

PRODUCTO DE HUEVO HIPERINMUNIZADO PARA EL TRATAMIENTO O LA PREVENCIÓN DE LA HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA Y LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA EL HOSPEDERO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 63/175,603, presentada el 16 de abril de 2021, el contenido de la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 El Listado de Secuencias asociado a esta solicitud se archiva en formato electrónico mediante EFS-WEB y se incorpora como referencia en la memoria descriptiva en su totalidad. El nombre del archivo de texto que contiene el Listado de Secuencias es 131331_00320_Sequence_Listing. El tamaño del archivo de texto es de 1004 bytes y el archivo de texto fue creado el 14 de abril de 2022.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 La enfermedad hepática alcohólica (ALD, por sus siglas en inglés) abarca las manifestaciones hepáticas del consumo excesivo de alcohol, que incluyen hígado graso, hepatitis alcohólica y hepatitis crónica con fibrosis hepática o cirrosis. La forma más grave de enfermedad hepática alcohólica es la hepatitis alcohólica; la mortalidad está en el rango de 20 % a 40 % a los 1-6 meses, y hasta 75 % de los pacientes mueren dentro de los 90 días posteriores al diagnóstico
- 20 de hepatitis alcohólica grave. Ver Duan, *et al.*, 2019, *Nature* 575: 505-511. La terapia con corticosteroides es solamente marginalmente efectiva. El trasplante hepático temprano es la única terapia curativa, pero se ofrece solamente en centros seleccionados y a un grupo limitado de pacientes. Ver Duan, *et al.*, citado anteriormente.

- 25 La enfermedad de injerto contra el hospedero (GVHD, por sus siglas en inglés) afecta la piel, el hígado y el tracto gastrointestinal, y ocurre cuando las células T del donador reconocen el tejido receptor como extraño y desencadenan inflamación y lesión en el tejido. Las estrategias preventivas y terapéuticas para la GVHD son áreas activas de investigación. Ver Garrett, 2020, *New England Journal of Medicine* 382(11): 1064-1066. Por consiguiente, existe la necesidad de mejorar los métodos para tratar o prevenir la ALD y la GVHD.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En ciertos aspectos, la divulgación se relaciona con un método para prevenir o tratar la hepatopatía alcohólica en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto de huevo hiperinmunizado obtenido de un animal productor de huevos, previniendo o tratando así la enfermedad hepática alcohólica en el sujeto, en donde el producto de huevo hiperinmunizado comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos contra un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*.

En ciertos aspectos, la divulgación se relaciona con un método para prevenir o tratar la enfermedad de injerto contra el hospedero en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto de huevo hiperinmunizado obtenido de un animal productor de huevos, previniendo o tratando así la enfermedad de injerto contra el hospedero en el sujeto, en donde el producto de huevo hiperinmunizado comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos contra un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*.

En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos contra *Enterococcus faecalis*, y una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. En ciertas modalidades, el método comprende además hiperinmunizar el animal productor de huevos con un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*. En ciertas modalidades, el método comprende además recolectar un huevo hiperinmunizado del animal productor de huevos que se hiperinmunizó, y preparar un producto de huevo hiperinmunizado a partir del huevo hiperinmunizado. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende al menos 20 % más en peso de un anticuerpo IgY (por sus siglas en inglés) específico de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium* en relación con un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto 1 a 4 veces por día. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra por vía oral o intravenosa. En ciertas modalidades, la administración del producto de huevo hiperinmunizado al sujeto reduce el

nivel de *Enterococcus faecalis* en el sujeto en relación con un sujeto al cual no se le administra el producto de huevo hiperinmunizado. En ciertas modalidades, la administración del producto de huevo hiperinmunizado al sujeto reduce la lesión hepática en el sujeto en relación con un sujeto al cual no se le administra el producto de huevo hiperinmunizado. En ciertas modalidades, el sujeto es un humano.

En ciertos aspectos, la divulgación se relaciona con un huevo hiperinmunizado producido por un animal que se hiperinmunizó con un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*, en donde el nivel de anticuerpos contra el antígeno en el huevo hiperinmunizado aumenta en relación con un huevo de un animal que no se hiperinmunizó. En ciertas modalidades, el animal se hiperinmunizó con *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*, y en donde el nivel de anticuerpos contra *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis* aumenta en relación con un huevo de un animal que no se hiperinmunizó.

En ciertos aspectos la divulgación se relaciona con un producto de huevo hiperinmunizado obtenido de un huevo hiperinmunizado descrito en la presente. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado es el huevo completo. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado es la yema de huevo. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado es un anticuerpo IgY purificado o parcialmente purificado contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado es un anticuerpo IgY purificado o parcialmente purificado contra *Enterococcus faecalis*. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado consiste en anticuerpos IgY purificados o parcialmente purificados contra *Enterococcus faecalis* y anticuerpos IgY purificados o parcialmente purificados contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*.

En ciertos aspectos la divulgación se relaciona con una composición farmacéutica que comprende el producto de huevo hiperinmunizado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19 y un portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades, la composición comprende de 3 a 10 gramos del huevo completo. En ciertas modalidades, la composición comprende de 1 a 3 gramos de la yema de huevo. En ciertas modalidades, la composición comprende de 0,5 a 1 gramo de IgY purificada o parcialmente purificada. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica se formula para la administración oral. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se formula en nanopartículas o en una

emulsión. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica se formula para la administración intravenosa.

En ciertos aspectos, la divulgación se relaciona con un método para preparar un producto de huevo hiperinmunizado que comprende: i) hiperinmunizar un animal productor de
5 huevos con un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*; y ii) preparar un producto de huevo hiperinmunizado a partir de uno o más huevos producidos por el animal. En ciertas modalidades, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*. En ciertas modalidades, el
10 antígeno se selecciona del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*. En ciertas modalidades, el antígeno comprende *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*. En ciertas modalidades, el animal productor de huevos es una gallina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 La **Figura 1** muestra un esquema de un experimento para evaluar los anticuerpos IgY anti-*Enterococcus faecalis* y anti-citolisina en un modelo de ratón con enfermedad hepática alcohólica.

La **Figura 2** muestra la pureza de los anticuerpos IgY anti-*Enterococcus faecalis* y anti-citolisina analizados por electroforesis SDS-PAGE (por sus siglas en inglés). IgY tiene un peso
20 molecular de 180 kDa y se compone por dos subunidades, una cadena pesada de 67 kDa y una cadena ligera de 23 kDa, la línea 1 es un marcador de peso marcador, la línea 2 es un estándar de IgY, las líneas 3 y 4 son 1 µg y 2 µg, respectivamente, de la proteína soluble total de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas con *Enterococcus faecalis* y citolisina.

La **Figura 3A** muestra la actividad específica para *Enterococcus faecalis* de IgY de
25 gallinas inmunizadas con *Enterococcus faecalis* + citolisina. La **Figura 3B** muestra la actividad específica para la citolisina de IgY de gallinas inmunizadas con *Enterococcus faecalis* + citolisina. Se usó IgY de gallinas no inmunizadas como control de IgY. La actividad específica se representa por la reactividad y el título del anticuerpo.

La **Figura 4** muestra los efectos inhibitorios de IgY anti-*Enterococcus faecalis* y anti-citolisina sobre el crecimiento de *E. faecalis*. Las bacterias *E. faecalis* no tratada y completa,
30 tratadas con 15 mg/mL de IgY se incubaron por 24 h de incubación a 37 °C. Los cultivos se

diluyeron en serie, se diluyeron 10^4 veces y se platearon en placas de agar BHI (por sus siglas en inglés). Después de la incubación durante la noche, las colonias se contaron usando el software ImageJ Count.

