospechada la clase de agente causal, pero no el agente causal preciso o específico o en circunstancias en las que estén activos múltiples agentes causales (mixtos). Se ha desarrollado un nuevo enfoque para la utilización de anticuerpos de esta manera, que aprovecha tanto la especificidad como los atributos de reactividad cruzada de los anticuerpos, y posteriormente utiliza los componentes dentro de la matriz portadora para generar una respuesta inmune multicomponente *in situ*. Los anticuerpos están diseñados para unirse a todos los diversos epítopos estrechamente relacionados que representan un grupo de antígenos relacionados estructuralmente. Estos antígenos pueden diferir notablemente en otros aspectos y pueden provenir de diversas fuentes, organismos o especies.

55 Para los fines de la presente divulgación, los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales derivados de cualquier animal, fragmentos, quiméricos, humanizados o cualquier otra forma, y los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo: por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM (mamíferos placentarios), IgY (pollo), u otros, puede ser un anticuerpo biespecífico o bifuncional, multiespecífico o multifuncional o un fragmento del mismo.

60 Un modo de la presente divulgación es su utilización en la producción de un amplio espectro terapéutico. Un procedimiento para producir este tipo de formulación reactiva implica la producción de anticuerpos policlonales recolectados de un animal inmunizado apropiadamente, y en el que dichos anticuerpos se incorporan en una matriz portadora. Los anticuerpos policlonales (o antisueros) son anticuerpos que se derivan de diferentes líneas de células B. Por lo general, se extraen en masa del suero, la leche, el calostro, los huevos o los líquidos biológicos de un animal inmunizado. Son una mezcla de moléculas de inmunoglobulina secretadas contra un antígeno específico, o un grupo de antígenos, que reconocen un intervalo de diferentes epítopos. Es posible tener múltiples anticuerpos para un único antígeno (que se une a diferentes epítopos) o que un solo anticuerpo se una a múltiples antígenos, debido a la reactividad cruzada. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener de animales, tales como vacas, ovejas, caballos, cabras, cerdos, conejos, pollos, patos, gansos o pavos que han sido vacunados o inoculados con

antígenos derivados de los componentes diana. Los anticuerpos se pueden recolectar de, por ejemplo, tejido, suero, leche o huevos producidos por el animal inoculado, o derivados del mismo. Esto contrasta con los anticuerpos monoclonales, que son idénticos y monoespecíficos; estando producidos por un tipo de célula inmune que son todas clones de una sola célula madre.

5 Los anticuerpos utilizados en la presente divulgación se pueden recolectar de suero, plasma, calostro, leche, huevos u otro líquido adecuado derivado biológicamente, o de medios de cultivo celular, sobrenadante, etc. Los anticuerpos utilizados en la presente divulgación se pueden tratar cualquier forma adecuada para prepararse para su formulación y utilización, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, las separaciones, la plasmáfesis, los procesos de secado, la liofilización, la pasteurización y los procedimientos de conservación. Los anticuerpos utilizados en la presente divulgación pueden tratarse, concentrarse, separarse o purificarse de varias maneras, dependiendo de su utilización final prevista.

15 Al alterar la mezcla de anticuerpos contra aquellos apropiados, la presente divulgación da a conocer composiciones y procedimientos apropiados para tratar o prevenir otras infecciones gastrointestinales, tales como el cólera, *C. difficile*, disentería, *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea) y *H. pylori* (úlceras pépticas).

20 Los anticuerpos se producen preferentemente en animales mediante, por ejemplo, múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y opcionalmente un adyuvante. En un aspecto, puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se utilizan péptidos sintéticos) con una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con la hemocianina de lapa californiana (KLH), la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina o el inhibidor de la tripsina de soja, utilizando un éster bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o RN=C=NR, en el que R y R son diferentes grupos alquilo. Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados, tal como se describe en el presente documento. Los anticuerpos pueden ser sintéticos o semisintéticos, por ejemplo, tal como se obtienen en una biblioteca de presentación sobre fagos, o se preparan como anticuerpos humanizados o quiméricos.

30 Las aves (tales como gallinas ponedoras) son altamente rentables como productoras de anticuerpos en comparación con los mamíferos utilizados tradicionalmente para dicha producción. Los anticuerpos aviares tienen ventajas bioquímicas sobre los anticuerpos de mamíferos. Las diferencias inmunológicas entre los mamíferos y las aves dan como resultado una mayor sensibilidad y una disminución de los antecedentes en los ensayos inmunológicos; así como alta especificidad y falta de efectos inmunitarios complementarios cuando se administran a individuos mamíferos. En contraste con los anticuerpos de mamíferos, los anticuerpos aviares no activan el sistema del complemento humano a través de la vía primaria o clásica ni reaccionarán con factores reumatoides, anticuerpos humanos anti-IgG de ratón, proteínas estafilocócicas A o G, o receptores de Fc bacterianos y humanos. Sin embargo, los anticuerpos aviares pueden activar la vía alternativa no inflamatoria. De este modo, los anticuerpos aviares ofrecen muchas ventajas sobre los anticuerpos de mamíferos.

40 Preferentemente, las moléculas específicas son anticuerpos policlonales preparados en huevos de gallinas inoculadas con uno o una mezcla de componentes patógenos. También se pueden utilizar diversas preparaciones de antígenos específicos para la inoculación. Después de la inoculación, la gallina produce huevos que contienen cantidades sustanciales de la inmunoglobulina IgY específica en la yema, así como pequeñas cantidades de inmunoglobulinas IgM e IgA en la albúmina. Por lo tanto, los huevos son una fuente excelente de grandes cantidades de anticuerpos altamente específicos y estables producidos económicamente. Los pollos se utilizan para producir anticuerpos aviares; sin embargo, se pueden utilizar alternativamente pavos, patos, gansos, avestruces, etc. En un aspecto, las gallinas se inoculan mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el antígeno se puede inyectar por vía intramuscular o subcutánea. El músculo preferente para la inyección en un ave es el músculo del pecho. Entre otros procedimientos de administración que pueden utilizarse se incluyen inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, intradérmica, supositorio rectal, aerosol u administración oral.

55 Preferentemente, el estado inmune específico se induce y mantiene en el animal diana mediante inmunización y repetidas administraciones de refuerzo de una dosificación apropiada en intervalos de tiempo fijos. Los intervalos de tiempo son, preferentemente, intervalos de 1 a 8 semanas durante un período de 1 a 12 meses. La dosis se selecciona entre, aproximadamente, 0,01-5 miligramos del antígeno. En un aspecto, la dosis es de 0,01 mg a 1,0 mg de antígeno por inoculación, preferentemente, 100 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg o 750 mg de antígeno por inoculación de una gallina. El número total de vacunaciones se puede seleccionar entre 1, 2, 3, 4, 5 o 6 en un período de 12 meses. Normalmente, una primera inoculación se realiza el día 1, con vacunaciones de refuerzo el día 10 y el día 20. La gallina puede volver a vacunarse según sea necesario mediante el control de la concentración específica de anticuerpos, o el título, en los huevos, por ejemplo, mediante ELISA. Un volumen de dosificación subcutánea típico para una gallina se selecciona entre, aproximadamente, 0,2 a 1,0 ml, 0,3 a 0,7 ml o 0,5 ml. Sin embargo, es esencial que las administraciones de refuerzo no conduzcan a la tolerancia inmune. Estos procesos son bien conocidos en la técnica.

Es posible utilizar otros procedimientos de mantenimiento de la inoculación o una combinación de procedimientos, tales como, por ejemplo, la inyección intramuscular para la inmunización primaria y la inyección intravenosa para las inyecciones de refuerzo. Entre los procedimientos adicionales se incluyen la administración simultánea de inmunógeno microencapsulado y líquido, o la inyección intramuscular para la inmunización primaria, y dosis de refuerzo por administración oral o administración parenteral por medios de microencapsulación. Los expertos en la técnica conocen varias combinaciones de inmunización primaria y de refuerzo.

Los adyuvantes, también conocidos como vehículos farmacéuticos, o equivalentes funcionales de los mismos pueden incluirse en la solución de inmunización/composición de vacuna para potenciar la respuesta inmune específica del animal. Se ha descrito y utilizado un gran número de adyuvantes para la generación de anticuerpos en animales de laboratorio, tales como ratones, ratas, conejos y pollos. En este contexto, la tolerancia a los efectos secundarios es bastante elevada, ya que el objetivo principal es obtener una respuesta de anticuerpos fuerte.

Los adyuvantes que pertenecen a la presente divulgación se pueden agrupar según su origen, ya sea mineral, bacteriano, vegetal, sintético o producto de huésped. El primer grupo en esta clasificación son los adyuvantes minerales, tales como los compuestos de aluminio. Los antígenos precipitados con sales de aluminio o antígenos mezclados con compuestos de aluminio o adsorbidos en los mismos realizados se han utilizado ampliamente para aumentar las respuestas inmunes en animales y seres humanos. El adyuvante en la composición de inmunización puede ser de origen bacteriano. Los adyuvantes con origen bacteriano se pueden purificar y sintetizar (por ejemplo, dipéptidos muramilo, lípido A) y se han clonado los mediadores de huésped (interleucina 1 y 2). La purificación química conocida de diversos adyuvantes de componentes activos de origen bacteriano incluye: Bordetella pertussis, Mycobacterium tuberculosis, lipopolisacárido, adyuvante completo de Freund (FCA) y adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) y adyuvante de Merck 65 (Merck y Company, Inc., Rahway, Nueva Jersey). El adyuvante completo de Freund o el adyuvante incompleto de Freund podrían utilizarse en las composiciones de inmunización de la presente divulgación. Adyuvantes adecuados adicionales son, por ejemplo, adyuvante clásico Titermax (SIGMA-ALDRICH), ISCOMS, Quil A, ALUN, véanse las Patentes US. N.ºs 58767 y 5.554.372, derivados de lípido A, derivados de coleratoxina, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices de péptidos sintéticos, GMDP y otros, así como combinados con inmunoestimulantes (la Patente US N.º 5.876.735). En el contexto de la presente invención, B. pertussis es de interés como adyuvante debido a su capacidad para modular la inmunidad mediada por células a través de la acción sobre poblaciones de linfocitos T. El adyuvante completo de Freund es el estándar en la mayoría de los estudios experimentales. Se puede añadir aceite mineral a la composición de vacunación para proteger el antígeno del catabolismo rápido.

Se pueden utilizar muchos otros tipos de materiales como adyuvantes en composiciones inmunogénicas o de inmunización, según la presente divulgación. Entre estos se incluyen productos vegetales, tales como la saponina, productos animales, tales como la quitina y numerosos productos químicos sintéticos.

Los pollos inmunizados por vía intramuscular pueden producir altos niveles de anticuerpos específicos en sus huevos el día 28 después de la inmunización y continuar produciendo anticuerpos específicos durante más de 200 días, haciendo que las preparaciones de anticuerpos estén disponibles en un corto período de tiempo, por ejemplo, menos de 4-5 semanas. Los huevos contienen concentraciones de anticuerpos IgY de hasta, aproximadamente, 50 a, aproximadamente, 100 mg por huevo. Se pueden obtener más de 100 mg de IgY purificada a partir de un solo huevo. El porcentaje de anticuerpos específicos de antígeno en una yema de huevo puede ser de, aproximadamente, el 2 % al 10 %. (DaSilva et al., IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. Veterinary Immunol. Immunopath., 135 (2010): 173-180).

Un pollo de una variedad ponedora de huevos puede producir, aproximadamente, 20 huevos por mes. Los huevos pesan de, aproximadamente, 33 a, aproximadamente, 77 gramos, siendo la cáscara, aproximadamente, el 10,5 % del huevo entero. La yema es, aproximadamente, el 31 % del peso del huevo entero. Después del secado, se pueden producir, aproximadamente, 1 kg de huevo entero en polvo a partir de 72 huevos. Por lo tanto, en este cálculo, un huevo puede generar, aproximadamente, 13,9 g de huevo entero seco. En otro aspecto, un huevo inmune puede generar de 10 g a, aproximadamente, 15 g de huevo entero seco. En otro aspecto, los huevos inmunes de la presente divulgación tienen de 40 a 55 ml por huevo con, aproximadamente, 1-2 mg/ml de IgY total por huevo. En otro aspecto, los huevos inmunes de la presente divulgación contienen, aproximadamente, de 0,01 mg/ml a 0,05 mg/ml de IgY específica por huevo. Por lo tanto, en un aspecto, después del procesamiento, un huevo inmune entero seco contiene, aproximadamente, de 80 a 110 mg de IgY total y, aproximadamente, de 6 a 10 mg de IgY específica contra una mezcla de antígenos total, por ejemplo, de un pollo inmunizado con, por ejemplo, una preparación mezcla de antígenos.

Se puede determinar si la vacuna ha provocado una respuesta inmune en el animal productor de huevos a través de una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica de la inmunología. Entre los ejemplos de estos se incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), pruebas para detectar la presencia de anticuerpos contra los antígenos estimulantes y pruebas diseñadas para evaluar la capacidad de las células inmunitarias del huésped para responder al antígeno. La dosis mínima de inmunógeno necesaria para inducir una respuesta inmune depende del procedimiento de vacunación utilizado, que incluye el tipo de adyuvantes y la formulación del o de los inmunógenos utilizados, así como el tipo de animal productor de huevo utilizado como huésped.

- Se pueden utilizar las gallinas adecuadas para la producción comercial de huevos en la producción de anticuerpos policlonales. Se puede utilizar cualquier raza de gallina apropiada para la producción de huevos. Por ejemplo, se pueden seleccionar Rhode Island Reds, White Leghorns, Brown Leghorns, Lohmann Brown, cruces híbridos ligados al sexo u otras razas adecuadas para huevos de gran tamaño, gran volumen de producción de huevos y facilidad de manejo. En un aspecto, los pollos se inoculan como los pollos tal como para dolencias estándar (por ejemplo, Salmonella, gripe aviar, virus de Newcastle, etc.). En un aspecto, se pueden inocular los pollos de cualquier edad. Las gallinas que están a punto de alcanzar la edad de puesta, aproximadamente, 15-19 semanas para los pollos, o cualquier tiempo preseleccionado antes o después, se inoculan en un horario predeterminado con la cantidad y el tiempo del producto final para dar como resultado un flujo continuo de producción constante. Normalmente, después de un período adecuado de aislamiento y aclimatación de, aproximadamente, 2 a 4 semanas, cada grupo entrará en un programa de inoculación utilizando diversos antígenos o composiciones de inmunización que comprenden antígenos específicos para los cuales se desea un anticuerpo.
- Los huevos pueden recogerse de pollos inoculados y procesarse como huevos enteros. Los huevos se almacenan en condiciones de refrigeración hasta que se recolectan los suficientes para preparar un lote. Se rompen los lotes de huevos de los grupos predeterminados de pollos, se separan los contenidos de las cáscaras y se mezclan y preferentemente se pasteurizan para eliminar la contaminación potencial de microorganismos patógenos del pollo.
- En un aspecto, los productos de huevo inmunes se pasteurizan. Los productos de huevo se procesan en instalaciones sanitarias. Las cáscaras de los huevos se transforman en productos de huevos inmunes mediante un equipo automatizado que elimina la cáscara de huevo, lava y desinfecta las cáscaras, rompe los huevos. Opcionalmente, las claras se separan de las yemas. El producto líquido de huevo se filtra opcionalmente, se mezcla opcionalmente con otros ingredientes y posteriormente se enfría antes de un procesamiento adicional. A continuación, el producto líquido de huevo recibe un tratamiento letal, tal como la pasteurización o se calienta en forma seca. En los Estados Unidos, la Ley de Inspección de Productos de Huevo de 1970 (EPIA, "Egg Products Inspection Act") requiere que todos los productos de huevo distribuidos para el consumo sean pasteurizados.
- Después de la pasteurización, el contenido total de huevo se seca utilizando procedimientos comerciales estándar, tales como secado por pulverización utilizando aire ambiental o caliente, secado térmico, secado en frío o liofilización. En un aspecto, un procedimiento apropiado para secar el huevo líquido pasteurizado minimiza el daño a los anticuerpos y componentes moleculares en el huevo, dando como resultado un producto que tiene un alto valor nutritivo y es capaz de conferir protección pasiva.
- En un aspecto, el huevo seco se analiza para determinar el título general o el nivel de anticuerpos. Se utilizan procedimientos de examen estándar, tales como ELISA, FIA (inmunoensayo fluorescente), RIA (radioinmunoensayo) o similares. En otro aspecto, el lote se mezcla con lotes de grupos de pollos en otros niveles de producción promedio, lo que da como resultado un lote que contiene una cantidad estandarizada de anticuerpos. El huevo seco que contiene anticuerpos policlonales específicos puede almacenarse en un recipiente hermético a temperatura ambiente antes de la formulación en las composiciones de la presente divulgación. El material de huevo seco se puede utilizar como un huevo entero y puede no separarse. Todo el material de huevo seco podría contener, como mínimo, 5 mg por huevo de IgY específica.
- Se puede aislar la IgY. La primera etapa en el aislamiento de IgY es separar las proteínas solubles en agua de las lipoproteínas. Las proteínas solubles en agua constituyen el 42,4 % del total de proteínas en la yema de huevo (Osuga et al., "Egg Proteins: In Food Proteins, J. R. Whitaker y S. R. Tannenbaum eds., AVI Pub. Co., Westport, Connecticut (1977)).
- Se han utilizado muchos procedimientos para el aislamiento y la purificación de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo (Martin et al, Can J. Biochem Physiol 35:241 (1957); Martin et al, Can J. Biochem Physiol 36: 153 (1958); Jensenius et al., J. Immunol. Methods 46:63 (1981); Bade et al., J. Immunol. Methods 72: 421 (1984); Poison et al., Immunol. Invest 14: 323 (1985); Hassl et al, J. Immunol. Methods 110: 225 (1988)). Hatta et al (Agric. Biol. Chem. 54: 2531 (1990)) utilizaron gomas naturales de calidad alimentaria (por ejemplo, carragenano) para eliminar la lipoproteína de la yema como un precipitado y para recuperar la IgY en la fracción soluble en agua de la yema de huevo. Los procedimientos para recuperar los anticuerpos de la yema de huevo de gallina son bien conocidos en la técnica. Se pueden utilizar diversos procedimientos para la extracción de IgY de yema de huevo, y están disponibles en el mercado kits de extracción (van Regenmortel, M. H. V. (1993). Eggs as protein and antibody factories. En Proceedings of the European Symposium on the Quality of Poultry Meat, págs. 257-263. Tours, Francia: INRA).
- La molécula de unión estérica específica puede ser un anticuerpo monoclonal específico para un componente patógeno.
- Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature.256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (la Patente US 4.816.567). En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza tal como se ha descrito anteriormente para provocar linfocitos que producen o son capaces de

5 producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y posteriormente se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

10 El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson et al., *Anal. Biochem.* 107: 220 (1980).

15 Se separan adecuadamente los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

20 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que posteriormente se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica anticuerpos se incluyen Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plücker et al., *Immunol. Revs* 130: 151-188 (1992).