La **Figura 5** muestra la cuantificación de UFC/mL en cultivos de *E. faecalis* no tratados y tratados con IgY anti-*Enterococcus faecalis* + anti-citolisina. Se calculó el porcentaje de inhibición.

Las **Figuras 6A-6E** muestran los efectos de la administración de IgY anti-*Enterococcus faecalis* + anti-citolisina en ratones gnotobióticos sometidos al modelo de alimentación de etanol crónico por atracón. Los ratones libres de gérmenes 6 se colonizaron con heces de un paciente humano con hepatitis alcohólica y se sometieron al modelo de alimentación de etanol crónico por atracón ($n = 5$ por grupo), y se les administró un vehículo, control de IgY, e IgY anti-*Enterococcus faecalis* + anti-citolisina en la dieta líquida. (A) Ingesta de alimentos. (B) Peso corporal (C) Peso hepático. (D) Nivel sérico de alanina aminotransferasa (ALT, por sus siglas en inglés). (E) contenido de triglicéridos hepáticos (TAG, triacilglicerol, por sus siglas en inglés). Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM. Los valores de P se determinaron por ANOVA unidireccional con prueba post-hoc de Tukey. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$.

La **Figura 7** muestra los efectos de la administración de IgY anti-*Enterococcus faecalis* + anti-citolisina en los hígados de ratones gnotobióticos sometidos al modelo de alimentación de etanol crónico por atracón. Los ratones libres de gérmenes 6 se colonizaron con heces de un paciente con hepatitis alcohólica con citolisina positiva y se sometieron al modelo de alimentación de etanol crónico por atracón ($n = 5$ por grupo), y se les administró un vehículo, control de IgY, e IgY anti-*Enterococcus faecalis* + anti-citolisina en la dieta líquida. Se muestran cortes hepáticos representativos después de la tinción con hematoxilina y eosina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término “hiperinmunización” significa la exposición repetida a uno o más antígenos de modo tal que una respuesta inmunitaria se eleva y se mantiene por encima del estado natural no expuesto.

Un “estado hiperinmunitario” se refiere a una respuesta inmunitaria elevada en un animal productor de huevos que se hiperinmunizó.

El término “huevo” como se usa en la presente se refiere a un huevo completo (de mesa, hiperinmunizado o de otro modo). El término “producto de huevo” como se usa en la

presente se refiere a un huevo completo o cualquier producto o fracción obtenida de un huevo completo. En una modalidad particular, el producto de huevo es una yema de huevo, por ejemplo, una yema de huevo en polvo. En otra modalidad, el producto de huevo es una clara de huevo, por ejemplo, una de clara de huevo en polvo. En otra modalidad, el producto de huevo se obtiene de un huevo completo, por ejemplo, un huevo completo en polvo (por ejemplo, un huevo completo secado por aspersión).

El término “huevo de control” se refiere a un huevo obtenido de un productor de huevos que no se mantiene en un estado hiperinmunizado, es decir, un animal que no se hiperinmunizó. El término “producto de huevo de control” se refiere a un huevo de control o a un producto de huevo obtenido de un huevo de control.

El término “huevo hiperinmunizado” se refiere a un huevo completo obtenido de un animal productor de huevos mantenido en un estado hiperinmunitario, es decir, un animal productor de huevos que se hiperinmunizó.

El término “producto de huevo hiperinmunizado” se refiere a un huevo hiperinmunizado o a cualquier producto obtenido de un huevo hiperinmunizado. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado es un concentrado. Como se usa en la presente, el término “concentrado” se refiere a un producto de huevo hiperinmunizado que está al menos parcialmente purificado, de modo tal que la concentración de anticuerpos en el concentrado es mayor que la concentración de anticuerpos en un huevo hiperinmunizado.

El término “huevo en polvo” se refiere a un huevo completo que se ha secado. En algunas modalidades, el huevo en polvo se seca por aspersión.

El término “animal productor de huevos” significa cualquier animal ovíparo, e incluye a cualquier animal que pone huevos, tales como aves, peces y reptiles.

El término “ave” se refiere a un animal que es miembro de la clase Aves. Las aves incluyen, pero no se limitan a, gallinas, pavos, gansos, patos, faisanes, codornices, palomas, y avestruces.

El término “niveles supranormales” significa niveles que exceden los que se encuentran en los huevos de animales productores de huevos que no se hiperinmunizan. Por ejemplo, los niveles supranormales de un anticuerpo contra un antígeno en particular son niveles del anticuerpo que exceden los que se encuentran en huevos de animales productores de huevos que no se hiperinmunizan con el antígeno en particular.

El término “administrar” significa cualquier método para proporcionar a un sujeto una sustancia, que incluye por vía oral, intranasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, o subcutáneo), rectal, tópico o intraocular.

5 El término “antígeno” se refiere a una sustancia que es capaz de inducir un anticuerpo humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por células en lugar de tolerancia inmunológica. El término significa la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria así como reaccionar con los productos de la misma, por ejemplo, un anticuerpo.

10 Como se usa en la presente, un “anticuerpo” es una proteína que incluye al menos un región determinante de complementariedad que se une a un antígeno de objetivo específico, por ejemplo, un antígeno de *Enterococcus faecalis*, de la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*, o un antígeno de *Enterococcus faecium* divulgado en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en la presente como VH, por sus siglas en inglés) y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada en la presente como VL, por sus siglas en inglés). En otro ejemplo, un anticuerpo
15 incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). En una modalidad particular, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. El término “anticuerpo policlonal”, como se usa en la presente, se refiere a una población de moléculas de anticuerpos que son capaces de inmunorreaccionar con diferentes epítomos sobre un antígeno en particular. En una modalidad particular, el anticuerpo es un anticuerpo de IgY.

20 Como se usa en la presente, los términos “enfermedad hepática alcohólica”, “ALD”, “enfermedad hepática asociada al alcohol” y “enfermedad hepática relacionada con el alcohol” se refieren a las manifestaciones hepáticas del consumo excesivo de alcohol, que incluye hígado graso (esteatosis), hepatitis alcohólica y hepatitis crónica con fibrosis hepática o cirrosis. Los “trastornos relacionados con el alcohol” como se usan en la presente se refiere a
25 las enfermedades y trastornos relacionados con el consumo de alcohol e incluyen, pero no se limitan a, trastorno psicótico inducido por el alcohol, con delirios; abuso de alcohol; consumo excesivo de alcohol; beber pesado; problema de bebida; intoxicación alcohólica; abstinencia alcohólica; delirio de intoxicación alcohólica; delirio de abstinencia alcohólica; demencia persistente inducida por el alcohol; trastorno amnésico persistente inducido por el alcohol;
30 dependencia al alcohol; trastorno psicótico inducido por el alcohol, con alucinaciones; trastorno del estado de ánimo inducido por el alcohol; trastorno bipolar inducido por el alcohol o asociado; trastorno de estrés postraumático inducido por el alcohol o asociado; trastorno de ansiedad inducida por el alcohol; disfunción sexual inducida por el alcohol; trastorno del sueño

inducido por el alcohol; y trastorno relacionado con el alcohol no especificado (NOS, por sus siglas en inglés).

El término “abusador del alcohol”, como se usa en la presente, se refiere a un sujeto que cumple con los criterios del DSM IV para el abuso del alcohol (es decir, “uso repetido a pesar de las consecuencias adversas recurrentes”) pero no depende del alcohol.

El término “bebedor excesivo”, como se usa en la presente, se refiere a hombres que beben más de 21 bebidas estándar por semana y a mujeres que consumen más de 14 bebidas estándar por semana. Una bebida estándar es 15 mL [0,5 onzas] de alcohol absoluto, equivalente a 300 mL [10 onzas] de cerveza, 120 mL [4 onzas] de vino o 30 mL [1 onza] de licor de 50 % en volumen de alcohol [100 grados proof]. Estas personas no dependen del alcohol, pero pueden o no cumplir con los criterios del DSM IV para el abuso del alcohol.