30 Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al. *Nature*. 348: 552-554 (1990). Clackson et al. *Nature*. 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (en el intervalo de nM) mediante la combinación aleatoria de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*. 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación in vivo como una estrategia para la construcción de bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

40 El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos de anticuerpos de fusión o quiméricos, por ejemplo, sustituyendo secuencias de dominio de cadena pesada y cadena ligera (C_H y C_L) humanas por las secuencias murinas homólogas (la Patente US N.º 4.816.567; y Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o fusionando la secuencia de codificación de inmunoglobulina con la totalidad o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias polipeptídicas que no son de inmunoglobulina pueden sustituir a los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

50 **ANTIGENOS PARA INMUNIZACIÓN PARA PREPARAR UNA PROTEÍNA DE UNIÓN ESPECÍFICA**

Los antígenos seleccionados para la inmunización pueden ser bacterianos, virales, protozoarios, fúngicos, parásitos, celulares o cualquier otra sustancia a la que responda el sistema inmunológico de un animal. En un aspecto, la inmunogenicidad de los antígenos se potencia mediante la utilización de un adyuvante.

55 En un aspecto, el animal se inocula con los componentes patógenos, antígenos o inmunógenos en una composición de vacunación, inoculante o vacuna. En un aspecto, los componentes patógenos o antígenos específicos se pueden obtener o derivar de fuentes comerciales, tales como la American Type Culture Collection (ATCC). En otro aspecto, los componentes patógenos se pueden aislar de una cepa de tipo natural. En otro aspecto, los componentes patógenos o cepas indeseables están presentes en una preparación mezcla de antígenos. En la composición de inmunización se puede utilizar cualquier antígeno o combinación de antígenos derivados de diversas cepas indeseables o componentes patógenos.

60 En un aspecto, el inoculante, antígeno o inmunógeno se selecciona para un componente o región común o conservada del grupo de antígenos diana, mientras se ignoran los componentes o regiones variables o que son diferentes de los miembros individuales del grupo de antígenos relacionados. El procedimiento implica la preparación de un inmunógeno apropiado con características que provocan la producción de anticuerpos que

reaccionan de forma cruzada con los casos deseados de ese epítipo, pero que no son reactivos frente a otros epítipos, y la inoculación o exposición de las células u organismos productores a ese inmunógeno para causar la producción de anticuerpos, con los anticuerpos resultantes incorporados dentro de la matriz portadora adecuada para la administración. Se pueden desarrollar formulaciones de este tipo que utilizan mezclas de anticuerpos producidos según este procedimiento para proporcionar una amplia cobertura de más de un grupo de antígenos diana. Por ejemplo, en el caso en el que dos grupos de antígenos no relacionados están asociados con una dolencia o afección, y es deseable crear una formulación única para tratar esta dolencia o afección, se puede preparar una mezcla de dos anticuerpos, inmunoglobulinas o factores inmunes biológicos utilizando este procedimiento que proporciona simultáneamente dos dominios de reactividad amplios. Un ejemplo es la producción de anticuerpos antitoxina que son específicamente reactivos a grupos de toxinas relacionadas estructuralmente.

Este enfoque se puede utilizar para producir un anticuerpo ampliamente reactivo al lipopolisacárido (LPS) (endotoxina) de cualquier bacteria Gram-negativa (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* y otras Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, y otras), o por ejemplo, un anticuerpo ampliamente reactivo contra las toxinas AB5 (entre las que se incluyen la enterotoxina *Campylobacter*, la toxina del cólera, las enterotoxinas lábiles al calor (LT y LT-II) (*E. coli*), la toxina pertussis, la toxina shiga (*Shigella*), la toxina similar a la shiga (o verotoxina)).

En un aspecto preferente, estos ejemplos de anticuerpos antitoxina tienen efecto sin tener en cuenta las especies que originan la toxina. En otro aspecto, los anticuerpos producidos son anticuerpos neutralizantes, capaces de neutralizar o inactivar la actividad biológica de las toxinas diana. Dicho anticuerpo neutralizador de amplio espectro podría utilizarse para intervenir en casos de patología (por ejemplo, ciertos tipos de diarrea) en los que la toxina que media los síntomas sea uno de los grupos objetivo (en estos ejemplos, AB5 o LPS), sin necesidad de saber qué organismo fuera el causativo. Además, si se preparara una mezcla que contuviera tanto el anticuerpo anti AB5 como el anticuerpo anti LPS en cantidades clínicamente eficaces, la formulación podría utilizarse para intervenir en caso de que la toxina activa fuera AB5 o LPS, o ambas.

Este procedimiento puede extenderse para incluir cualquier número de grupos de toxinas (en este ejemplo), e incluir anticuerpos neutralizantes de amplio espectro para mediadores de otras reacciones de tipo toxina (por ejemplo, fenómenos virales de tipo toxina), para crear una intervención ampliamente aplicable a diarrea (en este ejemplo) en el que los síntomas y la patología se pueden manejar sin el conocimiento de las causas infecciosas, o en el que existen múltiples causas infecciosas. En un aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición que comprende una combinación sinérgica de anticuerpos antitoxina combinados en una matriz portadora.

Los procedimientos y composiciones dados a conocer pueden utilizarse para una variedad de patógenos o agentes entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, toxina del cólera (*Vibrio cholerae*), *E. coli* (incluyendo (ETEC) enterotoxigénica), *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, parásitos (por ejemplo, *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidiosis*, *Cyclospora*) y virus diarreicos (por ejemplo, rotavirus).

Después de ingresar al tracto gastrointestinal, muchos patógenos, entre los que se incluyen bacterias, tales como la *E. coli*, se unen (se adhieren) al tejido epitelial, mucoso u otro tejido y se incorporan al tejido del tracto gastrointestinal, tal como la pared del intestino. Después de unirse al tejido en el tracto gastrointestinal, los patógenos se replican, causando un aumento en las concentraciones de toxinas, ya sea directamente por la producción o indirectamente por un aumento de la lisis de las células patógenas por la acción del sistema inmunológico. La inhibición de la capacidad de los patógenos para unirse al tejido del tracto gastrointestinal promueve una movilización más eficaz de los patógenos, la digestión y la excreción antes de que se formen colonias de tamaño suficiente para causar lesiones y otros síntomas. Al bloquear la clase de receptores y ligandos en el patógeno que se utilizarían para adherirse al tracto gastrointestinal, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, adhesinas, cadherinas, cilios, fimbrias y/o estructuras de adhesión viral, se puede prevenir la adhesión al tejido del tracto gastrointestinal o minimizar la misma, lo que finalmente da como resultado una patología sustancialmente disminuida de patógenos que utilizan este modo de acción.

Se puede seleccionar el agente patógeno entre uno o una combinación de patógenos humanos o veterinarios, entéricos o gastrointestinales, que causan gastroenteritis. En diversos aspectos, el agente patógeno se selecciona entre el grupo que comprende: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica serovar Typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli* [incluyendo *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* hemorrágica (EHEC), *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio* 0139, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromibria*, *Ferenci Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter* enterohepático (incluyendo *Helicobacter pylori*), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, rotavirus, coronavirus, norovirus, calicivirus, adenovirus entérico, citomegalovirus y astrovirus. En otro aspecto, la toxina relacionada con patógenos incluye una endotoxina o exotoxina. En otro aspecto, el elemento de adhesión relacionado con patógenos incluye adhesinas, cadherinas, cilios, fimbrias, una estructura de adhesión viral, o una combinación de los mismos.

En diversos aspectos específicos, los componentes patógenos, inmunógenos o antígenos pueden derivarse de, por ejemplo, Rotavirus, Coronavirus; *Clostridium Perfringens* Tipo C; *Escherichia coli* (celular); Las cepas

enterotoxigénicas y las enterotoxinas de *E. coli*; cualquier bacteria que tenga el antígeno del factor de adherencia a pilios K99, K88, 987P o F41; endotoxina (o LPS) causada por *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (bacterias gramnegativas, en general). En un aspecto particular, las gallinas son inoculadas con antígenos o toxinas derivadas de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho, o una serie de microorganismos patógenos.

5 En un aspecto, la respuesta inmune es más potente cuando aumenta la distancia entre la fuente de antígeno y el sistema inmunitario del animal vacunado.

10 Preferentemente, se inocula un primer grupo de pollos con una primera preparación mezcla de antígenos. En un aspecto, se inocula un segundo grupo de pollos con una segunda preparación antigénica mixta que contiene un conjunto diferente de antígenos que la primera. En otro aspecto, se inocula un tercer grupo de pollos con una tercera preparación antigénica mixta. En un aspecto adicional, se inocula un cuarto grupo de pollos con una cuarta preparación antigénica mixta. Se cree que es ventajoso inmunizar diferentes grupos con diferentes antígenos para evitar la sobrecarga de antígenos.

15 Los huevos de cada grupo se recogen, se titulan opcionalmente en función de la IgY específica y/o total, opcionalmente se aíslan y/o se purifican, y se procesan por separado para preparar un polvo seco. En otro aspecto, se mezclan los huevos secos en polvo del primer y segundo grupo; primero, segundo y tercero; o lotes primero, segundo, tercero y cuarto, o se empaquetan, con una matriz portadora para preparar una composición de la presente divulgación. En un aspecto, una primera preparación antigénica comprende rotavirus bovino (serotipos G6 y G10), coronavirus bovino, cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* que tienen el factor de adherencia de pilios K99 y *Clostridium perfringens* tipo C. La preparación mezcla de antígenos puede opcionalmente adyudarse para mejorar la respuesta inmune.

20 En otro aspecto, una segunda preparación antigénica comprende toxina beta producida por *Clostridium perfringens* tipo C y cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* que producen toxina termolábil o que tienen los factores de adherencia K99, K88, 987P o F41.

25 En un aspecto, una tercera preparación antigénica comprende *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. JVAC reduce la incidencia y la gravedad de la endotoxemia causada por *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Comúnmente asociadas con sus endotoxinas, están la mastitis coliforme y otras dolencias causadas por bacterias gramnegativas asociadas con la endotoxemia.

30 En otro aspecto, los antígenos se preparan por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, células de una fuente de tipo natural, tales como un animal que sufre de, por ejemplo, diarrea por *E. coli*. Las células aisladas pueden cultivarse, por ejemplo, en caldo de soja con tripticasa (TSB) a 37 °C durante la noche y concentrarse por centrifugación. El sedimento resultante se puede resuspender con formaldehído al 0,4 % en tampón PBS e incubarse a 37 °C para su inactivación. El formaldehído se puede eliminar por centrifugación. El sedimento puede resuspenderse en PBS y utilizarse como antígeno. En un aspecto, los antígenos se emulsionan con un volumen igual de adyuvante antes de la inoculación.

35 Se pueden seleccionar los antígenos de aquellos organismos patógenos que causan conjuntivitis. Se describen patógenos causales conocidos en la Patente 2008/0031903, de Gambotto et al.

40 La queratoconjuntivitis epidémica (EKC, "Epidemic Keratoconjunctivitis") es una dolencia infecciosa debilitante del ojo que se ve en todo el mundo. La dolencia está causada principalmente por adenovirus, especialmente los serotipos 8, 19 y 37. Los serotipos 3, 4 y 11 también se han visto implicados en algunas epidemias de EKC. La dolencia afecta a todos los grupos de edad, es altamente contagiosa y se propaga rápidamente en escuelas, piscinas, unidades pediátricas y campamentos. Actualmente, el tratamiento es sintomático ya que no hay un tratamiento efectivo. El desarrollo de un agente tópico antiviral efectivo es deseable para tratar la dolencia y prevenir la epidemia.

45 La conjuntivitis también puede estar causada por diversos agentes bacterianos, virales, fúngicos y protozoarios, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, Adenovirus, Herpes Simplex, virus del herpes zóster, enterovirus, especies de *Fusarium*, especies de *Cándida* y especies de *Acanthamoeba*. Ciertas infecciones virales, tales como las infecciones por adenovirus, pueden tratarse con medicamentos antivirales, tales como el cidofovir. Por lo general, los productos farmacológicos tienen efectos secundarios, tales como los efectos secundarios oculares y renales asociados con el cidofovir. Otros problemas logísticos surgen con los productos farmacéuticos, entre los que se incluyen la estabilidad, el coste de producción, etc. Como tal, es deseable un producto farmacéutico económico, fácil de conseguir, bien aceptado y estable para el tratamiento de infecciones oculares.

50 En un aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición para el tratamiento de la conjuntivitis, u ojo rosado, que comprende anticuerpos policlonales contra estos patógenos combinados en una matriz portadora tal como se describe a continuación. Los anticuerpos se producen tal como se describe en el presente documento.

55 Se pueden seleccionar los antígenos entre aquellos organismos patógenos que causan vaginitis. La infección puede

ser bacteriana, micótica (levadura) o parasitaria. La vaginitis bacteriana puede estar causada, por ejemplo, por *Gardnerella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydiae* trachomatis, *Mycoplasma* spp., *Campylobacter jejuni*. La vaginitis parasitaria puede estar causada por, por ejemplo, *Trichomonas vaginalis*. La vaginitis viral puede estar causada, por ejemplo, por el virus del herpes tipo 1 o tipo 2.

La vaginitis por *Cándida* está causada por hongos de tipo levadura *Cándida*. Se describen más de 170 especies de hongos de tipo levadura. *C. albicans* es el agente causal más frecuente de una vaginitis por *Cándida* en el 85-90 % de las mujeres. *C. glabrata* (5-10 %), *C. tropicalis* (3-5 %), *C. parapsilosis* (3-5 %) y *C. krusei* (1-3 %) también son clínicamente significativas entre otras especies de *Cándida*. Cualquiera de estos patógenos puede seleccionarse como la fuente antigénica para la producción de anticuerpos policlonales, tal como se describe en el presente documento.

La vulvovaginitis por *Cándida* está causada frecuentemente por una serie de factores predisponentes, tales como la utilización prolongada e incontrolada de antibióticos, corticosteroides, citostáticos, anticonceptivos orales, radioterapia, dolencia infecciosa grave, trastorno endocrino, estado de inmunodeficiencia, etc. La prescripción de antibióticos de amplio espectro suprime no sólo las bacterias patógenas, sino también las mucosas vaginales saprófitas: lactobacilos y bifidobacterias. Como resultado, el pH vaginal aumenta (hacia un intervalo alcalino) y se producen alteraciones en los procesos de autolimpieza. Además, la *Cándida* puede utilizar algunos antibióticos como sustratos nutritivos. De este modo, surgen en los órganos genitales femeninos condiciones favorables para el crecimiento excesivo activo de *Cándida*. En un aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición para el tratamiento de vaginitis que comprende anticuerpos policlonales para uno o más de los patógenos descritos combinados en una matriz portadora, tal como se describe a continuación.

En un aspecto específico, la composición comprende una mezcla de anticuerpos policlonales específicos en una matriz portadora que proporciona un procedimiento de amplio espectro para el tratamiento de vaginitis bacteriana, viral, fúngica o parasitaria. En otro aspecto, las composiciones de la presente divulgación se pueden utilizar para tratar vaginitis no diferenciada en un individuo que lo necesite.

Otras moléculas de unión específica

Las composiciones y los procedimientos de la presente divulgación incluyen otras moléculas de unión específica que incluyen factores de transferencia, receptores de linfocitos variables y receptores celulares. Un factor de transferencia es una molécula inmune de, aproximadamente, 5000 Daltons, compuesta de aminoácidos, que causa inmunidad mediada por células específicas de antígeno, principalmente hipersensibilidad retardada y producción de linfocinas, así como la unión a los propios antígenos. (Kirkpatrick 1993, Structural nature and functions of transfer factors. Ann. NY Acad. Sci. 685: 362-368.) Los receptores de linfocitos variables son moléculas derivadas de linfocitos descubiertas en vertebrados sin mandíbula, tales como la lamprea y el mixino. Estos animales poseen una gran variedad de receptores de linfocitos variables que se producen a partir de sólo un pequeño número de genes y que se unen a antígenos patógenos de manera similar a los anticuerpos, y con el mismo grado de especificidad. (Alder et al., 2005, Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. Science, 310 (5756): 1970-1973).

MATRIZ PORTADORA

La presente divulgación da a conocer composiciones para el tratamiento o la profilaxis de la infección patógena en un individuo. Las composiciones comprenden moléculas de unión específicas, tales como anticuerpos policlonales, combinados con una matriz portadora. La matriz portadora puede servir a un doble propósito. En primer lugar, para proteger los anticuerpos en su entorno funcional previsto, por ejemplo, durante la administración oral, y dentro del tracto gastrointestinal del individuo no neonatal; y además para proporcionar componentes, por ejemplo, componentes del sistema inmune innato, para reaccionar de forma sinérgica con los anticuerpos en el tratamiento de una infección.

La expresión "matriz portadora", o matriz protectora/reactiva, se refiere a cualquier sustrato, compuesto, formulación o aditivo complementario (ya sea natural o sintético) que contenga elementos, cofactores u otros componentes en proporciones y concentraciones apropiadas, para suministrar los elementos necesarios para propagar, promover, sostener o mejorar una respuesta, cascada o reacción de tipo inmune in situ. Estos elementos pueden promover de diversas maneras las reacciones de escisión y maduración, la formación de conjuntos y complejos, las funciones de agotamiento y adsorción, suministrar elementos esenciales, productos biológicos o compuestos, y proporcionar funciones protectoras para los elementos o componentes activos. Una matriz portadora puede contener, o no, anticuerpos endógenos (factores inmunes), que pueden ser específicos, o no, frente a los antígenos diana.

En la matriz portadora se puede seleccionar entre suero, plasma, calostro, leche, saliva, fluido linfático, mucoso o fluido lagrimal derivado de un mamífero no humano, o derivarse de los mismos.

Un ejemplo de una matriz portadora natural es el calostro. El calostro ha evolucionado de forma natural en los mamíferos específicamente para suministrar sus componentes a los recién nacidos, hacia el tracto gastrointestinal y

a través del mismo, en una forma muy concentrada de bajo volumen. El calostro, o "primera leche", está producido por los mamíferos inmediatamente después del parto. Los anticuerpos y cofactores se transmiten al neonato desde la madre y brindan la primera protección contra los patógenos. Los factores de crecimiento también estimulan el desarrollo y la reparación del intestino.

5 El calostro contiene una serie de factores inmunes complementarios. Entre estos se incluyen interferones, inmunoglobulinas (incluyendo IgG e IgA secretora), leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. El calostro también contiene un polipéptido rico en prolina, o PRP, un activador de células T. Se sabe que el calostro tiene un alto contenido de inmunoglobulina en comparación con la leche. Se sabe que el calostro, en mamíferos,
10 contiene anticuerpos tales como IgA, IgG e IgM. La IgA se absorbe a través del epitelio intestinal, viaja a través de la sangre y se secreta en otras superficies de la mucosa Tipo 1. Se observa que el calostro bovino contiene del 6 % al 20 % de inmunoglobulina; principalmente IgG₁ y IgG₂. En un aspecto, se utiliza calostro bovino completo como matriz portadora.

15 El calostro también ayuda a regular el ambiente intestinal, haciéndolo hostil a patógenos extraños. El calostro contiene lactoferrina, una proteína de unión al hierro que evita que las bacterias y los virus obtengan el hierro necesario para la replicación. El calostro también fertiliza selectivamente ciertas especies probióticas que a su vez ayudan a prevenir la infección. Es la única fuente natural de dos factores de crecimiento principales, los Factores de crecimiento transformante (TGF) alfa y beta, así como una fuente de Factores de crecimiento de insulina 1 y 2. Estos
20 factores promueven la reparación y el desarrollo del tejido. El calostro también es una fuente del factor de crecimiento de hepatocitos, que estimula el crecimiento y la expansión de las células de la pared intestinal. El calostro está diseñado naturalmente para servir como una matriz portadora dentro de un entorno gastrointestinal. Las versiones sintéticas de una matriz portadora también se incluyen en la presente divulgación. Las matrices portadoras que se componen de componentes naturales y sintéticos también se incluyen en la presente divulgación.