El término “bebedor pesado”, como se usa en la presente, se refiere a los hombres que beben más de 14 bebidas estándar por semana y a las mujeres que consumen más de 7 bebidas estándar por semana. Estas personas no dependen del alcohol, pero pueden o no cumplir con los criterios del DSM IV para el abuso del alcohol.

Como se usa en la presente, el término “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” como se usa en la presente se refiere a la cantidad de producto de huevo hiperinmunizado que cuando se administra a un sujeto es suficiente para prevenir o tratar un trastorno, por ejemplo, enfermedad hepática alcohólica (ALD) o enfermedad de injerto contra el hospedero (GVHD). La cantidad efectiva puede variar dependiendo, por ejemplo, de la edad, el peso y/o la salud del sujeto a tratar.

El término “aislado” como se usa en la presente se refiere a un compuesto biológico (por ejemplo, una proteína) que se purifica o purifica parcialmente de la célula en la cual se produjo. Por ejemplo, una toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis* se purifica o se purifica parcialmente de la célula de *Enterococcus faecalis* en la cual se produjo. En algunas modalidades, la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis* es una toxina citolisina recombinante de *Enterococcus faecalis*, por ejemplo, una toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* que se produce en una célula que no es una célula de *Enterococcus faecalis*.

Enfermedad hepática alcohólica (ALD)

El ochenta por ciento del alcohol pasa a través del hígado para ser desintoxicado. El consumo crónico de alcohol produce la secreción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo,

TNF-alfa (por sus siglas en inglés), Interleucina-6 e Interleucina-8), estrés oxidativo, peroxidación lipídica, y toxicidad por acetaldehídos. Estos factores causan inflamación, apoptosis y, finalmente, fibrosis de las células hepáticas, lo que lleva a la enfermedad hepática alcohólica (ALD). La ALD incluye hígado graso (esteatosis), hepatitis alcohólica y hepatitis crónica con fibrosis hepática o cirrosis.

El hígado graso, o esteatosis, es la acumulación de ácidos grasos en las células hepáticas. El consumo excesivo de alcohol causa el desarrollo de grandes glóbulos grasos (esteatosis macrovesicular) en todo el hígado. El alcohol se metaboliza por el alcohol deshidrogenasa (ADH, por sus siglas en inglés) en acetaldehído, posteriormente se metaboliza por la aldehído deshidrogenasa (ALDH, por sus siglas en inglés) en ácido acético, que finalmente se oxida en dióxido de carbono y agua. Este proceso genera NADH y aumenta la relación NADH/NAD⁺. Una concentración más alta de NADH induce la síntesis de ácidos grasos, mientras que una disminución del nivel de NAD resulta en una disminución de la oxidación de ácidos grasos. Subsecuentemente, los niveles más altos de ácidos grasos indican a las células hepáticas que lo componen al glicerol para formar triglicéridos. Estos triglicéridos se acumulan, lo que resulta en el hígado graso.

La hepatitis alcohólica se caracteriza por la inflamación de los hepatocitos, que parece predisponer al hígado a la fibrosis por las citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 e IL-8) se consideran esenciales en el inicio y perpetuación de la lesión hepática al inducir apoptosis y necrosis. Un posible mecanismo para el aumento de la actividad del TNF- α es el aumento de la permeabilidad intestinal debido a la enfermedad hepática. Esto facilita la absorción de la endotoxina producida por el intestino en la circulación portal. Las células Kupffer del hígado posteriormente fagocitan la endotoxina, estimulando la liberación de TNF- α . El TNF- α posteriormente desencadena las rutas apoptóticas a través de la activación de caspasas, lo que resulta en la muerte de las células hepáticas.

La cirrosis es una etapa tardía de la enfermedad hepática grave marcada por inflamación (hinchazón), fibrosis (endurecimiento celular) y membranas dañadas que impiden la desintoxicación de sustancias químicas en el cuerpo, terminando en cicatrices y necrosis (muerte celular). El acetaldehído puede ser responsable de la fibrosis inducida por el alcohol al estimular la deposición de colágeno por las células estrelladas hepáticas. La producción de oxidantes derivados de la NADPH oxidasa y/o el citocromo P-450 2E1 y la formación de aductos acetaldehído-proteína dañan la membrana celular. Los síntomas incluyen ictericia (amarilleo), agrandamiento del hígado, y dolor y sensibilidad por los cambios estructurales en

la arquitectura hepática dañada. Sin la abstinencia total del consumo de alcohol, la cirrosis eventualmente llevará a la insuficiencia hepática.

La enfermedad hepática crónica debida al consumo de alcohol trastorno contribuye notablemente a la carga mundial de enfermedades y mortalidad. La forma más grave de enfermedad hepática relacionada con el alcohol es la hepatitis alcohólica (AH, por sus siglas en inglés); la mortalidad está en el rango de 20 % a 40 % a los 1-6 meses. Recientemente se demostró que la enfermedad es más grave en un subgrupo de pacientes con hepatitis alcohólica (aproximadamente 30 %) que portan *Enterococcus faecalis* que produce una toxina llamada citolisina. Mientras que *E. faecalis* está presente en el microbioma de personas no alcohólicas en un nivel bajo, en aproximadamente 0,1-0,5 % del microbioma de la persona, en pacientes que tienen enfermedad hepática alcohólica (ALD) su abundancia se amplía grandemente a aproximadamente 5 %. Setenta y cinco por ciento de los pacientes con hepatitis alcohólica cuyo microbioma es abundante en *E. faecalis* positiva para citolisina mueren dentro de los 90 días siguientes al diagnóstico de hepatitis alcohólica grave (Maddrey, *et al.*, 1978, *Gastroenterology* 75, 193-199). La terapia estándar con corticosteroides es solamente marginalmente efectiva (Thursz, *et al.*, 2015, *N. Engl. J. Med.* 372, 1619-1628). El trasplante temprano de hígado y la abstinencia de alcohol es la única terapia efectiva, pero solamente está disponible para un grupo limitado de pacientes (Mathurin, *et al.*, 2012, Management of alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* 56, S39-S45).

Duan, *et al.* (2019, *Nature* 575:505-511) han demostrado la efectividad de los bacteriófagos que se dirigen a *E. faecalis* positiva para citolisina en ratones humanizados que se colonizaron con bacterias con heces de pacientes con hepatitis alcohólica, en prevenir la progresión de la enfermedad. Se demostró que el tratamiento con bacteriófagos que lisa la *E. faecalis* positiva para citolisina disminuye la citolisina en el hígado y previene la progresión de la enfermedad hepática inducida por etanol en estos ratones humanizados.

Enfermedad de injerto contra el hospedero (GVHD)

La GVHD es una complicación importante después del trasplante de órganos sólidos y células madre, tales como las que ocurren con los trasplantes de médula ósea. Los glóbulos blancos del sistema inmunitario del donador que permanecen dentro del tejido donado (el injerto) reconocen al receptor (el hospedero) como extraño. Los glóbulos blancos presentes dentro del tejido trasplantado atacan las células del cuerpo del receptor, lo que conduce a la GVHD. Ver Hoffmann, *et al.*, 2002, *J. Exp. Med.* 196(3): 389-399. La GVHD puede ocurrir en formas aguda y crónica. La forma aguda de la enfermedad se observa normalmente dentro

de los primeros 100 días después del trasplante, y es un desafío importante para los trasplantes debido a la morbilidad y mortalidad asociadas. La forma crónica de la GVHD normalmente ocurre después de 100 días. La aparición de los casos moderados a graves de GVHD crónica influye negativamente en la supervivencia a largo plazo.

5 La GVHD aguda (aGVHD, por sus siglas en inglés) afecta la piel, el hígado y el tracto gastrointestinal, y se produce cuando las células T del donador reconocen el tejido receptor como extraño y desencadenan inflamación y lesión del tejido. Específicamente, la aGVHD se inicia por células T donadoras alorreactivas que reconocen las moléculas de clase I y II del MHC (por sus siglas en inglés) en la superficie de las células del hospedero así como péptidos
10 presentados por ellas. Se cree que la infiltración de varios órganos objetivo, tales como el intestino, el hígado y la piel, por parte de los leucocitos donadores, incluidas las células T, es uno de los procesos clave en la fase inicial de la aGVHD. La activación y expansión de las células T del donador, que llevan a la secreción de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de células efectoras inflamatorias adicionales a estos sitios, daña aún más los tejidos
15 afectados. Ver Hoffmann, *et al.*, citado anteriormente.

Enterococcus faecalis y citolisina y ALD

La microbiota intestinal promueve la enfermedad hepática alcohólica en ratones, pero se sabe poco sobre los factores microbianos que son responsables de este proceso. Recientemente, la citolisina, una exotoxina de dos subunidades secretada por *Enterococcus*
20 *faecalis*, se ha identificado como una causa de muerte de hepatocitos y lesión hepática. Ver Duan, *et al.*, 2019, *Nature* 575: 505-511, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. *Enterococcus faecalis* es una bacteria comensal Gram positiva, no formadora de esporas que habita en los tractos gastrointestinales de los humanos y otros mamíferos. Las cepas altamente virulentas de *E. faecalis* expresan una exotoxina formadora de poros,
25 llamada citolisina, que lisa las células bacterianas y eucariotas en respuesta a las señales del cuórum. En comparación con los individuos no alcohólicos o los pacientes con trastorno por consumo de alcohol, los pacientes con hepatitis alcohólica han aumentado el número en heces de *E. faecalis*. La presencia de *E. faecalis* positiva para citolisina (citolítica) se correlacionó con la gravedad de la hepatopatía alcohólica y con la mortalidad en pacientes
30 con hepatitis alcohólica. Asimismo, los bacteriófagos que se dirigen a *E. faecalis* citolítica disminuyen la citolisina en el hígado y abaten la enfermedad hepática inducida por etanol en ratones humanizados. Ver Duan, *et al.*, citado anteriormente.

La toxina citolisina funcional consiste en oligopéptidos de subunidades grandes y

pequeñas, codificados por los genes cy1_L y cy1_S (por sus siglas en inglés), respectivamente. Los componentes de la citolisina de *E. faecalis* Cy1_L y Cy1_S se han clasificado como antibióticos formadores de poros de tipo A y, más recientemente, como antibióticos de clase II de dos componentes. Los antibióticos son péptidos antimicrobianos policíclicos complejos, que son sintetizados ribosomalmente por bacterias Gram positivas y se caracterizan por la presencia de puentes de lationina y metillantionina entre los residuos deshidratados de serina y treonina y los tioles de cisteína. Los antibióticos tienen estructuras y funciones extremadamente variadas, pero todos se caracterizan por experimentar una modificación postraslacional extensa y poseer actividades antibióticas o morfogénicas. La citolisina parece ser única entre los antibióticos, ya que puede lisar otras bacterias así como eritrocitos y otras células eucariotas. Ver Van Tyne, *et al.*, 2013, *Toxins* 5(5): 895-911.

Las secuencias de aminoácidos de Cy1_L y Cy1_S se proporcionan a continuación:

Cy1_L TTPVCAVAATAAASSAACGWVGGGIFTGVTVVVSLKHC (SEQ ID NO: 1)

Cy1_S TTPACFTIGLGVGALFSAKFC (SEQ ID NO: 2)

Enterococcus y GVHD

Cada vez hay más pruebas de que la microbiota intestinal de un paciente puede desempeñar un papel en la susceptibilidad a la GVHD, en particular a la GVHD aguda que resulta del trasplante alogénico de células hematopoyéticas. Ver Garrett, 2020, *New England Journal of Medicine* 382(11): 1064-1066, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. Algunas especies de enterococos en el intestino (por ejemplo, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*) son patógenos oportunistas que con frecuencia causan infecciones del torrente sanguíneo potencialmente mortales en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de células hematopoyéticas. Los estudios han demostrado que los enterococos, en particular *E. faecium*, dominan las comunidades fecales en un subgrupo considerable de pacientes sometidos a trasplante de células hematopoyéticas alogénicas, y este dominio de enterococos se correlacionó con una menor supervivencia general y una mayor mortalidad por GVHD. Ver Stein-Thoeringer, *et al.*, 2019, *Science* 366: 1143-9, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. Stein-Thoeringer, *et al.*, observaron que la lactosa de azúcar en la dieta impulsa el crecimiento de enterococos en un modelo de ratones con GVHD, y que una dieta libre de lactosa atenuó la expansión de enterococos y la inflamación de células T en GVHD.

Producto de huevo hiperinmunizado

En ciertos aspectos, la presente divulgación se relaciona con un método para preparar un producto de huevo hiperinmunizado que comprende: i) hiperinmunizar un animal productor de huevos con un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, la
5 toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*; y ii) preparar un producto de huevo hiperinmunizado a partir de uno o más huevos producidos por el animal. En algunas modalidades, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el antígeno comprende *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus*
10 *faecalis*. Los animales productores de huevos producen anticuerpos en la sangre y los huevos que son específicos de inmunógenos particulares. Por ejemplo, varios géneros de la clase Aves, como las gallinas (*Gallus domesticus*), pavos y patos producen anticuerpos contra antígenos asociados con enfermedades aviares. LeBacq-Verheyden, *et al.* (*Immunology* 27:683 (1974)) y Leslie, G.A., *et al.* (*J. Med.* 130:1337 (1969)), han analizado
15 cuantitativamente las inmunoglobulinas de la gallina. Polson, A., *et al.* (*Immunological Communications* 9:495-514 (1980)) inmunizaron gallinas contra varias proteínas y mezclas naturales de proteínas, y detectaron anticuerpos IgY en las yemas de huevos. Fertel, R., *et al.* (*Biochemical and Biophysical Research Communications* 102:1028-1033 (1981)) inmunizaron gallinas contra prostaglandinas y los anticuerpos detectados en las yemas de huevo.
20 Jensenius, *et al.* (*Journal of Immunological Methods* 46:63-68 (1981)) proporcionan un método de aislamiento de IgG de yema de huevo para su uso en inmunodiagnóstico. Polson, *et al.* (*Immunological Communications* 9:475-493 (1980)) describe anticuerpos aislados de la yema de las gallinas que se inmunizaron con una variedad de virus vegetales.

La patente de EE. UU. No. 4,748,018 divulga un método de inmunización pasiva de un
25 mamífero que comprende administrar parenteralmente de anticuerpos purificados obtenidos de los huevos de un ave que se ha inmunizado contra el antígeno correspondiente, y en donde el mamífero ha adquirido inmunidad a los huevos. La patente de EE. UU. No. 5,772,999, concedida a DCV-Biologics, divulga un método para prevenir, contrarrestar o reducir los trastornos gastrointestinales crónicos o el daño gastrointestinal inducido por antiinflamatorios
30 no esteroideos (NSAID-inducida, por sus siglas en inglés) en un sujeto al administrar el huevo hiperinmunizado y/o leche o fracciones de los mismos al sujeto.