25 El calostro es muy rico en proteínas, vitamina A y cloruro de sodio, pero contiene cantidades más bajas de carbohidratos, lípidos y potasio que la leche normal. Los componentes bioactivos más pertinentes en el calostro son los factores de crecimiento y los factores antimicrobianos. Los anticuerpos en el calostro proporcionan inmunidad pasiva, mientras que los factores de crecimiento estimulan el desarrollo del intestino. Se transmiten al neonato y proporcionan la primera protección contra patógenos. La inmunidad pasiva de la madre se transfiere al recién nacido.

30 Los recién nacidos tienen sistemas digestivos muy pequeños, y el calostro suministra sus nutrientes en una forma muy concentrada de bajo volumen. El tracto gastrointestinal del neonato es particularmente receptivo a la transferencia pasiva de la inmunidad del calostro. Al nacer, los intervalos de pH gástrico varían de 6-8 debido al líquido amniótico residual en el estómago. El pH gástrico posteriormente cae a un pH de 1,5 a 3 en 24 a 48 horas. De este modo, las condiciones GI del recién nacido son propicias para la inmunización pasiva. Además, el tiempo de vaciado gástrico en neonatos y bebés prematuros se prolonga, y alcanzándose los valores de adultos a los 6-8 meses de edad. Los anticuerpos y cofactores en el calostro pueden, en ciertas circunstancias (por ejemplo, al
40 amamantar) proporcionar una inmunidad pasiva al receptor; esto es particularmente cierto para el neonato. El tracto gastrointestinal de los bebés, niños, adolescentes y adultos sanos no neonatales es un entorno más hostil con respecto a la administración oral de inmunoglobulinas.

45 Entre otros componentes inmunes del calostro se incluyen los componentes principales del sistema inmune innato, tales como la lactoferrina, la transferrina, la lisozima, la lactoperoxidasa, el complemento y los polipéptidos ricos en prolina (PRP). También se encuentran varias citocinas (péptidos mensajeros pequeños que controlan el funcionamiento del sistema inmunológico) en el calostro, entre las que se incluyen las interleucinas, el factor de necrosis tumoral, las quimiocinas y otros. El calostro también contiene una serie de factores de crecimiento, tales como los factores de crecimiento tipo insulina I y II, los factores de crecimiento transformante alfa, beta 1 y beta 2,
50 factores de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento estimulante de macrófagos de granulocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular y factor estimulante de colonias-1.

55 En un aspecto, la matriz portadora está compuesta por dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o seis o más, o siete o más componentes no inmunoglobulínicos del calostro. En otro aspecto, la matriz portadora comprende calostro que se ha procesado para eliminar la mayoría de las inmunoglobulinas. Una matriz portadora puede comprender, como mínimo, dos componentes obtenidos de un animal no humano seleccionado entre el grupo que comprende enzimas, lactoferrina, transferrina, inmunoglobulinas no específicas, componentes del sistema del complemento, citocinas, glóbulos blancos, componentes del complemento, interferones y fibronectina, en la que la,
60 como mínimo, una molécula de unión específica y los, como mínimo, dos componentes de la matriz portadora se obtienen de diferentes animales.

65 En otro aspecto, la matriz comprende dos o más agentes seleccionados entre lisozima, fosfolipasa, defensinas, opsoninas, polipéptidos ricos en prolina (PRP), beta-lisina, lactoferrina, transferrina, citocinas, interleucinas, quimiocinas, interferones, TNF-alfa, fibronectina, polipéptidos ricos en prolina, factor de crecimiento de insulina tipo 1, factor de crecimiento de insulina tipo 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento

- epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos plaquetario, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento nervioso, leptina, leucocitos, glóbulos blancos, fagocitos, macrófagos, monocitos, neutrófilos, células polimorfonucleares y células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células asesinas naturales (NK, "Natural Killers"), células asesinas activadas por linfocinas (LAK, "Lymphokine Activated Killer"), proteínas catiónicas, entre las que se incluyen defensinas, enzimas proteolíticas entre las que se incluyen componentes de elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, NADPH oxidasa, o una combinación de los mismos. En otro aspecto, la matriz incluye una mezcla de agentes del sistema inmune innato. En un aspecto preferente, la matriz portadora está compuesta de calostro bovino no hiperinmune.
- 5 El calostro bovino está producido por las vacas para sus terneros recién nacidos. En muchos rebaños de vacas lecheras no se les permite amamantar a los terneros; más bien, se alimentan de calostro y posteriormente de leche desde una botella y posteriormente de un cubo. El calostro se recolecta y se procesa para utilizaciones comerciales. Se han descrito diversas composiciones que incluyen el calostro y los procesos para preparar el calostro en las Patentes estadounidenses N.^{os}. 5.846.569, 6.610.058, 6.775.511 y 6.621.277. El calostro bovino seco está disponible en el mercado. En un aspecto específico, la matriz portadora es calostro bovino seco comercial.
- 10 El calostro bovino está producido por las vacas para sus terneros recién nacidos. En muchos rebaños de vacas lecheras no se les permite amamantar a los terneros; más bien, se alimentan de calostro y posteriormente de leche desde una botella y posteriormente de un cubo. El calostro se recolecta y se procesa para utilizaciones comerciales. Se han descrito diversas composiciones que incluyen el calostro y los procesos para preparar el calostro en las Patentes estadounidenses N.^{os}. 5.846.569, 6.610.058, 6.775.511 y 6.621.277. El calostro bovino seco está disponible en el mercado. En un aspecto específico, la matriz portadora es calostro bovino seco comercial.
- 15 Los ganaderos/criadores de ganado comúnmente extraen calostro de sus animales. El calostro producido en sus propias instalaciones se considera superior al calostro de otras fuentes, dado que está producido por animales que ya están expuestos a los patógenos que aparecen en las instalaciones (y por lo tanto producen anticuerpos frente a los mismos). En general, el calostro de animales expuestos a patógenos relevantes tendrá características inmunológicas superiores.
- 20 El calostro bovino y sus componentes son seguros para el consumo humano, excepto en el contexto de intolerancia o alergia a la lactosa u otros componentes. El calostro bovino de vacas alimentadas con pasto contiene inmunoglobulinas específicas para muchos patógenos humanos, entre los que se incluyen *Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y rotavirus, dependiendo de su exposición natural a estos patógenos. Antes del desarrollo de los antibióticos, el calostro era la principal fuente de inmunoglobulinas utilizadas para combatir las infecciones.
- 25 El calostro bovino y sus componentes son seguros para el consumo humano, excepto en el contexto de intolerancia o alergia a la lactosa u otros componentes. El calostro bovino de vacas alimentadas con pasto contiene inmunoglobulinas específicas para muchos patógenos humanos, entre los que se incluyen *Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y rotavirus, dependiendo de su exposición natural a estos patógenos. Antes del desarrollo de los antibióticos, el calostro era la principal fuente de inmunoglobulinas utilizadas para combatir las infecciones.
- 30 El calostro hiperinmune representa un intento de aumentar la eficacia del calostro bovino natural mediante la inmunización de las vacas con un patógeno específico. Este enfoque es prometedor, dado que se producen anticuerpos contra los patógenos específicos o antígenos utilizados en el desafío original. Sin embargo, la respuesta variable a los antígenos, la variabilidad biológica y el bajo rendimiento de producción del calostro han limitado su utilidad clínica y comercial.
- 35 En un aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición que comprende calostro, que no es calostro hiperinmune o que no contiene una cantidad medible o significativa de anticuerpos específicos para los componentes patógenos o antígenos diana. En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición en la que la matriz portadora contiene diversos componentes del sistema inmune innato sin una cantidad significativa de anticuerpos específicos o no específicos.
- 40 El calostro se puede procesar para eliminar la mayor parte de las inmunoglobulinas, por ejemplo, absorbiendo los anticuerpos en una resina de afinidad (por ejemplo, Proteína G o Proteína A Sefarosa; o Proteína A o Proteína G Agarosa) en un formato de lote o columna y reteniendo el fluido para su posterior procesamiento. Las inmunoglobulinas también se pueden eliminar mediante cromatografía de filtración en gel en la cromatografía de intercambio iónico Sephadex G-200 o DEAE Sephadex A-25. (Lloyd y Soulsby, Immunology, The role of IgA immunoglobulin in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. 34, 939-945) Estos procesos pueden ejecutarse en una columna o en un formato de lote por diversos procedimientos y técnicas conocidas en el sector.
- 45 La matriz portadora puede incluir calostro. En un aspecto, el calostro comercial se utiliza como la matriz de soporte/reactiva. En un aspecto preferente, el calostro bovino comercial es un polvo de calostro entero aglomerado y de dispersión instantánea, pasteurizado, de grasa completa, producido sólo a partir del calostro de primer ordeño. En otro aspecto, el calostro se procesa a bajas presiones y bajas temperaturas y se seca por atomización utilizando vapor indirecto para mantener la bioactividad máxima. En otro aspecto el calostro comercial es de fuentes libres de antibióticos. En otro aspecto, el calostro se somete a un análisis microbiológico y se descubre que es negativo, o está por debajo de niveles aceptables, con respecto a una variedad de patógenos. En diversos otros aspectos, el calostro se analiza para detectar otros contaminantes, tales como nitratos, aflatoxinas, nitrofuranos, dioxinas, melamina y metales pesados y se encuentra en niveles negativos o por debajo de los especificados.
- 50 La matriz portadora puede incluir calostro. En un aspecto, el calostro comercial se utiliza como la matriz de soporte/reactiva. En un aspecto preferente, el calostro bovino comercial es un polvo de calostro entero aglomerado y de dispersión instantánea, pasteurizado, de grasa completa, producido sólo a partir del calostro de primer ordeño. En otro aspecto, el calostro se procesa a bajas presiones y bajas temperaturas y se seca por atomización utilizando vapor indirecto para mantener la bioactividad máxima. En otro aspecto el calostro comercial es de fuentes libres de antibióticos. En otro aspecto, el calostro se somete a un análisis microbiológico y se descubre que es negativo, o está por debajo de niveles aceptables, con respecto a una variedad de patógenos. En diversos otros aspectos, el calostro se analiza para detectar otros contaminantes, tales como nitratos, aflatoxinas, nitrofuranos, dioxinas, melamina y metales pesados y se encuentra en niveles negativos o por debajo de los especificados.
- 55 La composición puede estar compuesta de calostro de varias fuentes hiperinmunizadas, cada una dirigida a un grupo o clase diferente de antígeno, en las que los calostros se mezclan para proporcionar una formulación de anticuerpos de amplio espectro.
- 60 La matriz portadora puede comprender una secreción de mucosa reconstituida o artificial, tal como líquido lagrimal, mucosa nasal o bronquial, mucosa cervical, plasma seminal, sudor, plasma sanguíneo o saliva. Se sabe que los
- 65 La matriz portadora puede comprender una secreción de mucosa reconstituida o artificial, tal como líquido lagrimal, mucosa nasal o bronquial, mucosa cervical, plasma seminal, sudor, plasma sanguíneo o saliva. Se sabe que los

fluidos corporales contienen diversos componentes en cantidades variables. (Schenkels et al., Biochemical composition of human saliva in relation to other fluids, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1995, 6 (2): 161-175). La saliva contiene mucinas, PRP ácidos, alfa-amilasa, PRP básicos, PRG básico, IgA secretora, cistatinas, estaterina, IgG, glicoproteína extraparotídica (EP-GP), VEGh (una lipocalina), histatinas, lisozima, kalicreína, lactoferrina, lactoperoxidasa, haptocorrina, beta-microseminoproteína, IgM, albúmina y Zn-alfa2-glicoproteína. En un aspecto, la matriz portadora comprende dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, o siete o más de los componentes de los fluidos corporales.

El fluido lagrimal, tiene muchos de los mismos componentes que la saliva y tiene una concentración particularmente alta de IgA secretora, VEGh, lisozima y lactoferrina. En un aspecto, los fluidos lagrimales artificiales que contienen sales, tales como el cloruro de sodio y similares como ingrediente principal, o gotas para los ojos que contienen hidroxietilcelulosa, sulfato de condroitina o ácido hialurónico o goma xantana (la Patente US 7.875.271) tal como se conocen en la técnica, están fortificados con dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más componentes de los fluidos corporales descritos y utilizados como matriz portadora para anticuerpos policlonales purificados, tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, una composición podría utilizarse para tratar infecciones microbianas del ojo, tales como el ojo rosado.

La mucosa cervical contiene mucinas, alfa-amilasa, lisozima, lactoperoxidasa, albúmina y beta-microseminoproteína. La matriz se forma mediante la combinación de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más de estos componentes como una matriz portadora en una composición con una molécula de unión estérica específica, tal como anticuerpos policlonales antibacterianos o antifúngicos, preparados mediante los procedimientos de la presente divulgación.

En un aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición que comprende una goma capaz de fijar agua o hinchable en agua, que contiene carboximetilalmidón combinado con una celulosa como agente permeable, que cuando se pone en contacto con el agua forma casi instantáneamente geles y es fácilmente aplicable para aplicación vaginal. Los comprimidos que comprenden la composición de anticuerpo/matriz de la presente divulgación podrían, por ejemplo, comprender carboximetilalmidón y celulosa, tal como se describe en la Patente US 4.808.415. En un aspecto particular, los anticuerpos policlonales antibacterianos y antifúngicos se combinan en la matriz y se formulan para proporcionar un tratamiento de amplio espectro para la vaginosis. En un aspecto, la composición se utiliza para tratar una infección bacteriana vaginal, tal como infección por trichomonas, o vaginosis fúngica, tal como una infección por Cándida.

La saliva es una secreción mucosa presente en la cavidad oral y producida por las glándulas salivales. La saliva cumple funciones de protección, tales como recubrimiento de tejidos, lubricación, humidificación y remineralización de los dientes. La saliva también cumple funciones de defensa del huésped con actividad inmunológica, antibacteriana, antiviral y antifúngica. La saliva también sirve para la actividad digestiva con enzimas digestivas, formación de bolos y sabor. La saliva contiene varias proteínas, tales como histatinas, y proteínas ácidas ricas en prolina que son exclusivas de la saliva. La saliva también contiene proteínas presentes en otros fluidos corporales, tales como la lisozima, mucinas, estaterinas e inmunoglobulinas. La saliva contiene proteínas, tales como la albúmina y la glicoproteína Zn-alfa-2 que se originan en el plasma sanguíneo. Existe un valor terapéutico conocido de la saliva bovina. (Varshney et al., 1997, Therapeutic value of bovine saliva in wound healing: a histomorphological study., Indian J. Biol. May 1997, 35 (5): 535-7). En un aspecto, los componentes de la saliva podrían ser útiles, por ejemplo, en pasta dental o enjuague bucal, u otras preparaciones para la administración de la mucosa oral.

La mucosa bronquial contiene mucinas, alfa-amilasa, polipéptidos básicos ricos en prolina (PRP), cistatinas, estaterina, EP-GP, lisozima, beta-microseminoproteína y albúmina. En un aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición que comprende una molécula de unión estérica específica y una matriz portadora que comprende dos o más, tres o más, cuatro o más de los componentes de la saliva o las secreciones bronquiales. En un aspecto, la composición con la matriz portadora se debe envasar en un formato seco con la molécula de unión estérica específica, tal como los anticuerpos policlonales de Streptococcus anti-Grupo A preparados, según la presente divulgación. En un aspecto, la formulación seca se reconstituye, por ejemplo, en una solución salina, y se administra como un aerosol para la garganta para el tratamiento de la faringitis estreptocócica.

Se pueden preparar otras matrices portadoras para funcionar en otros entornos de utilización, por ejemplo, para preparaciones en aerosol (inhaladas), oculares, tópicas u otras.

La molécula de unión específica y la matriz portadora se derivan de diferentes especies. En un aspecto adicional, tanto la molécula de unión específica como la matriz portadora se derivan de especies no humanas. En otro aspecto, la molécula de unión específica se deriva de un animal no mamífero. En otro aspecto, la matriz portadora se deriva de un mamífero no humano.

FORMULACIONES Y COMPOSICIONES

Los anticuerpos se pueden recolectar del plasma, suero o sangre, calostro, huevos u otro componente de un animal inoculado o de un sistema de producción artificial (tal como un cultivo celular), purificarse o tratarse posteriormente,

y añadirse a una matriz portadora, tal como el calostro. Las composiciones permiten que se utilicen como medio de administración para, por ejemplo, la administración oral de la formulación de anticuerpos. Este enfoque puede proporcionar un modo eficaz de escalar de manera segura la producción de anticuerpos para la formulación de esta manera, a fin de controlar el título, la consistencia y la disponibilidad continua, para su utilización comercial. Los anticuerpos pueden recogerse de los huevos de un animal inoculado, y pueden purificarse o tratarse o retenerse en el material del huevo, y añadirse a los calostros bovinos.

Existe una clara necesidad de tratamientos efectivos y de bajo coste para muchos patógenos gastrointestinales, y los anticuerpos administrados por vía oral son candidatos para este papel. Además de tener eficacia demostrada, los anticuerpos administrados por vía oral son normalmente no inmunogénicos. Generalmente se consideran bien tolerados, no se ha informado de efectos secundarios adversos y, comparativamente, no hay reacciones diferentes a las de un producto alimenticio ingerido comparable. En particular, varios productos que contienen anticuerpos administrados por vía oral han recibido la certificación GRAS (generalmente reconocida como segura) por la FDA.

Una limitación importante de la utilización de productos basados en alimentos naturales es que las preparaciones se limitan a los resultados permitidos por los procesos naturales. La presente divulgación permite la adición selectiva de niveles de anticuerpos específicos y factores inmunes generales (formulación) que son significativamente más altos que los niveles fisiológicos que normalmente se pueden conseguir en la naturaleza. La presente divulgación también permite una ponderación de diversos factores de una manera para crear una mayor especificidad para dolencias, patógenos o sustancias específicas.

La formulación que comprende la molécula de unión específica puede ser una formulación de sólidos seca (huevo en polvo). La formulación en polvo se sella en envases herméticos, opcionalmente en capas con un gas inerte. La formulación se puede almacenar por períodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente, bajo refrigeración o a temperaturas de congelación. La composición seca puede formularse en cápsulas o comprimidos para administración oral. La formulación también se puede comprimir en comprimidos masticables.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a los diluyentes farmacéuticamente aceptables para formular la composición, en el que dichos diluyentes farmacéuticamente aceptables se seleccionan entre el grupo que comprende lactosa, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina, sacarosa, citrato de sodio, fosfato dicálcico, o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de los mismos; aglutinantes seleccionados entre el grupo que comprende goma de tragacanto, goma arábiga, metilcelulosa, gelatina, polivinilpirrolidona, almidón o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de los mismos; excipientes seleccionados entre el grupo que comprende agar-agar, carbonato de calcio, carbonato de sodio, silicatos, ácido alginico, almidón de maíz, almidón de tapioca, primogel o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de los mismos; lubricantes seleccionados entre el grupo que comprende estearato de magnesio, estearato de calcio o esteorotes, talco, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo; deslizantes seleccionados entre el grupo que comprende dióxido de silicio coloidal o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de los mismos; un agente edulcorante seleccionado entre el grupo que comprende sacarosa, sacarina o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de los mismos; un agente saborizante seleccionado entre el grupo que comprende menta, salicilato de metilo, aroma de naranja, aroma de vainilla o cualquier otro aroma farmacéuticamente aceptable solo o en una combinación adecuada de los mismos; agentes humectantes seleccionados entre el grupo que comprende alcohol acetílico, monoestearato de glicerilo o cualquier otro agente humectante farmacéuticamente aceptable solo o en una combinación adecuada de los mismos; absorbentes seleccionados entre el grupo que comprende caolín, bentonita o cualquier otro absorbente farmacéuticamente aceptable solo o en una combinación adecuada de los mismos; agentes retardantes seleccionados entre el grupo que comprende cera, parafina o cualquier otro agente retardante farmacéuticamente aceptable solo o en una combinación adecuada de los mismos.