Un huevo inmunizado es un huevo que proviene de un ave que se ha inmunizado con, por ejemplo, un antígeno específico o mezcla de antígenos. Un huevo hiperinmunizado es un

huevo que proviene de un ave que se ha llevado a un estado específico de inmunización por medio de, por ejemplo, administraciones periódicas de antígenos de refuerzo. Se ha encontrado que los huevos hiperinmunizados, independientemente del tipo de antígeno que se haya administrado a su fabricante aviario, tienen varios factores benéficos, que incluyen, como se mencionó anteriormente, el tratamiento de trastornos gastrointestinales crónicos, daño gastrointestinal inducido por NSAID (ver la patente de EE.UU. No. 5,772,999) y efectos antiinflamatorios debido a la presencia de una composición antiinflamatoria (ver la publicación de aplicación de EE. UU. No. US 2004/0156857).

Una de las ventajas del producto de huevo hiperinmunizado es que tendría un nivel más alto y más consistente de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos IgY) contra *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* o la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* comparada con un producto de huevo de control o un producto de huevo de una gallina que se ha inmunizado con *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, o la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* usando técnicas de inmunización estándar. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado tiene niveles más altos de anticuerpos IgY contra *Enterococcus faecalis* y/o la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis* en relación con una gallina que se ha inmunizado con *Enterococcus faecalis* y/o la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* usando técnicas de inmunización estándar. Típicamente, la inmunización estándar consiste en una inmunización inicial seguida de una o dos inmunizaciones de refuerzo a intervalos de 30 días. En algunas modalidades, la hiperinmunización comprende al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 inmunizaciones con *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y/o la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* como se describe en la presente. En algunas modalidades, la hiperinmunización comprende inmunizar un animal productor de huevos con *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y/o la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis* descrita en la presente en intervalos de menos de 30 días, menos de 25 días, menos de 20 días, menos de 15 días, menos de 10 días, o menos de 5 días.

El producto de huevo hiperinmunizado se puede producir por cualquier animal productor de huevo. Se prefiere que el animal sea miembro de la clase Aves o, en otras palabras, un ave. Dentro de la clase Aves, las aves domesticadas se prefieren, pero otros miembros de esta clase, tales como pavos, patos y gansos, son una fuente adecuada de producto de huevo hiperinmunitario. En una modalidad particular, el animal productor de huevos es una gallina.

Este estado especial de hiperinmunización se logra preferiblemente al administrar una

inmunización inicial, seguida de refuerzos periódicos con dosis suficientemente altas de antígenos específicos o mezclas de antígenos. La dosis del refuerzo puede ser 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la dosis necesaria para producir la inmunización primaria del animal productor de huevos. Cualquiera de estos porcentajes se puede usar para definir un rango para la dosis de la inmunización de refuerzo. Por ejemplo, en algunas modalidades, la dosis del refuerzo es de 20 % a 80 %, de 30 % a 70 %, o de 50 % a 100 % de la dosis necesaria para producir la inmunización primaria del animal productor de huevos. En una modalidad particular, la dosis de la inmunización de refuerzo es 50 % de la dosis de la inmunización primaria. Teniendo conocimiento de la necesidad de desarrollar y mantener un estado hiperinmunitario, está dentro de la habilidad de la técnica variar la cantidad de antígeno administrado, dependiendo de los géneros animales productores de huevos y raza empleados, con el fin de mantener al animal en el estado hiperinmunitario.

El estado hiperinmunitario se puede producir por un único antígeno o una combinación de antígenos. La hiperinmunización se puede lograr por múltiples exposiciones a múltiples antígenos o múltiples exposiciones a un único antígeno.

Antígenos para la hiperinmunización

En algunas modalidades, los antígenos para la hiperinmunización comprenden uno o más de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmuniza solamente con *Enterococcus faecalis*, es decir, no se usan antígenos adicionales para la hiperinmunización. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmuniza solamente con la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmuniza solamente con *Enterococcus faecium*.

En algunas modalidades, un producto de huevo hiperinmunizado que comprende anticuerpos contra *Enterococcus faecalis* se prepara al hiperinmunizar a un animal productor de huevo con *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, un producto de huevo hiperinmunizado que comprende anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* se prepara al hiperinmunizar un animal productor de huevo con la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, un producto de huevo hiperinmunizado que comprende anticuerpos contra *Enterococcus faecium* se prepara al hiperinmunizar a un animal productor del huevo con *Enterococcus faecium*.

Cualquier combinación de los antígenos divulgados en la presente se puede usar para

hiperinmunizar a un animal productor de huevos. Por ejemplo, en algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmunizó con *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmunizó con *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmunizó con *Enterococcus faecium* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmunizó con *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*.

Procedimiento de hiperinmunización

La siguiente lista de pasos es un ejemplo de un procedimiento preferido usado para llevar a un animal productor de huevos a un estado de inmunidad elevada desde el cual el huevo hiperinmunitario resultante o el producto de huevo se puede administrar a un ave:

1. Seleccionar uno o más antígenos.

2. Provocar una respuesta inmunitaria en el animal productor de huevos por inmunización primaria.

3. Administrar vacunas de refuerzo de uno o más antígenos de dosis apropiada para inducir y mantener el estado hiperinmunitario.

Paso 1: El punto crítico en este paso es que el antígeno debe ser capaz de inducir estados inmunitarios e hiperinmunitarios en el animal productor de huevos. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se inmunizó con *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se inmunizó con la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmunizó con *Enterococcus faecium*. En algunas modalidades, el animal productor de huevos se hiperinmunizó con dos o más de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, y la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*.

Paso 2: Para *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, la vacuna puede ser una vacuna muerta o atenuada viva. La vacuna se puede administrar por cualquier método que provoque una respuesta inmunitaria. Se prefiere que la inmunización se logre al administrar la vacuna a través de una inyección intramuscular. El músculo preferido para la inyección en un ave es el músculo del pecho. La dosis es preferiblemente de 0,05-5 miligramos de la vacuna inmunogénica. Otros métodos de administración que se pueden usar incluyen

inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, intradérmica, supositorio rectal, aerosol u administración oral.

Se puede determinar si la vacuna ha provocado una respuesta inmunitaria en el animal productor de huevos a través de una serie de métodos conocidos por aquellos con conocimientos en la técnica de la inmunología. Los ejemplos de estos incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), pruebas para la presencia de anticuerpos contra los antígenos estimulantes, y pruebas diseñadas para evaluar la capacidad de las células inmunitarias del hospedero para responder al antígeno. La dosis mínima del antígeno necesaria para inducir una respuesta inmunitaria depende del procedimiento de vacunación usado, que incluye el tipo de adyuvantes y la formulación de antígenos usados así como el tipo de animal productor de huevos usado como hospedero.

Paso 3: El estado hiperinmunitario se induce y mantiene preferiblemente en el animal objetivo por las administraciones de refuerzo repetidas de una dosis apropiada en intervalos de tiempo fijos. Los intervalos de tiempo son preferiblemente intervalos de 2-8 semanas por un período de 6-12 meses. Sin embargo, es esencial que las administraciones de refuerzo no lleven a la tolerancia inmunitaria. Estos procesos se conocen bien en la técnica. Los métodos para preparar el producto de huevo hiperinmunizado se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. No. 6,803,035, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad.

En una modalidad particular, se formula un antígeno (por ejemplo, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, y/o la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*) en una vacuna de Freund. En la primera vacunación, el animal productor de huevos recibe dos dosis de 0,5 mL de cada antígeno. Dos semanas después, se administra una dosis de 0,5 mL de cada antígeno al animal productor de huevos como una vacunación de refuerzo. Se realiza una vacunación de refuerzo adicional 4 semanas después de la primera vacunación. Las vacunas se pueden administrar al tejido mamario.

Es posible usar otros procedimientos de mantenimiento de hiperinmunización o una combinación de procedimientos, tales como, por ejemplo, la inyección intramuscular para la inmunización primaria e inyección intravenosa para las inyecciones de refuerzo. Otros procedimientos incluyen la administración simultánea de antígeno microencapsulado y líquido, o inyección intramuscular para la inmunización primaria, y dosis de refuerzo por administración oral o administración parenteral por medios de microencapsulación. Varias combinaciones de vacunación primaria e hiperinmunización son conocidas por aquellos expertos en la técnica.

En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende anticuerpos contra *Enterococcus faecium*. En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende anticuerpos contra *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. Los anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* se pueden unir y neutralizar la toxina. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* y anticuerpos contra al menos un antígeno de *Enterococcus faecalis* adicional que no es la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgA, IgM o IgY (por sus siglas en inglés, respectivamente). En una modalidad particular, el anticuerpo es un anticuerpo de IgY.

El huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado puede contener un nivel elevado de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgY) específico de un antígeno en particular divulgado en la presente en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con el antígeno en particular. Por ejemplo, en algunas modalidades el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado contiene un nivel aumentado de un anticuerpo que es específico de *Enterococcus faecalis* en relación con un huevo de control o un producto de huevo obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado contiene un nivel aumentado de un anticuerpo que es específico de la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* en relación con un huevo de control o un producto de huevo obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado contiene un nivel aumentado de un anticuerpo específico de *Enterococcus faecium* en relación con un huevo de control o un producto de huevo obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó.

En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo comprende al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos IgY) específicos de un antígeno en particular divulgado en la presente (por ejemplo, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, o la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*) en peso en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con el antígeno en particular. Por ejemplo, en algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o

el producto de huevo hiperinmunizado comprende al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos IgY) específicos de *Enterococcus faecalis* en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado comprende al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos IgY) específicos de la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado comprende al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos IgY) específicos de *Enterococcus faecium* en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con *Enterococcus faecium*.

Los huevos hiperinmunizados o los productos de huevo pueden contener un aumento en el nivel de dos o más anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos IgY), cada uno de los cuales es específico de un antígeno diferente divulgado en la presente, en relación con un huevo de control o un producto de huevo obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó. Por ejemplo, en algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado contiene un nivel aumentado de uno o más anticuerpos que son específicos de la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* y uno o más anticuerpos que son específicos de *Enterococcus faecalis* (por ejemplo, uno o más anticuerpos específicos de un antígeno de *Enterococcus faecalis* distinto de la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*) en relación con un huevo de control o un producto de huevo obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado contiene un nivel aumentado de un anticuerpo específico de la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* y un nivel aumentado de un anticuerpo específico de *Enterococcus faecium* en relación con un huevo de control o un producto de huevo obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto hiperinmunizado contiene un nivel aumentado de un anticuerpo específico de *Enterococcus faecium* y un nivel aumentado de un anticuerpo específico de *Enterococcus faecalis* en relación con un huevo de control o un producto de huevo obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó.

Por ejemplo, en algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado comprende al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra *Enterococcus faecalis* y al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecalis* citolisina. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado comprende al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra *Enterococcus faecalis* y al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra *Enterococcus faecium* en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado comprende al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* y al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra *Enterococcus faecium* en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*. En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo hiperinmunizado comprende al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra *Enterococcus faecalis*, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* y al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % más de anticuerpos contra *Enterococcus faecium* en relación con un huevo de control o un producto de huevo de control obtenido de un animal productor de huevos que no se hiperinmunizó con *Enterococcus faecalis*, la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*.

Las comparaciones de los títulos de anticuerpos en productos de huevo hiperinmunizados y productos de huevo de control se pueden determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad, los huevos se recolectan y los títulos de anticuerpos se monitorean por ELISA a intervalos regulares. Para determinar los títulos de anticuerpos, se extrae la IgY total de los huevos con el kit Pierce™ Chicken IgY Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). En pocas palabras, se mezclan 2 mL de huevo con cinco volúmenes de reactivo de delipidación y se purifica la IgY siguiendo las instrucciones

del fabricante. Las muestras de huevo en polvo secado por aspersión se reconstituyen en PBS (por sus siglas en inglés) estéril a 1 mg/mL y se filtran a través de un filtro de membrana de 0,22 µm. Los títulos de anticuerpos específicos en las muestras aisladas de IgY o de huevo en polvo se miden por ELISA. Las placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano (Corning® Costar®, Corning, NY) se recubren con antígenos (por ejemplo, un antígeno de *Enterococcus faecalis*, la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*, o un antígeno de *Enterococcus faecium*) a 10µg/mL (100 µL/pozo) y se incuban durante la noche a 4 °C. Las placas se lavan dos veces con PBS que contiene 0,05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se bloquean con 100 µL/pozo de PBS que contiene albúmina sérica bovina al 1 % (BSA, por sus siglas en inglés) y se incuban por 1 h a RT (temperatura ambiente, por sus siglas en inglés). Las muestras IgY diluidas en serie (en PBS con BSA al 0,1 %) de muestras de huevo en polvo se adicionan a las placas en pozos triplicados (100 µL/pozo) y se incuban por 2 h a RT con agitación constante. Posteriormente, las placas se lavan con PBS-T y se tratan con anticuerpo anti-IgY de gallina (IgG) conjugado con peroxidasa (1:500; Sigma), se incuban por 30 min, seguido de desarrollo de color por 10 minutos con sustrato de tetrametilbencidina (Sigma) al 0,01 % en amortiguador de fosfato-citrato 0,05 M, pH de 5,0. Los anticuerpos unidos se detectan al medir la densidad óptica a 450 nm (OD₄₅₀, por sus siglas en inglés) usando un lector de microplacas (Bio-Rad, Hercules, CA). Los títulos de anticuerpos se pueden expresar por la dilución más alta del producto de huevo que aún contiene anticuerpos detectables, como se mide con la densidad óptica descrita anteriormente. Por ejemplo, un título de anticuerpo de 1000 indicaría que una dilución de 1000 veces del producto de huevo contiene anticuerpo detectable, pero las diluciones más altas no contienen anticuerpo detectable. En algunas modalidades, el título de anticuerpos (por ejemplo, el título de anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis*, y/o *Enterococcus faecium*) en el producto de huevo hiperinmunizado es al menos 1000, al menos 2000, al menos 4000, al menos 8000, al menos 16.000, al menos 32.000, al menos 64.000, al menos 100.000, al menos 128.000, al menos 250.000, al menos 500.000, o al menos 1 millón, 2 millones, 3 millones, 4 millones, 5 millones, 6 millones, 7 millones, 8 millones, 9 millones, 10 millones, 11 millones, 12 millones, 13 millones, 14 millones, 15 millones, 16 millones, 17 millones, 18 millones, 19 millones, o 20 millones. En una modalidad particular, el título de anticuerpos (por ejemplo, el título de anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis*, y/o *Enterococcus faecium*) en el producto de huevo hiperinmunizado es de al menos 16.000. En otra modalidad particular, el título de anticuerpos contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis* y el título de anticuerpos contra *Enterococcus faecalis* en el producto de huevo hiperinmunizado es al menos 16.000.

En algunas modalidades, el huevo hiperinmunizado o el producto de huevo comprende al menos 0,0001 %, 0,0005 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,05 % o 0,1 % en peso de un anticuerpo IgY contra un antígeno específico (por ejemplo, un antígeno de *Enterococcus faecium*, un antígeno de *Enterococcus faecalis*, o la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*).

5 Por lo general, un huevo de gallina completo pesa aproximadamente 60 gramos sin la cáscara, con la yema de huevo pesando aproximadamente 20 gramos y la clara de huevo pesando aproximadamente 40 gramos. En algunas modalidades, 3 gramos de yema de huevo contienen aproximadamente 20-30 miligramos de IgY total, de modo tal que un huevo completo contiene aproximadamente 150-200 mg de IgY total. En algunas modalidades, al
10 menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 % o 30 % del total de IgY en el huevo o el producto de huevo hiperinmunizado es específico de uno de los antígenos usados para la hiperinmunización (por ejemplo, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, o la toxina citolisina aislada de *Enterococcus faecalis*).