En otro aspecto, la dosis diaria para el ser humano no neonatal se estandariza mediante cualquier procedimiento de cuantificación de anticuerpos específicos. En un aspecto, la dosis de la composición se estandariza mediante la utilización de ELISA para evaluar la concentración del anticuerpo antigénico específico en la formulación. En un aspecto, una dosis de la composición oral eficaz para tratar una infección patógena contiene una molécula de unión específica a antígeno en una cantidad de, aproximadamente, 0,0001 mg a 20 mg; de 0,001 mg a 15 mg; de 0,01 a 10 mg; de 0,05 a 5 mg; de 0,1 a 1 mg de molécula de unión específica a la mezcla de antígenos.

La expresión "forma sólida" se refiere a una forma seca de una molécula de unión específica, o una forma seca de una matriz portadora, o una forma de dosificación sólida que comprende tanto la molécula de unión específica seca como la matriz portadora en forma de polvo, comprimido, pastilla o cápsula. En un aspecto, la forma de dosificación sólida está destinada para administración oral. En un aspecto, el polvo es una formulación para suspensión. En un aspecto, el huevo inmune seco en polvo y el calostro seco en polvo se envasan en un envase hermético. Inmediatamente antes de la administración oral, el contenido del envase se suspende, o se disuelve, en un líquido y se administra por vía oral.

En un aspecto, la composición también se puede proporcionar en una forma líquida para administración.

5 En un aspecto, una dosis contiene 1 g, 2 g, 3 g, 4 g, 5 g, 5 g, 6 g, o 7 g de huevo inmune seco y 1 g, 2 g, 3 g, 4 g 5 g, 5 g, 6 g, o 7 g de calostro bovino seco. En un aspecto, una dosis de la forma de dosificación seca contiene 3 g de producto de huevo inmune seco y 4 g de calostro bovino seco. En un aspecto, una dosis de la forma de dosificación seca contiene 2 g de producto de huevo inmune seco y 4 g de calostro bovino seco. En un aspecto, una dosis de la forma de dosificación seca contiene 4 g de producto de huevo inmune seco y 4 g de calostro bovino seco. En otro aspecto, los contenidos de un envase monodosis se disuelven en, aproximadamente, 2 onzas de agua y se administran por vía oral.

10 Las formulaciones para utilización oral también pueden prepararse como pastillas, comprimidos masticables o como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, lactosa, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados se pueden preparar utilizando los ingredientes
15 mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de una manera convencional utilizando, por ejemplo, un mezclador, un aparato de lecho fluido o un equipo de secado por pulverización.

20 Las formulaciones de la presente divulgación dan a conocer una variedad de ventajas con respecto a la técnica anterior. En un aspecto, las formulaciones de la presente divulgación que comprenden IgY específica frente a antígeno y una matriz portadora de calostro bovino tienen la ventaja de prepararse en un período de tiempo rápido de, aproximadamente, 6 semanas, una vez que se identifican los antígenos de interés. Esto permite una fácil reproducibilidad y estandarización del protocolo de vacunación de pollos. En un aspecto específico, diferentes grupos de pollos se vacunan con una sola preparación de mezcla de antígenos cada uno, y posteriormente se combinan para una composición de amplio espectro para el tratamiento de una infección patógena. En un aspecto
25 específico, tres grupos de pollos se vacunan con preparaciones de mezcla de antígenos separadas y posteriormente se agrupan para preparar una composición de amplio espectro para el tratamiento de la diarrea no diferenciada sin el conocimiento de los patógenos microbianos causantes. Este procedimiento tiene la ventaja de que la mezcla de anticuerpos específicos frente a antígeno en la composición se puede adaptar para un brote, región o estación en particular, si se desea. Finalmente, la molécula de unión específica puede no necesitar estar separada del huevo
30 entero para una preparación rápida y un almacenamiento a largo plazo.

35 En otro aspecto, las composiciones de la presente divulgación son eficaces para la administración oral en el tratamiento de una infección patógena en no neonatos. El tracto gastrointestinal del no neonato es muy ácido y menos absorbente que el del neonato, tal como se ha descrito en el presente documento. En los ejemplos de la presente divulgación, las composiciones fueron eficaces para tratar diarrea no diferenciada en niños no neonatales de 6 meses a 5 años de edad. En otro aspecto, las composiciones de la presente divulgación son eficaces para tratar o prevenir la diarrea del viajero en adultos. La matriz portadora es una matriz protectora y reactiva para combinación con las moléculas de unión específicas frente a antígeno. En otro aspecto, las composiciones de la presente divulgación se proporcionan en forma sólida en polvo para suspensión inmediatamente antes de la
40 administración. En un aspecto, la forma de dosificación suspendida o reconstituida tiene la ventaja de ser muy apetecible para los bebés y los niños, incluso cuando sufren los síntomas de una infección patógena. Esto tiene la ventaja de que la dosis completa es fácilmente administrada e ingerida por el individuo que padece la infección patógena.

45 En otro aspecto, las composiciones se pueden utilizar para administrar inmunidad pasiva de amplio espectro en cualquiera de los tratamientos, o en la profilaxis de la infección patógena. En un aspecto, un nivel bajo de inmunización de los pollos puede ser suficiente para preparar una composición con una cantidad eficaz de molécula de unión antiantígeno específica para dar como resultado una formulación eficaz de amplio espectro cuando se administra con una matriz portadora.

50 TRATAMIENTO O PROFILAXIS DE LA INFECCIÓN PATÓGENA

55 Las composiciones de la presente divulgación comprenden una proteína de unión específica introducida dentro de una matriz portadora. Las composiciones pueden administrarse en cualquier procedimiento adecuado a sus características inmunogénicas o biológicas o inmunológicamente reactivas particulares, entre las que se incluyen el procedimiento oral, intravenoso, bucal, nasal, mucoso, dérmico u otro, dentro de una matriz portadora apropiada. La administración oral de la composición de la presente divulgación es posible.

60 La composición se puede administrar como una composición profiláctica o terapéutica. En diversos aspectos, la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. En diversos aspectos, la composición no incluye un polímero, copolímero, liposoma, hidrogel o fibrina. En diversos aspectos, la composición no incluye microesferas o microcápsulas. En diversos aspectos, la composición no incluye un inmunógeno o antígeno. La composición de la presente invención puede administrarse mediante administración oral, administración nasal, administración oftálmica, administración ocular, administración en la mucosa o una combinación de las mismas.

65 Se puede utilizar la administración oral. Se ha demostrado en sistemas humanos y animales que la administración

oral de anticuerpos, inmunoglobulinas y otros factores inmunitarios biológicos (ingeridos) pueden tener efectos medibles en el curso, la gravedad y la duración de las dolencias asociadas, o influenciadas por el sistema gastrointestinal.

5 La mezcla de anticuerpos de amplio espectro está introducida en una matriz portadora, tal como, por ejemplo, el calostro para la administración oral. El calostro sirve para proporcionar atributos sinérgicos protectores y eficaces a la formulación de anticuerpos. Se puede utilizar cualquier combinación de anticuerpos dentro de un portador, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, una combinación de anticuerpos antipatógenos, antitoxina y antiadhesina.

10 En un aspecto, las composiciones de la presente divulgación se utilizan para tratar pacientes que padecen diversas infecciones patógenas. Las composiciones y formulaciones para administración oral se pueden administrar una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día durante dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, 8, 9, 10, 11 o 12 días consecutivos para el tratamiento de una infección patógena. En un aspecto, la composición se administra dos veces al día durante cinco días para el tratamiento de una infección patógena. En otro aspecto específico, la composición se administra una vez al día durante tres días consecutivos para el tratamiento eficaz de la diarrea no diferenciada en niños no neonatales, o en el tratamiento de la diarrea del viajero en niños o adultos no neonatales. En otro aspecto, la composición puede administrarse regularmente para la profilaxis de una infección patógena.

15 En el caso de una composición para el tratamiento de una infección patógena de una membrana mucosa mediante administración tópica a una membrana mucosa, la composición se puede administrar de dos a seis veces por día durante un período de tres a 12 días.

20 La presente divulgación da a conocer una composición eficaz para tratar diarrea no diferenciada en seres humanos no neonatales. La composición aprovecha una estrategia de producción de anticuerpos policlonales eficaz (inoculación de pollos, con recolección de anticuerpos a través de los huevos) para generar anticuerpos de alta especificidad dirigidos a varias de las causas de la patología de la diarrea. La composición puede comprender anticuerpos policlonales específicos en una matriz portadora que es calostro comercial bovino.

25 La presente divulgación da a conocer una composición económica para el tratamiento eficaz de la diarrea pediátrica no diferenciada. La composición comprende una mezcla de anticuerpos policlonales, principalmente IgY, específicos para *E. coli*, *Salmonella spp.*, rotavirus, bacterias gramnegativas, toxinas producidas por patógenos y adhesinas que permiten la unión y colonización de patógenos en el tracto gastrointestinal.

30 En un aspecto específico, la composición comprende una cantidad en peso equivalente de producto de huevo inmune seco de cada uno de los tres grupos inoculados con antígenos diferentes o diferentes preparaciones de mezcla de antígenos se envasan conjuntamente con una cantidad en peso específico de calostro bovino no hiperinmune seco comercial. En un aspecto, se añaden de 0,5 a 3 g, de 0,7 a 2,0 g, 1,0 g, 1,3 g, o 1,5 g de producto de huevo inmune seco de cada grupo a un envase monodosis. Preferentemente, se añade 1,0 g o 1,3 g de cada producto de huevo inmune a un envase de una dosis. En otro aspecto, se añaden al mismo envase de 1 a 5 g, 2 g a 4 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g o 5 g de calostro seco.

35 Antes de utilizar, los contenidos del envase, o sobre, se mezclan en, aproximadamente, 2 onzas de agua purificada, o algún otro líquido oral. La formulación reconstituida completa se administra por vía oral al individuo. La composición se puede administrar de una a cuatro veces al día durante dos a diez días. La composición se puede administrar una vez al día durante 3 días consecutivos. La presente divulgación da a conocer un procedimiento para tratar la diarrea pediátrica no diferenciada, mediante la administración de la composición de la presente divulgación una vez al día durante dos, tres o cuatro días.

40 En un aspecto, la composición de la presente divulgación se administra como una terapia adjunta al tratamiento con antibióticos. En este aspecto, la composición se puede administrar una vez al día durante los primeros tres días de tratamiento. En otro aspecto, la composición de la presente divulgación se administra con solución de rehidratación oral (ORS). En otro aspecto, la composición de la presente divulgación se administra conjuntamente con una formulación de cinc oral. En otro aspecto, la composición de la presente divulgación se administra como un complemento del tratamiento con antibióticos para evitar el crecimiento excesivo de un organismo patógeno particular que es resistente al antibiótico. Tal como se describe en detalle en los ejemplos, la composición y el procedimiento son efectivos para resolver rápidamente los síntomas de la diarrea pediátrica no diferenciada, lo que da como resultado una disminución significativa del volumen de las heces, la frecuencia de las heces y la duración de la diarrea, así como también un bienestar médico significativamente mejorado.

45 Las composiciones de la presente divulgación se pueden utilizar para tratar la diarrea del viajero. El inicio de la TD suele ocurrir dentro de la primera semana de viaje, pero puede ocurrir en cualquier momento durante el viaje e incluso después de regresar a casa. El determinante de riesgo más importante es el destino del viajero. Los destinos de alto riesgo son los países en desarrollo de América Latina, África, Oriente Medio y Asia. Las personas con mayor riesgo incluyen adultos jóvenes, personas inmunodeprimidas, personas con dolencia inflamatoria intestinal o diabetes, y personas que toman bloqueantes H-2 o antiácidos. La mayoría de los casos de TD comienzan

abruptamente. La enfermedad generalmente da como resultado un aumento de la frecuencia, el volumen y el peso de las heces. La consistencia alterada de las heces también es común. Normalmente, un viajero experimenta de cuatro a cinco evacuaciones intestinales sueltas o acuosas cada día. Otros síntomas comúnmente asociados son náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales, distensión abdominal, fiebre, urgencia y malestar general.

Los agentes infecciosos son la causa principal de la TD. Los enteropatógenos bacterianos causan, aproximadamente, el 80 % de los casos de TD. El agente causal más común aislado en los países estudiados ha sido la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). La ETEC produce diarrea acuosa con cólicos asociados y fiebre baja o sin fiebre. Además de ETEC y otros patógenos bacterianos, una variedad de patógenos entéricos virales y parasitarios también son agentes causales potenciales.

En un aspecto, la composición de la presente divulgación se administra al individuo una vez al día durante tres días consecutivos como una alternativa o un complemento al tratamiento con antibióticos de la diarrea del viajero. La limitada evidencia de estudios de campo sugiere una mejoría en los síntomas diarreicos dentro de las 24 o 48 horas de la primera dosis. Alternativamente, dos dosis por día de la composición de la presente divulgación se administran el día 1, seguidas de una dosis única los días 2 y 3. En un aspecto, la composición de la presente divulgación se administra en un horario diario o semanal alternativo, o en un horario de dosis reducido para la profilaxis de la diarrea del viajero.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden utilizar como un "prebiótico" para la gestión de la flora gastrointestinal de un individuo, por ejemplo, antes de la administración de un probiótico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prebiótico" se refiere a una composición que permite cambios específicos, tanto en la composición como en la actividad de la microflora gastrointestinal que confiere beneficios al bienestar y la salud del individuo. En un aspecto, la composición es útil para gestionar la flora gastrointestinal con el fin de reducir o eliminar una o más cepas indeseables de bacterias. En un aspecto, la composición de inmunoglobulina antigénica se adapta para gestionar la flora gastrointestinal a fin de reducir o eliminar una o más cepas indeseables de bacterias. En otro aspecto, las composiciones se utilizan como un complemento de los prebióticos tradicionales. En un aspecto adicional, la composición de la presente divulgación comprende además una fibra soluble. En un aspecto adicional, la composición se utiliza sola para la gestión de la flora.

En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer un procedimiento de gestión de la flora gastrointestinal en un individuo que comprende las etapas de administrar la composición de la presente divulgación para reducir o eliminar una o más cepas de bacterias no deseables, seguido de la administración de un probiótico para introducir una o más cepas de bacterias más deseables. En otro aspecto, la composición de la presente divulgación se administra como un complemento del tratamiento con antibióticos para evitar el crecimiento excesivo de un organismo patógeno particular que es resistente al antibiótico.

EJEMPLO 1. Composiciones para el tratamiento de la diarrea

La diarrea es un síntoma de una amplia gama de causas que incluyen infecciones bacterianas, virales, protozoarias y parasitarias. La diarrea bacteriana es inducida por múltiples organismos, entre los que se incluyen diversas formas de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* y *parahemolyticus*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* y otros. La diarrea pediátrica viral está causada a menudo por el rotavirus, pero también puede estar causada por diversos otros virus.

Se sabe que existen múltiples organismos causantes en la diarrea. Estos organismos causantes pueden organizarse en grupos comunes que producen toxinas relacionadas estructuralmente, para las cuales se pueden crear una serie de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro que, cuando se mezclan en una formulación con títulos clínicamente eficaces, pueden utilizarse como una intervención terapéutica de amplio espectro independiente de organismo para la diarrea mediada por toxinas.

En resumen, los anticuerpos específicos para los organismos causantes de la diarrea se generan mediante la inoculación de pollos con los antígenos. Los huevos inmunes se recolectan y el huevo entero se pasteuriza y se seca por pulverización para obtener una forma pulverizada. El calostro bovino comercial se mezcla en forma de polvo. Los dos polvos se añaden secuencialmente a un envase monodosis y se sellan, y se distribuyen en forma seca para una formulación oral. Antes de la administración, la formulación oral en polvo se mezcla con una pequeña cantidad de agua antes del consumo oral.

Este tratamiento confiere inmunidad pasiva a los pacientes, tal como se demuestra en los ejemplos de la presente memoria descriptiva. La naturaleza del tratamiento hace que los factores de riesgo asociados sean comparables a los de comer alimentos de la fuente donde se recolectaron los anticuerpos (por ejemplo, los factores de riesgo serían similares a los de comer un huevo y un vaso de leche). Este es un tratamiento efectivo con menos toxicidad que los medicamentos alternativos disponibles actualmente.

Ejemplo 1A (no dentro de las reivindicaciones adjuntas). Los pollos se inocularon individualmente con antígenos purificados derivados de 5 cepas de *E. coli*: cuatro cepas ATCC, que contenían antígenos de pilos de adherencia de

E. coli F41, 97P, F19 y K99, y una cepa de *E. coli* de tipo natural derivada de la leche. Cada pollo fue inoculado con un solo antígeno. Los pollos se inocularon una vez por semana durante tres semanas. Se utilizó adyuvante de Freund para la primera inoculación, seguido del adyuvante incompleto de Freund para la segunda y tercera inoculaciones. Se utilizaron dos inyecciones, pecho izquierdo y derecho por inoculación. Los huevos se incubaron por separado; los huevos se recolectaron, se pasteurizaron instantáneamente y se secaron mediante pulverización. Cada una de las cinco preparaciones de anticuerpos se mezclaron en partes iguales. La preparación del anticuerpo anti *E. coli* en polvo de huevo seco se almacenó congelada durante, aproximadamente, 2 años.

Se inoculó un segundo grupo de pollos con una preparación de mezcla de antígenos que contenía rotavirus, coronavirus y antígenos de *E. coli*. Se utilizaron los mismos protocolos de inoculación, recolección y procesamiento de huevos que anteriormente. La preparación de anticuerpos antidiarrea en polvo de huevo seco se almacenó congelada durante 1,5 años. Se utilizó ELISA para caracterizar las preparaciones de anticuerpos.

Se añadió un gramo de cada una de las preparaciones de anticuerpos anti-*E. coli* secas y la preparación de anticuerpos antidiarrea seca con 3 gramos o 4 gramos de calostro bovino de grasa completa comercial en un envase monodosis.

Ejemplo 1B. Se inocularon individualmente tres grupos de pollos con una de cada una de las diferentes preparaciones de mezcla de antígenos: una primera preparación de antígenos que contenía rotavirus (serotipos G6 y G10), coronavirus, cepas de *E. coli* enterotoxigénicas con factor de adherencia de pillos K99 y *Clostridium perfringens* tipo C toxoide con adyuvante); una segunda preparación que contenía cepas de *E. coli* enterotoxigénicas que tenían factores de adherencia K99, K88, 987P o F41); y una tercera preparación de mezcla de antígenos que contenía varias endotoxinas de *E. coli*; con adyuvante). Cada uno de los tres grupos recibió sólo una preparación de mezcla de antígenos. Los huevos se recolectaron, limpiaron, cascaron, pasteurizaron y secaron por aspersión o secaron térmicamente para crear tres productos de huevos inmunes secos. El producto de huevo seco se evaluó opcionalmente mediante ELISA para determinar la actividad IgY específica. Se combinó un peso igual de cada uno de los tres productos de huevo inmunes secos con 3 g o 4 g de calostro seco en un envase monodosis. Se utilizaron o bien 2 g, o bien 3 g, o bien 4 g de peso combinado de producto de huevo inmune seco por envase monodosis, tal como se describe a continuación. En un aspecto, el calostro seco comercial no mostró actividad específica frente a los antígenos de las vacunas.

Ejemplo 1C (no cubierto por las reivindicaciones adjuntas). Inmunización de pollos para la producción de IgY.

El siguiente protocolo de inmunización se adaptó de un protocolo de Gallus Immunotech, Inc. y se puede utilizar para la generación de anticuerpos policlonales IgY. Opcionalmente, se recolectan unos pocos huevos antes de la inmunización para servir como control de referencia. Si se utiliza una preparación de mezcla de antígenos para ganado bovino o porcino, se diluye a 1:2, 1:4, 1:8 o 1:16 antes de la administración. En el día 0, a los pollos se les inyecta entre 0,02 y 0,5 mg de antígeno con adyuvante completo de Freund. Las inyecciones pueden ser subcutáneas o por vía intramuscular en el tejido pectoral de la gallina en múltiples sitios. El volumen total de la mezcla de antígeno/adyuvante puede ser de, aproximadamente, 1 ml con adyuvante desde la mitad hasta dos tercios del volumen. Las inmunizaciones se repiten, normalmente, los días 14, 21 y 28, utilizando el adyuvante incompleto de Freund, con, aproximadamente, la mitad de la cantidad inicial de antígeno. Normalmente, el anticuerpo específico se puede detectar, aproximadamente, a los 30 días en los huevos. Para la producción prolongada de anticuerpos, las gallinas son estimuladas cada dos meses. Los huevos se pueden almacenar en almacenamiento en frío antes del procesamiento y/o la purificación de las IgY. En un aspecto de la presente divulgación, los huevos se pueden mantener en almacenamiento en frío durante un mes, o hasta dos meses, antes del procesamiento o la purificación. En otro aspecto de la presente divulgación, se pueden generar IgY de manera similar en huevos de pato, ganso, avestruz, codorniz o pavo, con la utilización de cantidades apropiadas de antígeno.

EJEMPLO 2. Tratamiento con anticuerpo ingerido para *Clostridium difficile* (Ejemplo no cubierto por las reivindicaciones adjuntas)

Las composiciones (no cubiertas como tales por las reivindicaciones) se pueden utilizar para tratar *Clostridium difficile* (*C. difficile*), una bacteria que está presente de forma natural en la mayoría de las personas. Los niveles poblacionales de *C. difficile* se mantienen bajo control por la otra flora natural del intestino. Los pacientes a menudo desarrollan infecciones por *C. difficile* cuando los antibióticos administrados para otra afección médica agotan la flora natural del intestino, lo que permite que las poblaciones de *C. difficile* se multipliquen sin control. Si bien muchas cepas de *C. difficile* pueden tratarse con antibióticos especializados, un número cada vez mayor de cepas de *C. difficile* son resistentes al tratamiento con antibióticos. Esto conduce a una recuperación prolongada y difícil para los pacientes, e incluso puede llegar a ser mortal en ciertas circunstancias. Un proceso que neutraliza las poblaciones de *C. difficile* con un anticuerpo ingerido que confiere inmunidad pasiva es capaz de controlar los niveles de la población de *C. difficile* para permitir que se restaure el equilibrio natural de la flora intestinal.

Como en el caso en formulaciones antidiarreicas causadas por rotavirus y bacterias gramnegativas, un anticuerpo incorporado en una matriz portadora formulado específicamente para unirse a *C. difficile* o sus toxinas es un enfoque

terapéutico eficaz. Esta formulación puede utilizarse para tratar una infección en curso o para prevenir que ocurra una infección de este tipo. Por lo tanto, el tratamiento se puede administrar solo o simultáneamente con un antibiótico. Este tratamiento no sólo beneficia a los pacientes que se recuperan de un episodio de *C. difficile*, sino que también se puede administrar a pacientes con alto riesgo de desarrollar *C. difficile* como un profiláctico.

Los anticuerpos que neutralizan *C. difficile* se ingieren en una matriz portadora (una mezcla de proteínas y enzimas que tienen la intención de "activar" el anticuerpo en el intestino, además de proporcionar una inmunidad secundaria, protección o nutrición útil). Los anticuerpos se pueden producir inyectando, o inoculando, un animal con un antígeno, o una combinación de antígenos, que pueden estar o no contenidos en una preparación de mezcla de antígenos, (potencialmente combinados con un adyuvante para provocar una respuesta inmune más fuerte).

En un aspecto, el antígeno se obtiene de un antígeno o toxina de *C. difficile*, o se deriva de los mismos. En otro aspecto, la combinación de antígenos contiene uno o más antígenos o toxinas derivados de *C. difficile*, y uno o más antígenos virales adicionales. En otro aspecto, la combinación de antígenos contiene uno o más antígenos o toxinas derivadas de *C. difficile*, y uno o más antígenos bacterianos o toxinas adicionales. En otro aspecto, la combinación de antígenos contiene uno o más antígenos derivados de *C. difficile*, y uno o más antígenos protozoarios adicionales. En otro aspecto, la combinación de antígenos contiene uno o más antígenos derivados de *C. difficile*, y uno o más antígenos fúngicos adicionales.

A continuación, los anticuerpos se obtienen de un producto animal, tal como leche, huevos o calostro del animal, se aíslan o se derivan a partir de los mismos, o se recolectan directamente del animal, por ejemplo, suero, plasma. En un aspecto particular, las gallinas se inoculan con el antígeno, combinación de antígenos o vacuna, y los anticuerpos se obtienen de huevos enteros o yemas de huevo, o se derivan o se purifican a partir de huevos enteros o yemas de huevo de los pollos inoculados. En otro aspecto, los anticuerpos son anticuerpos policlonales.

El objetivo de esta composición es ayudar a tratar las infecciones por *C. difficile*, o ser un profiláctico contra la infección por *C. difficile*. Por ejemplo, la sustancia está compuesta por anticuerpos dirigidos específicamente a *C. difficile*, incorporados dentro de una matriz portadora (por ejemplo, calostro). Después de la recolección, los anticuerpos pueden pulverizarse. La matriz portadora también puede estar pulverizada. Posteriormente, los dos polvos pueden mezclarse bien, o añadirse por separado a un envase o vial monodosis, y distribuirse en forma seca. En un procedimiento de administración preferente, la sustancia se administrará por vía oral, por ingestión. Para consumir, la sustancia en polvo se mezclará con una pequeña cantidad de líquido, tal como agua, leche, zumo o solución de electrolitos, inmediatamente antes del consumo, y se tomará según las indicaciones de un médico. También se contemplan otros procedimientos de administración.

El tratamiento actual para la infección por *C. difficile* se centra en la terapia con antibióticos. Sin embargo, en los casos en que los antibióticos fuertes fueron la causa de la infección, y en los casos en que se ha desarrollado resistencia a los antibióticos, actualmente existen pocos tratamientos alternativos disponibles. El presente ejemplo busca neutralizar *C. difficile* utilizando mecanismos inmunitarios naturales, en lugar de antibióticos tóxicos. Tiene la ventaja de permitir el crecimiento de la flora natural en el intestino al tiempo que reduce los niveles de población de *C. difficile*.

La combinación de anticuerpos introducidos dentro de una matriz portadora para mejorar la efectividad de los anticuerpos no se utiliza actualmente por ningún tratamiento de la dolencia por *C. difficile*. Los procedimientos dados a conocer confieren inmunidad pasiva a los pacientes. La naturaleza del tratamiento hace que los factores de riesgo asociados sean comparables a los de comer alimentos de la fuente en la que se recolectaron los anticuerpos (por ejemplo, los factores de riesgo serían similares a los de comer un huevo y un vaso de leche). Este es un tratamiento efectivo con menos toxicidad que los medicamentos alternativos disponibles actualmente.

En un aspecto, los anticuerpos seleccionados se obtienen, se purifican, se aíslan y se preparan en forma de polvo. En otro aspecto, los anticuerpos seleccionados no se purifican, ni se aíslan, sino que se procesan como un producto completo. Por ejemplo, se procesa el contenido del huevo entero obtenido del pollo inoculado, por ejemplo, se pasteuriza y se prepara en forma de polvo, sin etapas adicionales de purificación. Una mezcla de enzima/proteína activadora (por ejemplo, incluyendo el calostro) se prepara también en forma de polvo. Los dos polvos se mezclan bien y se distribuyen en forma seca para una formulación oral. Antes de la administración, la formulación oral en polvo se mezcla con una pequeña cantidad de agua antes del consumo.

Este tratamiento confiere inmunidad pasiva a los pacientes. La naturaleza del tratamiento hace que los factores de riesgo asociados sean comparables a los de comer alimentos de la fuente en la que se recolectaron los anticuerpos (por ejemplo, los factores de riesgo serían similares a los de comer un huevo y un vaso de leche). Este es un tratamiento efectivo con menos toxicidad que los medicamentos alternativos disponibles actualmente.

EJEMPLO 3. Tratamiento con anticuerpo ingerido para *Helicobacter pylori* (Ejemplo no cubierto por las reivindicaciones adjuntas)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa que puede habitar en áreas del estómago. En general,

se cree que *H. pylori* está asociada con úlceras gástricas y duodenales y, posiblemente, con cáncer de estómago. *H. pylori* puede escapar del ambiente ácido de la luz del estómago enterrándose en la capa de mucosa de la superficie de la célula epitelial que tiene un ambiente de pH más neutro. *H. pylori* puede producir adhesinas para unirse a los lípidos asociados a la membrana o a los carbohidratos de las células epiteliales. La colonización de *H. pylori* dentro de las áreas del estómago puede causar gastritis crónica, una inflamación del estómago de larga duración. Una de las principales causas de la úlcera péptica es la infección por *H. pylori*.

Los anticuerpos seleccionados contra *Helicobacter pylori* se obtienen y se preparan en forma de polvo. Una mezcla de enzimas/proteínas activadoras (por ejemplo, incluyendo el calostro) también se prepara en forma de polvo. Los dos polvos se mezclan bien, o se añaden por separado a los envases o viales monodosis, y se distribuyen en forma seca para una formulación oral. Antes de la administración, la formulación oral en polvo se mezcla con una pequeña cantidad de agua antes del consumo.

Este tratamiento confiere inmunidad pasiva a los pacientes. La naturaleza del tratamiento hace que los factores de riesgo asociados sean comparables a los de comer alimentos de la fuente en la que se recolectaron los anticuerpos (por ejemplo, los factores de riesgo serían similares a los de comer un huevo y un vaso de leche). Este es un tratamiento efectivo con menos toxicidad que los medicamentos alternativos disponibles actualmente.

EJEMPLO 4. Estudios clínicos: eficacia en la diarrea indiferenciada

El tratamiento eficaz de amplio espectro de la diarrea es un desafío importante debido a la amplia gama de organismos causales, la disponibilidad limitada de pruebas de diagnóstico para dirigir los regímenes de tratamiento. La intervención estándar actual para casos de diarrea muy grave incluye la administración ubicua de antibióticos y sales de rehidratación oral (ORS). Sin embargo, este enfoque ha demostrado una eficacia limitada y ha promovido el desarrollo de cepas de bacterias resistentes a los antibióticos.

Ejemplo 4A. Pruebas de estudio de campo 1 y 2.

Se realizaron estudios clínicos para evaluar la tolerabilidad y la eficacia de la formulación del ejemplo 1A en el tratamiento o la aceleración de la resolución de la diarrea indiferenciada. Un primer estudio abierto, de un solo centro, no comparativo, incluyó a un total de 63 pacientes pediátricos con diarrea pediátrica de ambos sexos entre los seis meses y los cinco años de edad. El estudio comparó los resultados clínicos del grupo de examen A, "Prueba 1", que recibió la formulación oral del ejemplo 1A, administrada con antibióticos y ORS, respecto a un grupo de control B, que recibió sólo antibióticos y ORS. Un segundo grupo de examen AA, "Prueba 2", incluyó a 33 pacientes en un estudio de seguimiento para someter a examen la formulación del Ejemplo 1A en diferentes condiciones estacionales.

Todos los pacientes pediátricos participantes presentaron un perfil de diarrea "grave" o "muy grave" (nivel 4 o 5) en una escala de 5 puntos (véase la tabla 1), según evaluó el médico tratante. No se hizo diferenciación diagnóstica en cuanto al agente causal o etiología de la diarrea pediátrica. Se excluyeron los pacientes con heces de agua de arroz de heces con sangre. Además, se excluyeron los pacientes con alergias conocidas a los productos lácteos, de pollo o de huevo.

Tabla 1. Escala de 5 puntos		
	Nivel 1	Nivel 5
Frecuencia de las heces	1-2 por día	10 o más por día
Consistencia de las heces	1 = normal	5 = totalmente líquido
Bienestar evaluado por el médico	1 = normal	5 = muy grave (paciente normalmente hospitalizado)

Los niños inscritos (n=63) se dividieron en dos grupos, un grupo experimental, estudio 1, "Grupo A" (34 niños inscritos; 29 que completaron la prueba), control negativo "grupo B", (29 niños inscritos; 28 que completaron la prueba) y estudio 2 "Grupo AA" (31 inscritos). Un segundo grupo de control "Grupo BB" que recibió antibióticos y ORS se utilizó como control negativo al mismo tiempo que el grupo AA, sin embargo, los resultados se omiten de las cifras.

Cada grupo de examen recibió 2 g de huevo en polvo combinado y 4 g de calostro, mezclado en agua, administrado por vía oral una vez al día durante tres días consecutivos. Cada grupo se observó y los datos se recogieron durante cinco días. El grupo A recibió la composición del ejemplo 1 además de un régimen estándar de antibióticos y suplementos de rehidratación oral (ORS), según lo determinó el pediatra que lo atendía. El grupo B se trata con un régimen estándar de antibióticos y ORS. Se permitió una ventana temporal de seis meses entre el estudio 1 y el estudio 2 para someter a examen la estacionalidad. Ambas pruebas se realizaron en el mismo centro de estudio. En cada grupo, las prescripciones de antibióticos y ORS se determinaron caso por caso por el pediatra asistente (tabla 2).

Tabla 2. Grupos de estudio con los números de casos completados				
Grupo	Terapia administrada	Completado	Periodo de tratamiento	Observación
A	Composición del ejemplo 1 + antibiótico + ORS	29	Composición del ejemplo 1: días 1-4 Antibiótico + ORS: días 1-6	5 días
AA	Composición del ejemplo 1 + Antibiótico + ORS	31	Composición del ejemplo 1: días 1-3 Antibiótico + ORS: días 1-6	5 días
B	Antibiótico + ORS	28	Antibiótico + ORS: días 1-5	5 días

La composición del ejemplo 1A se envasó en sobres de 5 gramos en polvo monodosis. La composición se administró por vía oral, con un envase resuspendido en, aproximadamente, 2 onzas de agua potable. Los pacientes debían beber toda la suspensión en un solo lugar, inmediatamente después de que se completara la suspensión, y este protocolo se siguió en todos los casos.

Los parámetros cubiertos en este ejemplo, medidos para cada paciente, incluyeron la frecuencia de las heces, la consistencia de las heces y el bienestar evaluado por el médico. La frecuencia de las heces es el número de evacuaciones intestinales diarreas informadas por el tutor o el hospital en un período de 24 horas. La consistencia de las heces es una escala de consistencia de 1 a 5, con 1 que indica normal y 5 que indica líquido. El bienestar evaluado por el médico es una escala de 1 a 5 de la afección general, con 1 que indica parámetros normales para un niño sano y 5 que indica un niño gravemente enfermo.

Se pidió a los médicos que participaban en la prueba que proporcionaran su experiencia de la progresión normal del paciente, según lo medido por los tres parámetros descritos, en el transcurso de seis días. Los valores informados se añadieron en una sola línea de base de progresión esperada del paciente para cada parámetro. Los pacientes fueron evaluados tanto en términos de mejoría en relación con los resultados esperados según la experiencia del médico, como en la comparación con los controles negativos simultáneos.

El análisis de datos se realizó con MS Excel y Matlab. La significación estadística se calculó mediante un examen de Chi-cuadrado con un valor de $p < 0,05$ considerado significativo. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 3.

Se observaron mejoras drásticas en pacientes que recibieron la composición del ejemplo 1A dentro de las 24 horas posteriores a la administración de la dosis inicial. Dentro de las 48 horas posteriores a la administración de la dosis inicial, los pacientes generalmente se estabilizaron en niveles normales o casi normales.

Tal como se muestra en la figura 1, el número promedio de evacuaciones intestinales diarreas en un período de 24 horas disminuyó de 9 a 2 en el grupo A (prueba 1) después de la dosis inicial de la composición del ejemplo 1. El grupo AA (prueba 2) exhibió una reducción similar de 10 a 3. En contraste, el número promedio de episodios en el grupo B (Control negativo) disminuyó de 11 a 10 en el mismo período de tiempo. El número promedio de episodios en los grupos A y AA (pruebas 1 y 2) permaneció constante en 2 desde el día 3 en adelante, mientras que el grupo B disminuyó gradualmente, mostrando finalmente 6 episodios por 24 horas al día cinco. En el grupo A, dentro de las 24 horas posteriores al tratamiento con la composición del ejemplo 1, las tasas de frecuencia de heces volvieron a niveles casi normales, $2,32 \pm 2,48$, una reducción de más del 86 % en la duración de los síntomas gastroentéricos en comparación con la población control ($P < 0,001$). Dentro de las 48 horas, las tasas de frecuencia de evacuación mejoran a $2,14 \pm 2,19$. En el grupo AA, las tasas de frecuencia mostraron tasas de estabilización similares, mejorando a $2,56 \pm 0,68$ en 24 horas y $2,00 \pm 0,45$ en 48 horas, una mejora notable en comparación con el control ($P < 0,001$).

Tal como se muestra en la figura 2, la consistencia inicial de las heces fue líquida en todos los pacientes. La consistencia de las heces del grupo A y del grupo AA mejoró a niveles casi normales en 24 horas, después de la primera dosis de la composición, después de la primera dosis de la composición del ejemplo 1. La consistencia del grupo B de control mejoró, pero aún era líquida a las 24 horas, con síntomas no resueltos por completo en todo el período de observación. El grupo A obtuvo una consistencia normal de las heces en 48 horas y durante el resto del estudio, mientras que el grupo B, en el día 3, mejoró a casi todo líquido. El grupo B finalmente alcanzó niveles casi normales de consistencia de las heces el día 6, mientras que la consistencia de las heces del grupo A se mantuvo normal durante los días 3 a 6.