15 Composiciones y administración

En ciertos aspectos, la presente divulgación se relaciona con un método para prevenir o tratar la hepatopatía alcohólica en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva un producto de huevo hiperinmunizado obtenido de un animal productor de huevos, previniendo o tratando así la enfermedad hepática alcohólica
20 en el sujeto, en donde el producto de huevo hiperinmunizado comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos contra un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis* y la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos contra la toxina citolisina de
25 *Enterococcus faecalis* y uno o más anticuerpos contra *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, los anticuerpos contra *Enterococcus faecalis* incluyen anticuerpos contra uno o más antígenos de *Enterococcus faecalis* que no son la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*.

En ciertos aspectos, la presente divulgación se relaciona con un método para prevenir
30 o tratar la enfermedad de injerto contra el hospedero en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto de huevo hiperinmunizado obtenido de un animal productor de huevos, previniendo o tratando así la enfermedad de injerto contra el hospedero en el sujeto, en donde el producto de huevo

hiperinmunizado comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos contra un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*. Una vez que los animales productores de huevos se han hiperinmunizado lo suficiente, es preferible que los

5 huevos de estos animales se recolecten y procesen para producir un producto de huevo hiperinmunizado en una forma administrable. El producto de huevo hiperinmunizado se puede preparar por deshidratación, secado por aspersión, o secado por congelación de huevo completo, yema o fracción de IgY purificada. El producto de huevo hiperinmunizado seco se puede mezclar con un agente tal como el silicio o derivados del silicio que mejora las

10 propiedades de flujo. El producto de huevo hiperinmunizado seco puede comprender un desecante. El producto de huevo hiperinmunizado se puede almacenar a temperatura ambiente o refrigerar, por ejemplo, a 4 °C.

En algunas modalidades, la administración del producto de huevo hiperinmunizado al sujeto reduce el nivel de *Enterococcus faecalis* en el sujeto, por ejemplo, en relación con el

15 nivel de *Enterococcus faecalis* en el sujeto antes de la administración del producto de huevo hiperinmunizado, o en relación con un sujeto al que no se le administra el producto de huevo hiperinmunizado. En algunas modalidades, la administración del producto de huevo hiperinmunizado al sujeto reduce la lesión hepática en el sujeto (por ejemplo, reduce los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT)), por ejemplo, en relación con el nivel de

20 lesión hepática antes de la administración del producto de huevo hiperinmunizado, o en relación con un sujeto al que no se le administra el producto de huevo hiperinmunizado.

En algunas modalidades el producto de huevo hiperinmunizado se encapsula. Los métodos de encapsulado de anticuerpos y otras proteínas se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. No. 7,105,158. Los materiales que son

25 biodegradables y no antigénicos se pueden usar como material de encapsulado. Los materiales de encapsulado incluyen, pero no se limitan a albúmina, PLGA (por sus siglas en inglés), globulina, polímeros naturales y sintéticos, y polímeros termoplásticos. Cualquier polímero que sea biocompatible y bioerosionable se puede usar para el encapsulado. Una serie de agentes de reticulación disponibles, tal como glutaraldehído, se pueden usar para

30 reticular el material encapsulado. Adicionalmente, el material farmacéuticamente suministrado puede contener microesferas del fármaco encapsulado, por lo que las microesferas tienen diferentes concentraciones del agente reticulante usado, creando así una liberación continua prolongada del anticuerpo.

En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado está en forma de una micropartícula o nanopartícula, por ejemplo, una micropartícula encapsulada o nanopartícula encapsulada. Las micropartículas y nanopartículas pueden tener cualquier forma. Típicamente las micropartículas y nanopartículas son esféricas. Otras formas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, hojuelas, triángulos, óvalos, varillas, polígonos, agujas, tubos, cubos y estructuras cuboides. En ciertas modalidades, las micropartículas tienen un diámetro menor a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 μm . Cualquiera de estos valores se puede usar para definir un rango para el diámetro de la micropartícula. Por ejemplo, el diámetro de la micropartícula puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 μm , de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 μm , o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 μm . En otras modalidades, se pueden usar micropartículas o partículas más grandes. Por ejemplo, las micropartículas pueden tener un diámetro en el rango de 10 μm a 1000 μm . En ciertas modalidades, las nanopartículas tienen un diámetro menor a 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, o 10 nm. Cualquiera de estos valores se puede usar para definir un rango para el diámetro de la nanopartícula. Por ejemplo, el diámetro de la nanopartícula puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 nm, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 nm, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nm.

Hay varios procesos por los cuales se pueden encapsular micropartículas o nanopartículas, que incluyen, por ejemplo, microencapsulación de paredes múltiples, encapsulado de fusión en caliente, encapsulado de separación de fase, emulsión espontánea, microencapsulación de evaporación disolvente, microencapsulación de eliminación de disolvente, y coacervación. Estos métodos se conocen bien en la técnica. Las descripciones detalladas de los métodos se discuten en Mathiowitz, *et al.*, "Microencapsulation", en Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, vol. 2, pp. 495-546, 1999, John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y., que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad.

En algunas modalidades, el anticuerpo IgY específico para un antígeno en la presente divulgado (por ejemplo, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* o la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*) se administra al sujeto en una forma concentrada. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo IgY se purifica y se concentra antes de la administración al sujeto. Los métodos de purificación y concentración de anticuerpos IgY de productos de huevo se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. No. 5,367,054, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende o consiste en anticuerpos IgY

purificados o parcialmente purificados contra la toxina citolisina de *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende o consiste en anticuerpos IgY purificados o parcialmente purificados contra *Enterococcus faecalis*. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende o consiste en anticuerpos IgY purificados o parcialmente purificados contra *Enterococcus faecium*. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado comprende o consiste en anticuerpos IgY purificados o parcialmente purificados contra *Enterococcus faecalis* y anticuerpos IgY purificados o parcialmente purificados contra la toxina citolisina *Enterococcus faecalis*.

En algunas modalidades, los productos de huevo hiperinmunizados descritos en la presente se usan para tratar la enfermedad hepática alcohólica en un sujeto que ya ha desarrollado la enfermedad. Por ejemplo, en algunas modalidades, el sujeto tiene enfermedad hepática alcohólica en el momento de la administración del producto de huevo hiperinmunizado. Se ha observado un aumento en la proporción de *Enterococcus spp.* en pacientes con hepatopatía alcohólica (por ejemplo, hepatitis alcohólica) en relación con pacientes sin un trastorno de consumo de alcohol. Por ejemplo, en pacientes con hepatitis alcohólica, 5,59 % de las bacterias fecales fueron *Enterococcus spp.* en relación con casi ninguno (0,023 %) en los sujetos control sin un trastorno de consumo de alcohol. Ver Duan, *et al.*, 2019, *Nature* 575: 505-511. Por consiguiente, en algunas modalidades, al menos 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % de las bacterias fecales en el sujeto son *Enterococcus spp.* en el momento de la administración del producto de huevo hiperinmunizado. Se ha demostrado que las muestras fecales de pacientes con hepatitis alcohólica presentan aproximadamente 2.700 veces más de *E. faecalis* que las muestras de sujetos de control sin un trastorno de consumo de alcohol, medido por PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés), y aproximadamente 80 % de los pacientes con hepatitis alcohólica son positivos para *E. faecalis* en sus heces. Ver Duan, *et al.*, citado anteriormente. Por consiguiente, en algunas modalidades, el sujeto tiene al menos 100, 500, 1000, 1500, 2000, o 2500 veces más de *E. faecalis* en una muestra fecal se relaciona con un sujeto que no tiene enfermedad hepática alcohólica.