Sorprendentemente, dentro de las 24 horas posteriores al tratamiento con la composición del ejemplo 1A, las tasas de consistencia de las heces volvieron a niveles leves, $2,05 \pm 1,02$ para el grupo A y $1,96 \pm 0,61$ para el grupo AA, una reducción de más del 86 % en la duración de síntomas gastroentéricos en comparación con la población control ($P < 0,001$). En 48 horas, la consistencia de las heces del grupo A se redujo aún más a niveles casi normales de $1,41 \pm 0,9$, y los niveles del Grupo AA fueron de $1,17 \pm 0,37$.

Tal como se muestra en la figura 3, todos los pacientes incluidos en el estudio fueron calificados como gravemente enfermos por los médicos que los asistieron, incluyendo hasta deshidratación grave, vómitos y baja capacidad de respuesta. Los pacientes en el grupo A y el grupo AA mejoraron significativamente durante la noche ($P < 0,001$),

después de la primera dosis de la composición del ejemplo 1, a un nivel de evaluación de bienestar promedio de, aproximadamente, dos. A las 24 horas, los pacientes del grupo B seguían gravemente enfermos. Los pacientes del grupo A y del grupo AA, a las 48 horas, mejoraron casi a la normalidad y continuaron mejorando en el tercer día al obtener una afección normal, mientras que los pacientes del grupo B mejoraron, pero se mantuvieron muy enfermos. A lo largo de los días 4-6, los pacientes del grupo A permanecen completamente recuperados, mientras que los pacientes del grupo B mejoraron de manera lineal; sin embargo, permanecieron moderadamente enfermos al final del estudio.

El médico general informó sobre el bienestar retornado a un nivel casi saludable dentro de un día, con el grupo A cayendo de un valor inicial de $4,46 \pm 0,5$ a $1,9 \pm 0,9$, un nivel considerado dentro de los parámetros normales para esta población. El grupo AA mostró resultados similares, cayendo desde un nivel inicial de $4,3 \pm 0,46$ a $2,03 \pm 0,49$. Esto representa colectivamente una reducción del 86 % en la duración de la enfermedad en comparación con la población de control ($p < 0,001$). Dentro de las 48 horas, el médico informó que el bienestar mejoró aún más a $1,26 \pm 0,83$ en el grupo A y $1,4 \pm 0,49$ para el grupo AA.

Se realizó una verificación para confirmar la distribución normal de los casos de las pruebas contra la prevalencia esperada de Rotavirus dentro del grupo A (Prueba 1), independientemente de la evaluación de la prueba primaria. Las muestras de heces se recolectaron para 26 de los 29 pacientes experimentales en el grupo A y 24 de los 31 pacientes del grupo AA, y se analizaron en un laboratorio de referencia independiente utilizando un ensayo de aglutinación comercial establecido (Slidex Rota-kit, bioMerieux, Francia). Siete de los 26 pacientes muestreados en el grupo A dieron positivo para Rotavirus (27 % de la población analizada). Esta prevalencia de la infección por Rotavirus pediátrica está en línea con los resultados esperados para la temporada y el grado de gravedad de los casos de diarrea admitidos en el estudio. Cuatro de los 24 dieron positivo en el grupo AA (17 % de la población analizada). La prevalencia de rotavirus para el grupo AA fue algo menor de lo esperado. Por lo tanto, se consideró que la composición del ejemplo 1A era eficaz, administrada para tratar la diarrea no diferenciada, incluyendo la causada por la infección por rotavirus.

Para determinar adicionalmente la similitud de la respuesta a la composición del ejemplo 1 entre el grupo positivo al Rotavirus (RV) y el grupo no positivo al Rotavirus (No-RV), se utilizó el Coeficiente de Correlación Producto-Momento de Pearson (representado como "R"), cuya fuerza se representa en el intervalo -1 a 1. El cálculo de R utilizó el promedio del grupo No-RV y RV para cada momento temporal, con el cálculo del valor R a partir del valor promedio de cada grupo durante los 6 días.

El valor R de la asociación del grupo RV con el grupo No-RV para el conjunto de datos de bienestar evaluado por el médico es 0,99029, mostrando una dependencia lineal muy fuerte y covarianza entre los dos grupos. Los comportamientos de los pacientes No-RV y RV son muy predictivos entre sí y mostraron respuestas muy similares al tratamiento durante el período de tratamiento y observación de seis días. Estos resultados confirman la eficacia de la composición del ejemplo 1 en los casos de diarrea mediada por Rotavirus (tabla 3).

Día	RV	No RV
1	4,71	4,38
2	1,71	1,95
3	1,33	1,24
4	1,28	1
5	1,14	1
6	1	1

De los 96 pacientes incluidos en los estudios, 88 completaron el período de estudio completo de seis días. Cuatro pacientes fueron retirados del grupo A y dos del grupo AA por el médico cuando se determinó que su enteritis era comórbida o como resultado de otras afecciones; tal como se muestra en la tabla 4. Un paciente del grupo A se perdió para la prueba cuando su tutor decidió que el paciente estaba lo suficientemente bien como para retirarse después de la segunda dosis de la composición del ejemplo 1. Y un paciente fue retirado del Grupo B debido a error de mantenimiento de registros (tabla 4).

Tabla 4. Pacientes retirados del estudio			
Paciente N.º	Grupo	Razón	Retirado por
A 12	Experimental (A)	Sarampión	Médico del estudio
A 19	Experimental (A)	Meningitis	1
A26	Experimental (A)	El paciente se consideró sanado	Tutor
A28	Experimental (A)	Sarampión	Médico del estudio
A33	Experimental (A)	Meningitis	Médico del estudio
B08	Control (B)	Error de mantenimiento de registros	Médico del estudio

Estos resultados sugieren que la composición del ejemplo 1 puede proporcionar un tratamiento seguro y eficaz para la diarrea pediátrica no diferenciada. La reducción de la duración y la gravedad de la diarrea evitará una cantidad significativa de morbilidad y mortalidad asociada con la diarrea pediátrica y también puede ayudar a prevenir la aparición de comorbilidades asociadas a la diarrea en pacientes pediátricos.

Después de un día de tratamiento con la composición del ejemplo 1, los pediatras informan de una mejora sustancial en el bienestar general en el 100 % de los pacientes que completaron la prueba. Sorprendentemente, la reducción significativa tanto en la duración como en la gravedad de la enfermedad proporcionó una reducción del 86 % en la duración del episodio de diarrea después de dos días de tratamiento con la composición del ejemplo 1. Las pruebas independientes de Rotavirus confirmaron la eficacia de la composición del ejemplo 1A en estos casos.

La composición del ejemplo 1A demostró ser altamente eficaz en el tratamiento de diarrea no diferenciada, reduciendo en gran medida la duración y la gravedad de la enfermedad en comparación con las terapias convencionales solas. La composición del ejemplo 1A es bien tolerada y no se informaron efectos secundarios adversos. Los resultados de este estudio representan una mejora importante y sólida en el tratamiento de la diarrea pediátrica en entornos de campo exigentes. Estos resultados brindan una oportunidad para la investigación adicional de los mecanismos y la bioquímica mediante los cuales la composición de la presente divulgación protege a los pacientes de los síntomas más graves de la diarrea indiferenciada.

Ejemplo 4B. Estudio de campo (prueba) 3.

Se realizó una tercera prueba con 140 pacientes tratados y 30 pacientes con control negativo inscritos en la prueba 3. La dosis diaria de la composición en el brazo tratado contenía 2 g en total de partes iguales de huevo entero seco de cada uno de los tres grupos, cada uno de ellos inoculado por separado con una vacuna comercial de diarrea o mastitis; y 4 gramos de calostro bovino seco (ES204A; MS204A); o 3 gramos de partes iguales en peso de huevo entero seco de cada uno de los tres grupos, cada uno inoculado por separado con una vacuna comercial de mastitis o diarrea y cuatro gramos de calostro bovino seco (MS304A). Además, el huevo se procesó mediante secado por pulverización (S) o secado térmico (T). Los grupos se alojaron en dos ubicaciones geográficas diferentes dentro de los Estados Unidos (M) o (E).

La prueba 3 se realizó tal como se ha descrito anteriormente; Los pacientes fueron tratados con las composiciones una vez al día, durante tres días consecutivos. Los resultados promedio para la prueba 3, en comparación con las pruebas 1 y 2, se muestran en las figuras 4-9. Una pequeña ramificación de la prueba 3, con 15 pacientes, se trató con 2 g de huevo seco y 4 g de calostro una vez al día durante dos días y mostró una mejoría significativa en los días uno y dos en cada parámetro medido. Este grupo mostró un ligero efecto de recaída promedio en la puntuación de los síntomas por el médico, que informó de bienestar en el día 4, la consistencia de las heces en los días 3 y 4 (ES204B). Sin embargo, estos valores todavía mejoraron significativamente en comparación con el grupo de control negativo.

Estos resultados muestran que una formulación sólida para suspensión, que comprende moléculas de unión específica que son anticuerpos IgY específicos de antígeno, en un huevo seco completo y una matriz portadora, que es calostro bovino seco no inmune, es económica y eficaz. La matriz de la presente divulgación, el calostro bovino seco, está fácilmente disponible en el mercado y puede proporcionar niveles más altos de diversos componentes de la matriz que la leche. Esto contrasta, por ejemplo, con las enseñanzas de la técnica anterior de Larsson et al, en la Patente US 2010/0233162. Larsson da a conocer un procedimiento para la administración local de globulinas inmunitarias aisladas de yema de pollo (IgY) en la leche materna humana para tratar y prevenir las infecciones por hongos. Como poco, la utilización de la leche materna humana hace que la composición de Larsson sea menos económica y difícil de producir y almacenar rápidamente. Además, después de tres días de tratamiento, se muestra que las composiciones de la presente divulgación disminuyen significativamente la duración de la diarrea no diferenciada en bebés y niños no neonatales; en las que las condiciones del tracto gastrointestinal son más duras que en el neonato. Esto contrasta con Larsson et al., en la Patente US 2006/0134101, que proporciona un procedimiento para la utilización de anticuerpos aviares para el tratamiento y la profilaxis de infecciones entéricas en bebés recién nacidos. Esto también contrasta con Sarker et al., 2001, que informaron sobre una prueba clínica de inmunoglobulina de yema de huevo de gallina hiperinmunizada, en niños no neonatales con diarrea por rotavirus,

que mostró poca o ninguna diferencia en la duración de la diarrea. (Sarker et al., 2001, Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 32: 19-25).

5 Además, las presentes composiciones utilizan huevos enteros secos que contienen IgY específico de antígeno con una matriz portadora protectora y reactiva, tal como calostro bovino, para (1) proteger los anticuerpos durante la administración oral y para (2) activar aún más la inmunidad pasiva, tal como se ha descrito. Esto contrasta con Lee et al., la Patente US 2003/0185856, que proporciona un procedimiento para la producción de huevos que contienen
10 IgY específico contra bacterias patógenas y composiciones en forma de yogur o helado que contienen IgY; sin embargo, no se describe una matriz portadora protectora y reactiva. El yogur y el helado generalmente no tienen una concentración suficientemente elevada de los componentes de matriz presentes en la matriz derivada del calostro.

A diferencia de una respuesta inmunorreguladora, generalmente, los efectos de la administración de la composición podrían observarse dentro de las 6 a 12 horas posteriores a la primera administración. Las composiciones de la presente divulgación son eficaces sin depender de la respuesta inmune del individuo.
15

EJEMPLO 5. Estudio clínico: eficacia inesperada en la fiebre tifoidea

Se proporcionaron pruebas de la eficacia de la composición reivindicada a través de una demostración inesperada y no planificada de la eficacia clínica causada por una inoculación anterior desconocida.
20

Durante un estudio de campo en la India, un pequeño número de niños se presentaron para el tratamiento, habiéndoseles diagnosticado clínicamente "Fiebre Tifoidea". La fiebre tifoidea es una infección causada de manera más común por un tipo de bacteria llamada *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Los síntomas clásicos de esta dolencia, más allá de la diarrea, son causados por su fase de infección sistémica. Generalmente, las bacterias viajan primero a los
25 intestinos y posteriormente a la corriente sanguínea, desde la que pueden migrar a los ganglios linfáticos, vesícula biliar, hígado, bazo y otras partes del cuerpo. Estos pacientes mostraron síntomas clásicos de dolencia avanzada, tales como fiebre alta, sensación de malestar general, dolor abdominal y, de manera significativa, una erupción clásica: "manchas rosadas", que son pequeñas manchas rojas en el abdomen y el tórax.

Tal como es típico en este entorno de práctica, no se realizaron pruebas de diagnóstico en estos pacientes más allá del examen físico general. Aunque estos pacientes no se ajustaron a los criterios de inclusión para el estudio de campo, se les proporcionó la composición del ejemplo 1B, a petición de los médicos que los atendían, por motivos compasivos.
30

El protocolo de inoculación estándar para pollos con tres vacunas disponibles en el mercado no incluía específicamente antígenos para *Salmonella*, por lo que sólo se esperaba una respuesta clínica limitada. Se predijo una mejoría leve debida a la neutralización de la endotoxina, con algún alivio asociado de los principales síntomas
35 diarreicos, pero sin efecto en el curso de la dolencia en sí.

Sorprendentemente, todos los pacientes con fiebre tifoidea que recibieron la composición del ejemplo 1B mostraron una mejora drástica en los síntomas de diarrea dentro de las 24 a 48 horas. Esta mejora parece estar más allá de lo que podría esperarse sólo por la neutralización de la endotoxina. Sin embargo, más sorprendente fue el hecho de que los síntomas sistémicos de la fiebre tifoidea en todos los casos también desaparecieron dentro del siguiente
40 período de 24 horas, dando como resultado un período de tiempo normal o casi normal de 48 a 72 horas. En la fiebre tifoidea, los síntomas generalmente mejoran en 2 a 4 semanas con tratamiento.

Ninguno de los pacientes mostró ninguna recaída o recurrencia de la dolencia durante el período de observación de la prueba de campo (5 días). Está bien establecido que los síntomas pueden reaparecer rápidamente si el
45 tratamiento no ha curado completamente la infección.

El tratamiento con la composición del Ejemplo 1B, una vez por día durante tres consecutivos fue suficiente para causar (junto con el tratamiento estándar) una reducción drástica en los síntomas de la dolencia, tanto GI como sistémicamente, en un período de tiempo notablemente corto. El marco temporal de la respuesta no se pudo explicar sólo por los efectos naturales o de "atención estándar".
50

En un intento por descubrir el origen de esta eficacia inesperada, se revisó cuidadosamente la historia completa del proceso de producción para ese lote. Se descubrió que, como parte de un protocolo de inoculación común, pero discrecional, para gallinas ponedoras comerciales, los pollos que se utilizaron se habían inoculado con la vacuna de la salmonela.
55

Aunque las aves fueron vacunadas como pollitos, se descubrió que la formulación era altamente eficaz contra *Salmonella typhi*. La salmonela no fue uno de los antígenos en el protocolo de inoculación utilizado para los pollos en las preparaciones del ejemplo 1. Se observó que la inesperada respuesta de estos pacientes con fiebre tifoidea a la composición de la presente divulgación fue muy sorprendente para los médicos asistentes durante la prueba de campo.
60

EJEMPLO 6. ELISA cuantitativo para IgY específica de huevo en polvo e IgY total.

5 La actividad de anticuerpos de IgY total y IgY específica antiantígeno se puede determinar utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) mediante una modificación del procedimiento de Liou et al., 2011, J. Anim. Veterinario. Adv., 10 (18): 2349-2356, tal como se describe a continuación.

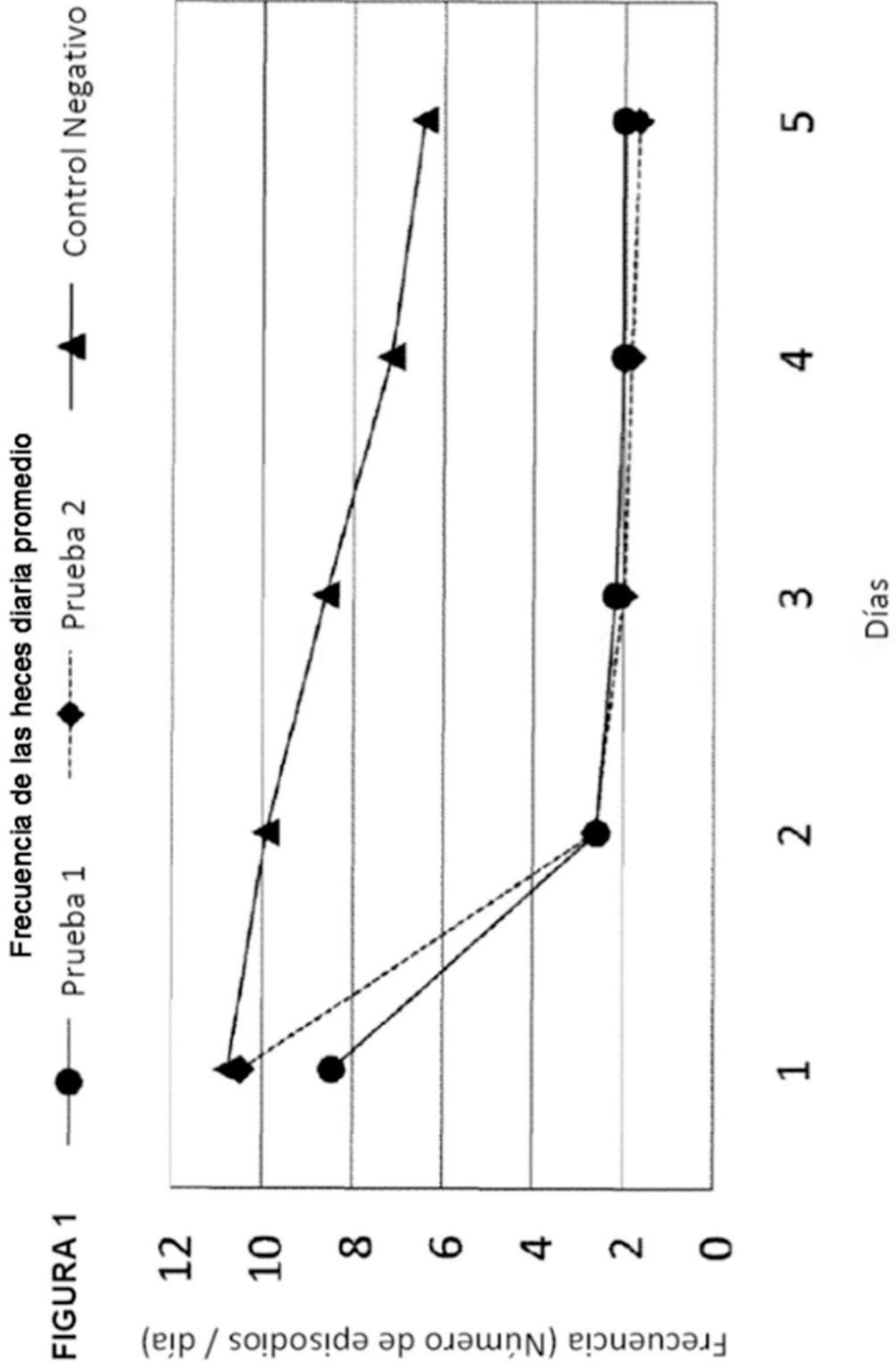
10 Las placas de microtitulación se recubren con 100 µl de preparación de mezcla de antígenos (10 µg por pocillo) o se recubren con 100 µl de anticuerpo IgY antipollo de conejo (10 µg/ml, Sigma-Aldrich), para los pocillos de control. La placa se incuba durante toda la noche a 4 °C. Después de lavar con tampón PBS-Tween 20, las placas se bloquean con BSA al 2 % y se incuban durante la noche a 4 °C. Posteriormente, los pocillos se lavan con PBS-Tween 20 y una vez con PBS. Posteriormente, se diluye en serie la solución madre de huevo seco diluida (10 mg/ml) con BSA al 1 % y se añade a los pocillos de muestra a 100 µl por pocillo. Los pocillos para la curva estándar se llenan con 100 µl de diluciones en serie de IgY estándar a, por ejemplo, a intervalos de concentración de, por ejemplo, 0,015-1 µg/ml y se incuban durante la noche a 4 °C. Después de lavar con tampón PBS-Tween 20, se añaden a los pocillos 100 µl de IgY antipollo de cabra conjugada con fosfatasa alcalina y se incuban 2 horas a 37 °C. Después de lavar con tampón PBS-Tween 20, se añaden a cada pocillo 100 µl de p-nitrofenil fosfato disódico como sustrato y se deja reaccionar durante 10 minutos a 37 °C. La absorbancia se mide a 405 nm utilizando un lector de placas. La absorbancia de las curvas estándar proporciona una medida relativa de la concentración específica de IgY antiantígeno.

20 Para la medición de IgY total, cada pocillo de la placa de microtitulación se reviste con anticuerpo IgY antipollo de conejo (10 µg/ml). Después de la incubación y el lavado tal como se ha indicado anteriormente, se añaden 100 µl de huevo seco diluido y el ensayo se realiza como anteriormente.

25

REIVINDICACIONES

1. Composición para su utilización en el tratamiento de la diarrea inducida por un patógeno o infecciones entéricas en un ser humano no neonatal, composición que comprende:
- 5 a) una cantidad eficaz en seres humanos no neonatales de moléculas de unión específicas que se unen específicamente a un antígeno, en la que las moléculas de unión específicas comprenden un grupo de IgY, derivado de pollos inmunizados, específicos para, como mínimo, *E. coli* spp. enterotoxigénica, factor de adherencia de pilios de *E. coli* K99, toxoide de *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, rotavirus y coronavirus; y,
- 10 b) una matriz portadora que comprende calostro bovino.
2. Composición para su utilización, según la reivindicación 1, en la que la matriz portadora es calostro bovino seco.
- 15 3. Composición para su utilización, según la reivindicación 1 o 2, en la que las moléculas de unión específicas comprenden una molécula de unión específica que se une a un patógeno seleccionado entre el grupo que comprende: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Salmonella enterica* serovar *Typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli*, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* hemorrágica, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio* O139, *Vibrios* no O1, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Helicobacter* enterohepático, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Gardnerella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydiaceae trachomatis*, *Mycoplasma* spp., *Campylobacter jejuni*, *Trichomonas vaginalis*, virus del herpes tipo 1, virus del herpes tipo 2, *Cándida albicans*, *Cándida glabrata*, *Cándida tropicalis*, *Cándida parapsilosis* y *Cándida krusei*, *Streptococcus* spp. del grupo A, rotavirus, coronavirus, norovirus, calicivirus, adenovirus entérico,
- 20 citomegalovirus, astrovirus, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, virus del herpes zóster, *Fusarium* spp. y *Acanthamoeba* spp.
- 25 4. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición es para el tratamiento de la diarrea del viajero, diarrea por rotavirus, diarrea mediada por toxinas, cólera, infección por *C. difficile*, disentería o fiebre tifoidea.
- 30 5. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende huevo inmune seco en polvo que contiene la molécula de unión específica.
- 35 6. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la matriz portadora es calostro bovino completo o está compuesta de calostro bovino no hiperinmune.
7. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que una dosis de la composición comprende de 1 g a 7 g de huevo inmune seco y de 1 g a 7 g de calostro bovino seco.
- 40 8. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un diluyente, un aglutinante, un excipiente, un lubricante, un edulcorante, un saborizante, un humectante o un absorbente farmacéuticamente aceptable.



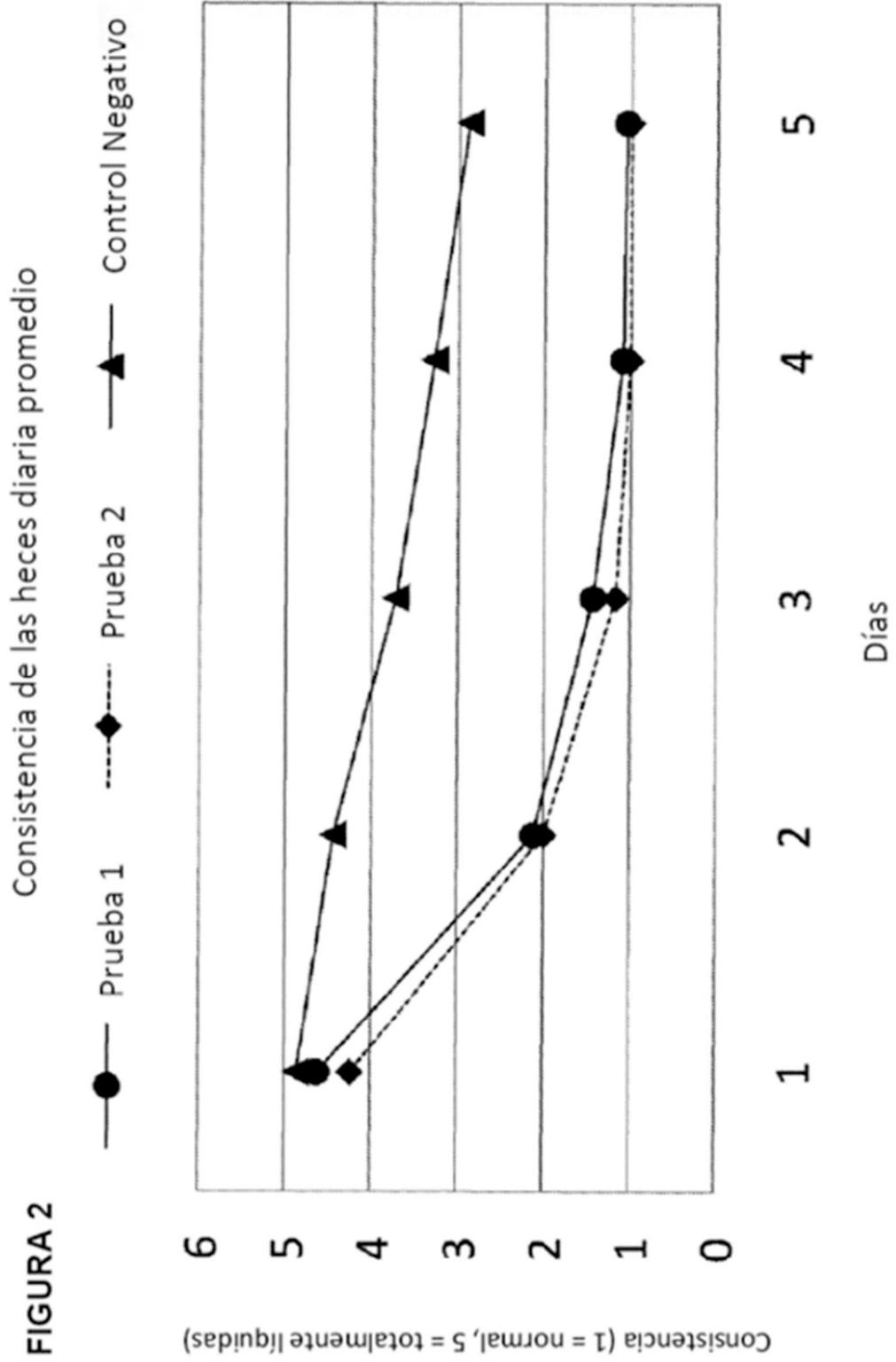
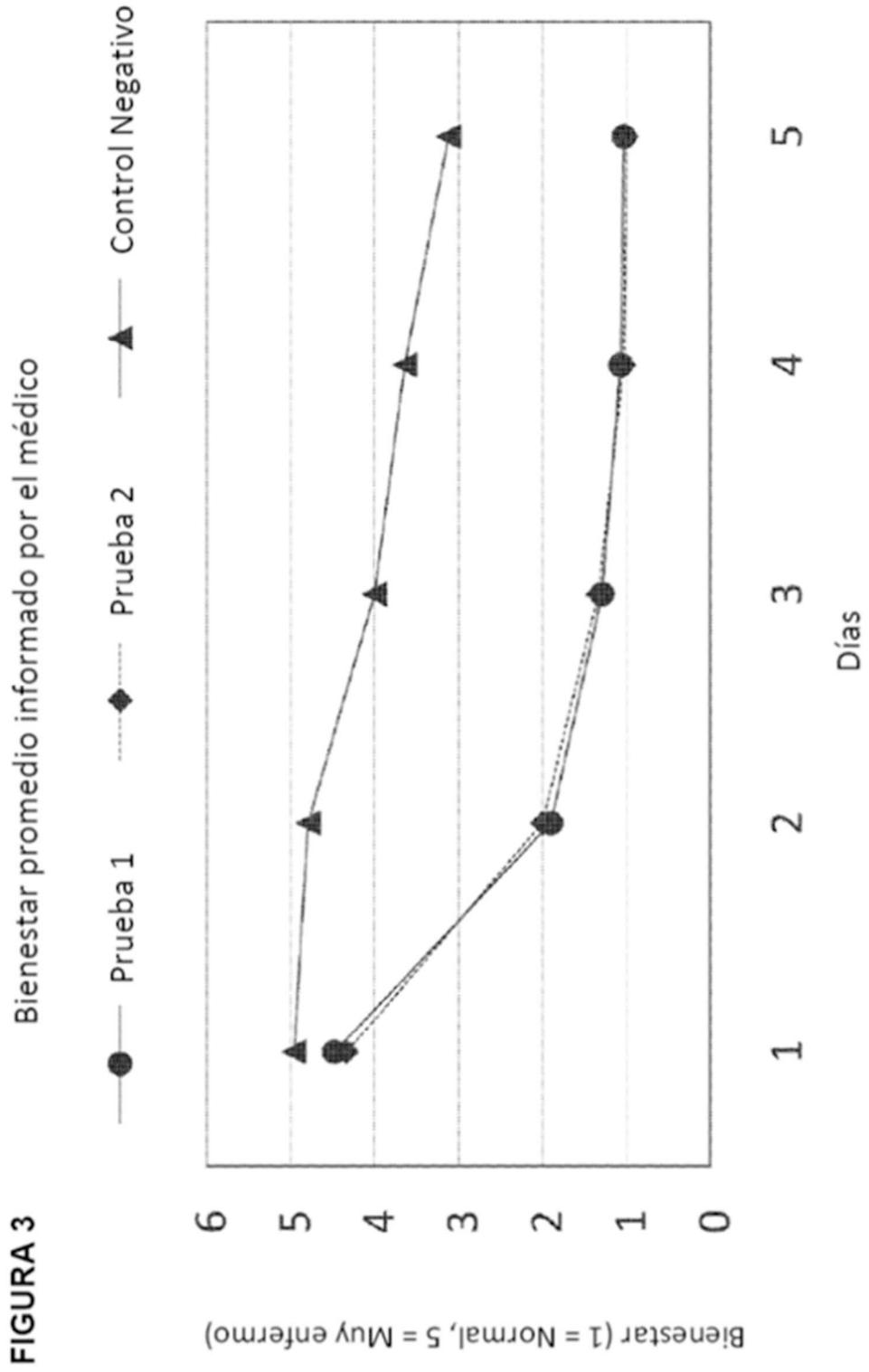
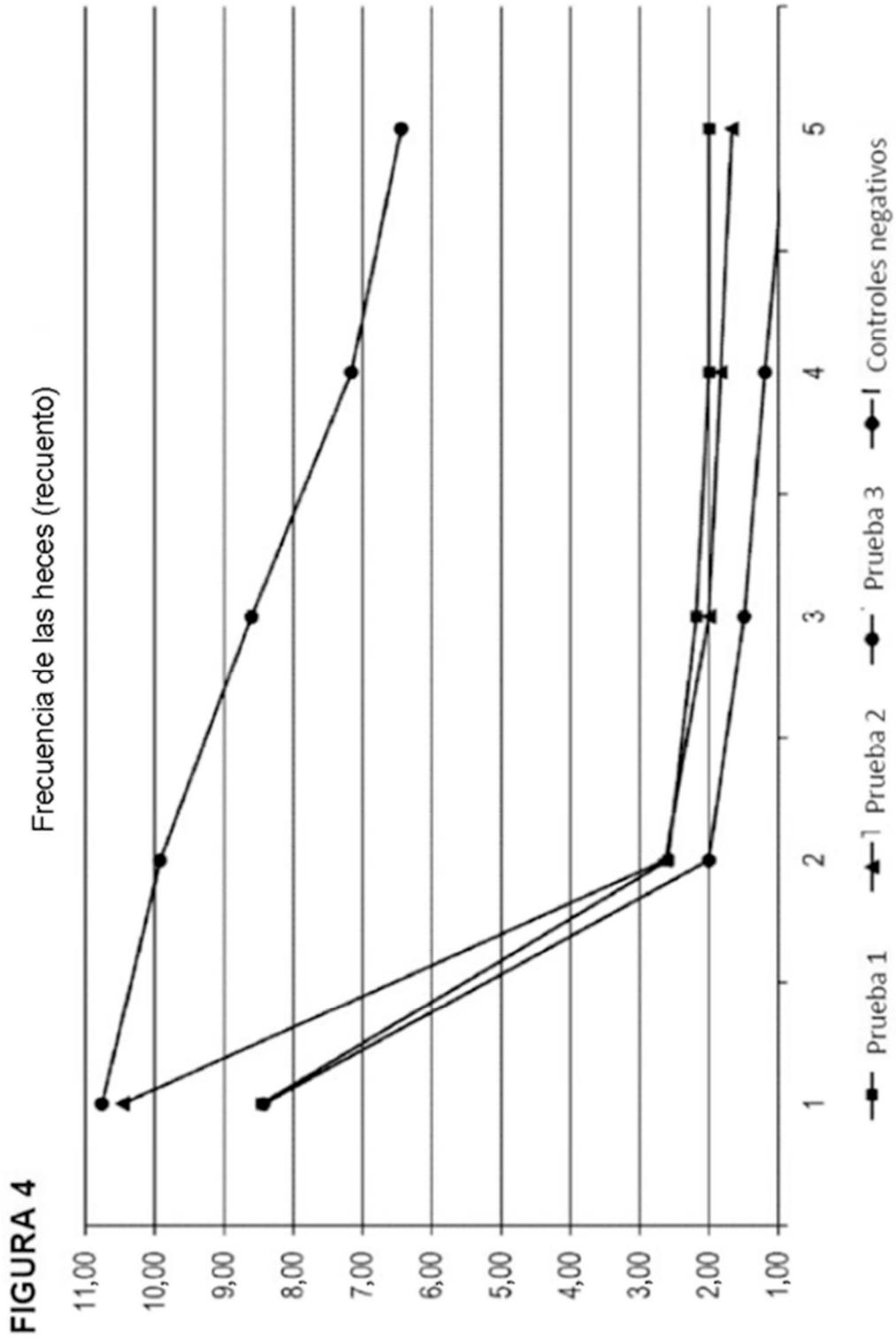
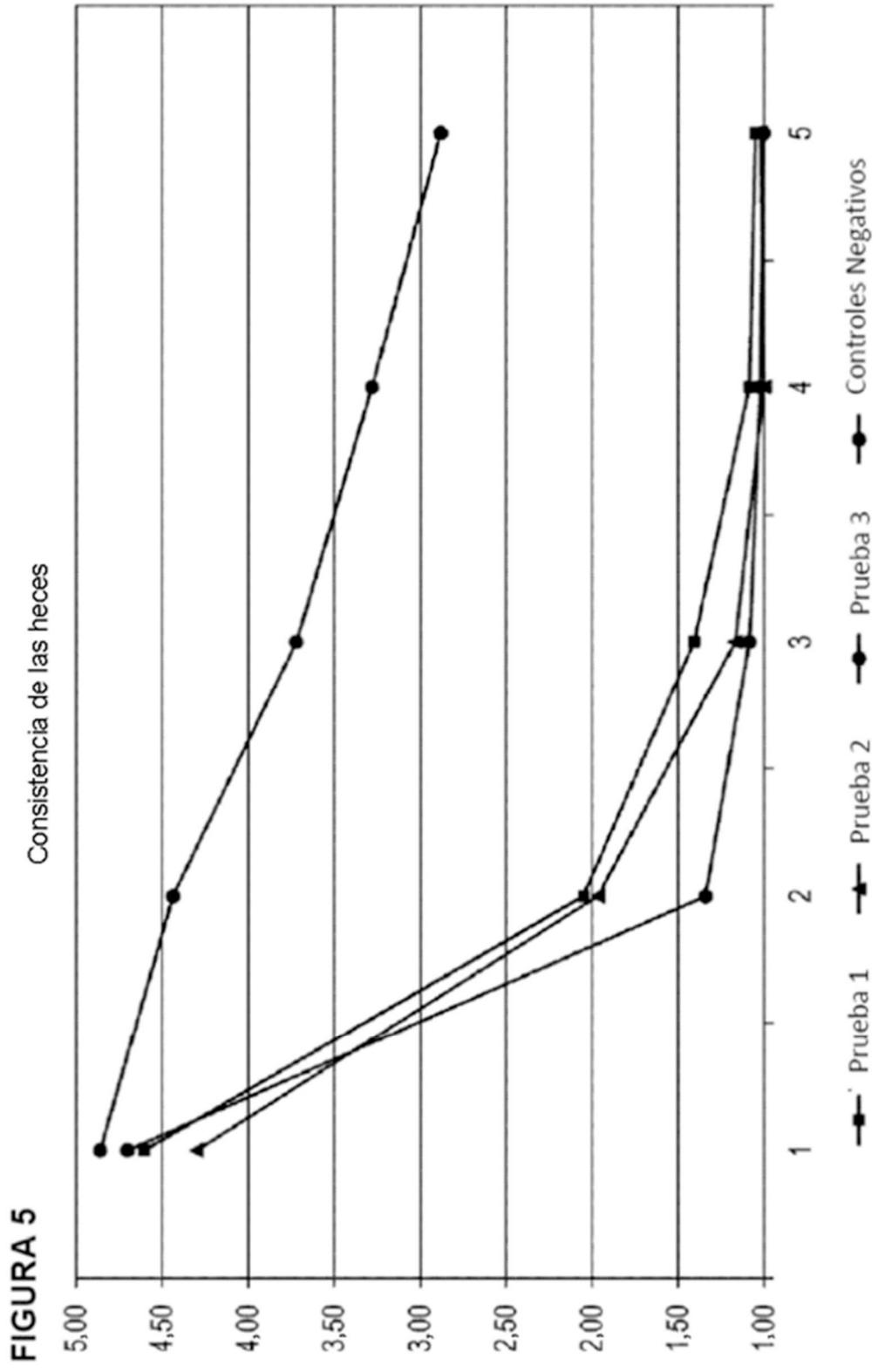
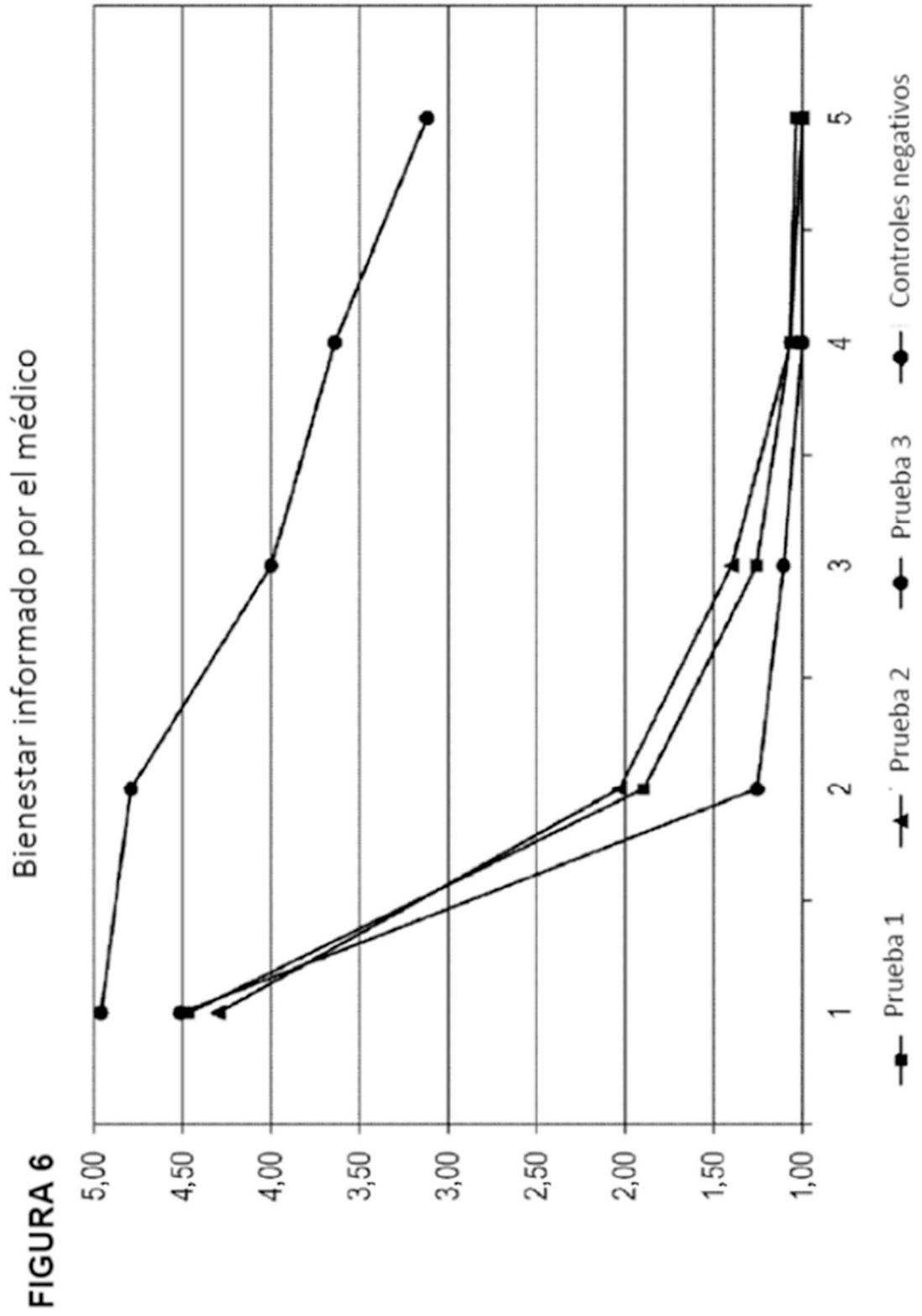


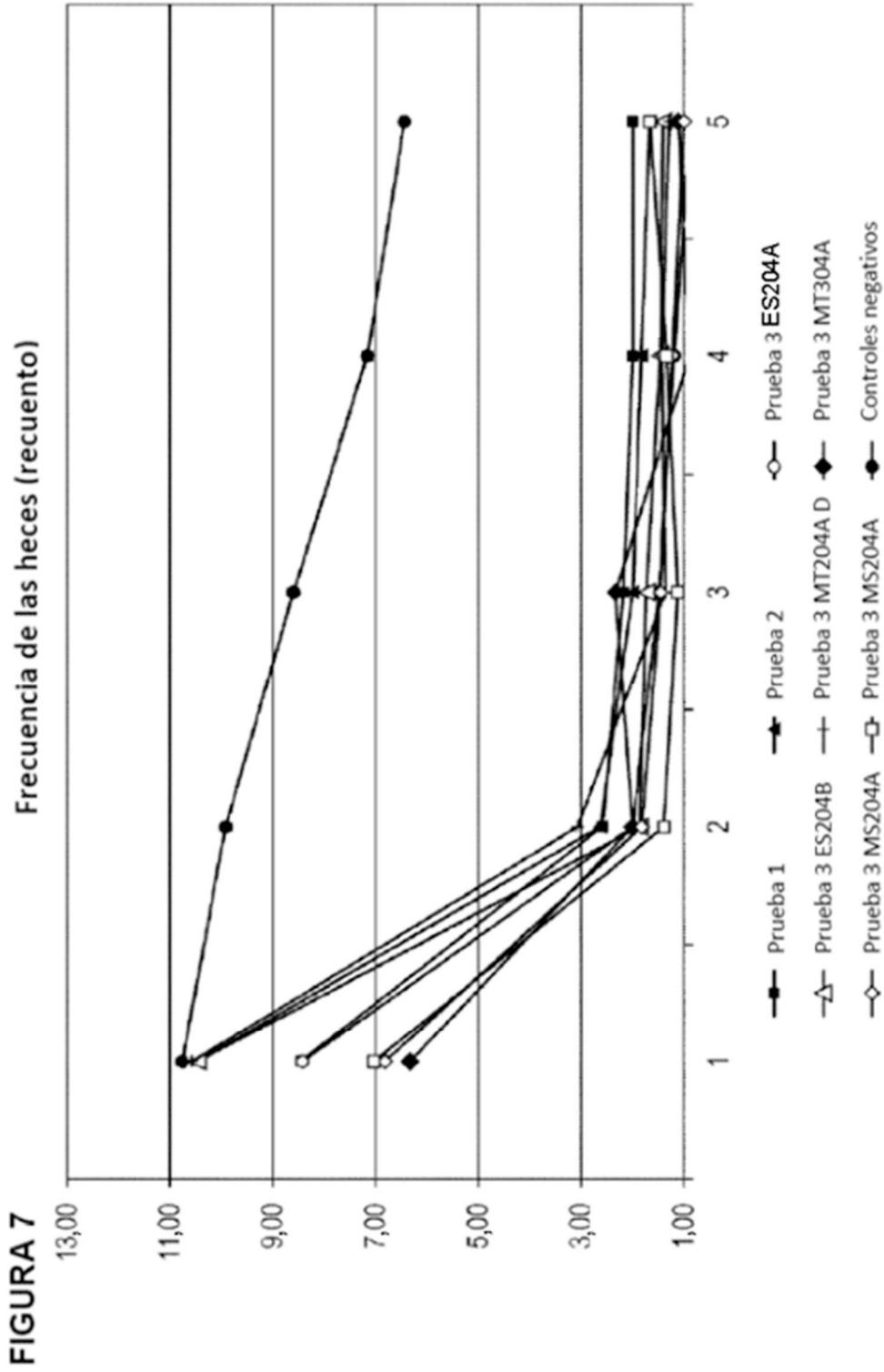
FIGURA 2

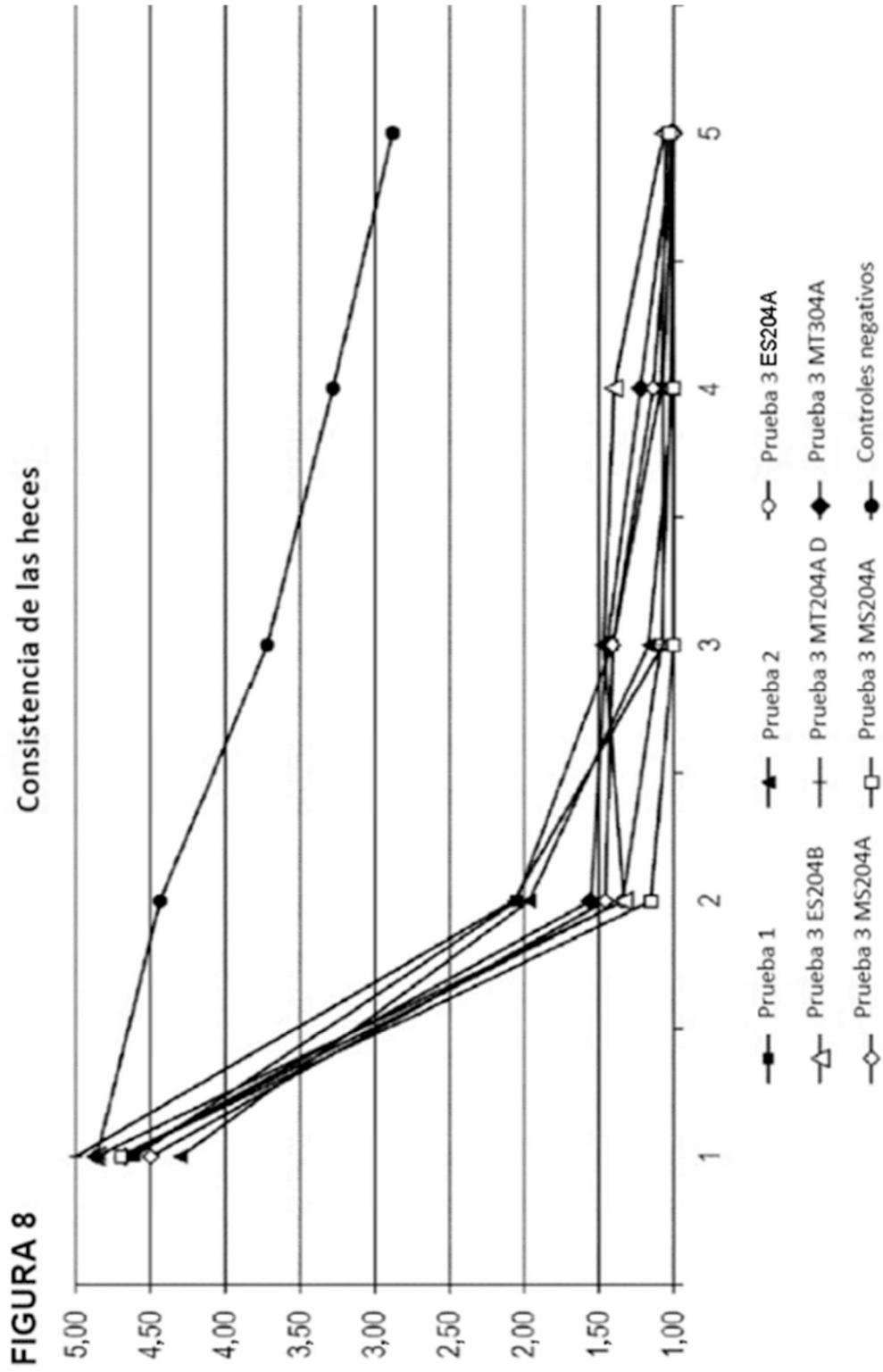


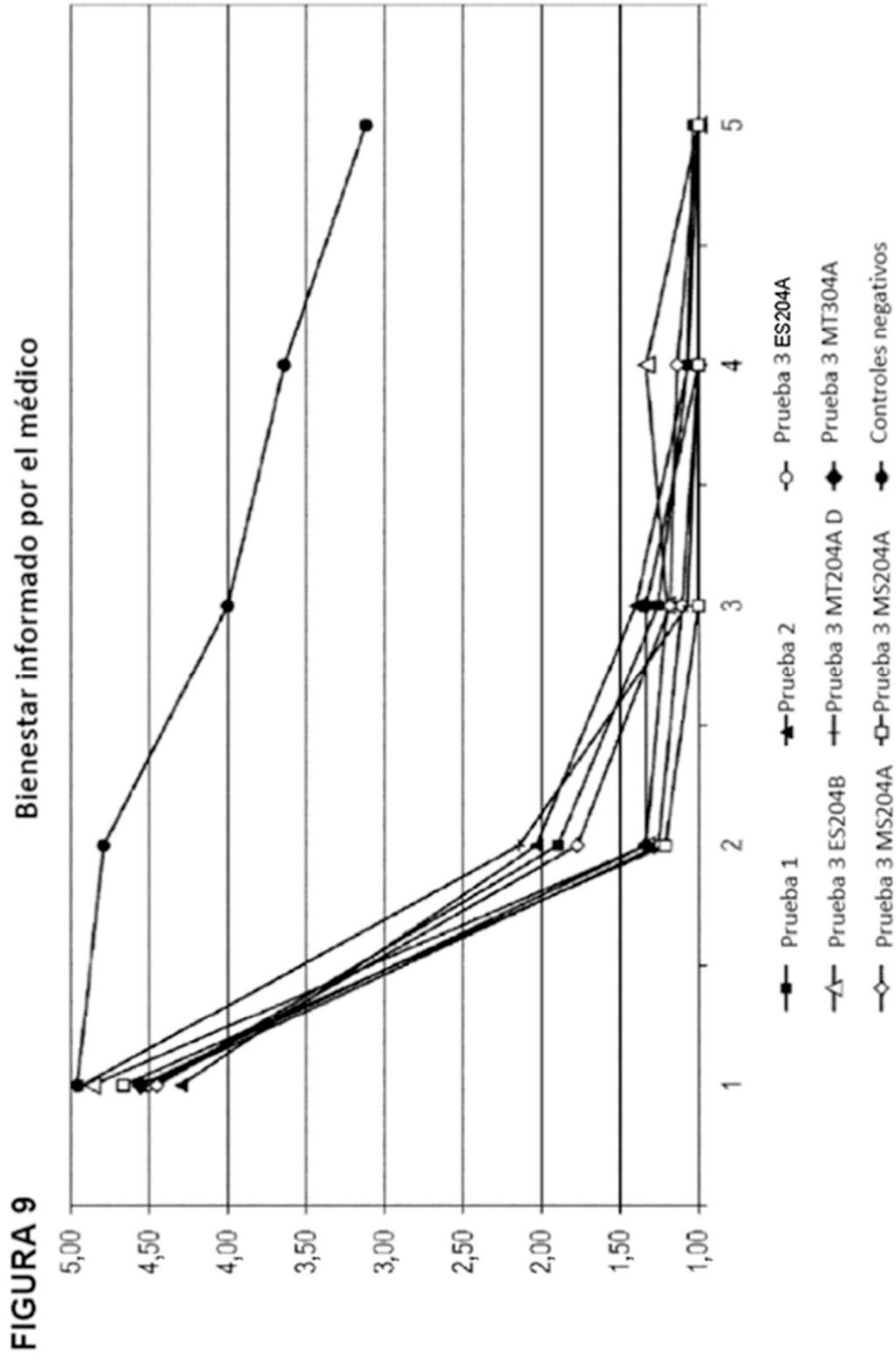












REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

10

- US 2007264264 A
- US 4376110 A
- US 58767 A
- US 5554372 A
- US 5876735 A
- US 4816567 A
- US 20080031903 A, Gambotto
- US 5846569 A
- US 6410058 B
- US 6475511 B
- US 6521277 B
- US 7875271 B
- US 4808415 A
- US 20100233162 A, Larsson
- US 20060134101 A, Larsson
- US 20030185856 A, Lee

Literatura no patente citada en la descripción

- better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote world health. **PRUSS-URSTUN et al.** Safer water. World Health Organization
- *Weekly Epidemiological Record*, 21 November 2008, vol. 83 (47)
- **HOLZHEIMER.** The significance of endotoxin release in experimental and clinical sepsis in surgical patients--evidence for antibiotic-induced endotoxin release?. *Infection*, March 1998, vol. 26 (2), 77-84
- Bacterial Endotoxin. **TODAR K.** Textbook of Bacteriology. 2008
- **BHUTTA et al.** Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, vol. 72 (6), 1516-22
- **BAHL R ; BHANDARI N ; SAKSENA M et al.** Efficacy of zinc-fortified oral rehydration solution in 6- to 35-month-old children with acute diarrhea. *J Pediatr*, 2002, vol. 141, 677-82
- **KOHLER et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497
- **YANG et al.** Crystalline antibodies for subcutaneous delivery. *PNAS*, 2003, vol. 100 (12), 6934-6939
- **KIRKPATRICK.** Structural nature and functions of transfer factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1993, vol. 685, 362-368
- **ALDER et al.** Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science*, 2005, vol. 310 (5756), 1970-1973
- **JOHN B. SULLIVAN ; GARY R. KRIEGER.** Clinical Environmental Health and Toxic Exposures. Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 1040
- **FRICKER.** *Children in the Tropics, Putting an end to diarrheal diseases*, 1993, 1-66
- **DASILVA et al.** IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunol. Immunopath.*, 2010, vol. 135, 173-180
- **OSUGA et al.** Egg Proteins: In Food Proteins. AVI Pub. Co, 1977
- **MARTIN et al.** *Can J. Biochem. Physiol.*, 1957, vol. 35, 241
- **MARTIN et al.** *Can. J. Biochem Physiol.*, 1958, vol. 36, 153
- **JENSENIUS et al.** *J. Immunol. Methods*, 1981, vol. 46, 63
- **BADE et al.** *J. Immunol. Methods*, 1984, vol. 72, 421
- **POISON et al.** *Immunol. Invest.*, 1985, vol. 14, 323
- **HASSL et al.** *J. Immunol. Methods*, 1988, vol. 110, 225
- **HATTA et al.** *Agric. Biol. Chem.*, 1990, vol. 54, 2531
- **VAN REGENMORTEL, M. H. V.** Eggs as protein and antibody factories. In *Proceedings of the European Symposium on the Quality of Poultry Meat*, 1993, 257-263
- **KOHLER et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495
- **GODING.** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986, 59-103
- **MUNSON et al.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220
- **SKERRA et al.** *Curr. Opinion in Immunol.*, 1993, vol. 5, 256-262
- **PLÚCKTHUN.** *Immunol. Revs.*, 1992, vol. 130, 151-188
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554

15

- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597
- **MARKS et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783
- **WATERHOUSE et al.** *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851
- **LLOYD ; SOULSBY.** The role of IgA immunoglobulin in the passive transfer of protection to *Taenia taeni-aeformis* in the mouse. *Immunology*, vol. 34, 939-945
- **SCHEKELS et al.** Biochemical composition of human saliva in relation to other fluids. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1995, vol. 6 (2), 161-175
- **VARSHNEY et al.** Therapeutic value of bovine saliva in wound healing: a histomorphological study. *Indian J. Biol.*, May 1997, vol. 35 (5), 535-7
- **SARKER et al.** Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, 2001, vol. 32, 19-25
- **LIOU et al.** *J. Anim. Vet. Adv.*, 2011, vol. 10 (18), 2349-2356