En algunas modalidades, los productos de huevo hiperinmunizados descritos en la presente se usan para prevenir el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica en un sujeto. Por ejemplo, en algunas modalidades, el sujeto no tiene enfermedad hepática alcohólica en el momento de la administración del producto de huevo hiperinmunizado. En algunas modalidades, el sujeto tiene un trastorno relacionado con el alcohol que no es una

enfermedad hepática alcohólica en el momento de la administración del producto de huevo hiperinmunizado. En algunas modalidades, el sujeto es un abusador del alcohol, un bebedor excesivo o un bebedor pesado. En una modalidad particular, el sujeto al que se administra el producto de huevo hiperinmunizado es un humano.

5 En algunas modalidades, los productos de huevo hiperinmunizados descritos en la presente se usan para tratar la GVHD en un sujeto que ya ha desarrollado la enfermedad. Por ejemplo, en algunas modalidades, el sujeto tiene GVHD en el momento de la administración del producto de huevo hiperinmunizado. Como se discutió anteriormente, se ha observado un aumento en los niveles fecales de *Enterococcus spp.* (por ejemplo, *E. faecium*) en pacientes
10 con GVHD. Ver Garrett, citado anteriormente. Por consiguiente, en algunas modalidades, el sujeto que tiene GVHD exhibe niveles fecales aumentados de uno o más de *Enterococcus spp.* (por ejemplo, *E. faecalis* o *E. faecium*) en relación con un sujeto sano (por ejemplo, un sujeto que no tiene GVHD) en el momento de la administración del producto de huevo hiperinmunizado. En algunas modalidades, el sujeto que tiene GVHD ha recibido un trasplante
15 de órgano, un trasplante de célula madre, un trasplante de médula ósea o un trasplante alogénico de células hematopoyéticas. En algunas modalidades, el sujeto tiene GVHD aguda. En algunas modalidades, el sujeto tiene GVHD crónica.

 En algunas modalidades, los productos de huevo hiperinmunizados descritos en la presente se usan para prevenir el desarrollo de GVHD en un sujeto. Por ejemplo, en algunas
20 modalidades, el sujeto no tiene GVHD en el momento de la administración del producto de huevo hiperinmunizado. En algunas modalidades, el sujeto ha recibido un trasplante (por ejemplo, un trasplante de órgano, un trasplante de células madres, un trasplante de médula ósea o un trasplante alogénico de células hematopoyéticas) pero aún no ha desarrollado GVHD. En una modalidad particular, el sujeto al que se administra el producto de huevo
25 hiperinmunizado es un humano.

 El producto de huevo hiperinmunizado de la presente invención se administra a un sujeto (por ejemplo, un humano) por cualquier medio para tratar o prevenir la enfermedad hepática alcohólica o GVHD en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración ocurre por administración oral. El huevo y la yema de huevo son ingredientes naturales, y son no tóxicos
30 y seguros. En otras modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se puede administrar por inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular. En una modalidad particular, el producto de huevo hiperinmunizado es IgY purificada o parcialmente purificada que se administra por inyección intravenosa.

Cualquiera de los varios portadores farmacéuticos conocidos se puede usar en la preparación de una preparación inyectable o administrable, que incluye solución salina amortiguadora con fosfato, solución salina, etanol, propilenglicol, y similares. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra a través del agua potable.

5 En ciertas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra como una composición que comprende uno o más compuestos adicionales, por ejemplo, un nutriente o probiótico. Por ejemplo, en una modalidad, el producto de huevo hiperinmunizado de la invención se integra en un suplemento dietético. Un método para preparar el huevo de la invención para ser incorporado en un suplemento dietético consiste en secar el huevo en
10 un huevo en polvo. Aunque se conocen varios métodos para secar huevos, el secado por aspersión es un método preferido. El proceso de secado por aspersión de huevos es bien conocido en la técnica. En algunas modalidades, la composición es una solución acuosa que comprende el producto de huevo hiperinmunizado.

 En ciertas modalidades, los huevos completos se dividen en fracciones separadas,
15 tales como las yemas de huevo y las claras de huevo. Por ejemplo, se sabe generalmente en la técnica que el anticuerpo IgY se encuentra en las yemas de huevo. Por consiguiente, aquellos que tienen conocimientos ordinarios en la técnica reconocerían claramente que la separación de las yemas de huevo podría proporcionar fracciones más potentes o la eliminación de componentes indeseables, y permitiría otros modos de administración, tales
20 como la administración de productos de huevo hiperinmunizados por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, oral o tópica. Tal separación adicional proporcionará la capacidad de fabricar productos encapsulados y composiciones que comprendan dicho huevo o fracción del mismo.

 El producto hiperinmunitario del huevo se administra preferiblemente al sujeto en una
25 cantidad que es inmunológicamente efectivo para tratar o prevenir la enfermedad hepática alcohólica o GVHD. La dosis y la duración de la administración dependerán de la condición particular del sujeto. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto por al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 180 o 365 días. El producto de huevo hiperinmunizado se puede administrar al sujeto 1, 2, 3, 4, 5,
30 6, 7, 8, 9, 10 o más veces al día. Cualquiera de estos valores se puede usar para definir un rango para el número de veces que el producto de huevo hiperinmunizado se puede administrar al sujeto por día. Por ejemplo, en algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto 1-2 veces al día, 1-3 veces al día, o 1-4 veces al día.

En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto al menos dos veces al día. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto al menos una vez al día. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto diariamente. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto una vez cada dos días. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto una vez cada tres días. En algunas modalidades, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto una vez por semana. En una modalidad particular, el producto de huevo hiperinmunizado se administra al sujeto una vez al día por más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días consecutivos.

En algunas modalidades, se pueden administrar al sujeto cantidades diarias que van desde menos de uno a varios huevos completos hiperinmunizados (o productos hiperinmunizados que contienen el equivalente de menos de uno a varios huevos completos hiperinmunizados) dependiendo de la circunstancia particular de la condición. Las fracciones más potentes se pueden separar y concentrar por métodos bien conocidos en la técnica, de varios cientos de huevos. En ciertas modalidades, la cantidad efectiva del producto de huevo hiperinmunizado administrado a un sujeto (por ejemplo, un humano) es 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 20, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 gramos por día. Por ejemplo, en algunas modalidades, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 gramos de huevo completo se administran al sujeto por día. En algunas modalidades, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 gramos de yema de huevo se administran al sujeto por día. En algunas modalidades, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 gramos de yema de huevo seca o huevo completo seco se administran al sujeto por día. Cualquiera de estos valores se puede usar para definir un rango para la cantidad efectiva del producto de huevo hiperinmunizado administrado al mamífero. Por ejemplo, en algunas modalidades la cantidad efectiva del producto de huevo hiperinmunizado está entre 0,1 y 10 gramos, entre 0,5 y 6 gramos, o entre 1 y 5 gramos por día. En una modalidad particular, se administran 3 gramos de yema de huevo al sujeto (por ejemplo, un humano) por día.

En ciertas modalidades, la composición comprende al menos 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % p/p del producto de huevo hiperinmunizado. Cualquiera de estos valores se puede usar para definir un rango de concentración del producto de huevo hiperinmunizado en la composición. Por ejemplo, en algunas modalidades, la composición comprende entre 0,01 %

y 50 %, entre 0,1 % y 50 %, o entre 1 % y 50 % p/p del producto de huevo hiperinmunizado.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación y evaluación de anticuerpos IgY anti-*Enterococcus faecalis* y anti-citolisina

- 5 El estudio actual se diseñó para evaluar la efectividad del huevo hiperinmunitario que contiene anticuerpos IgY dirigidos contra la toxina citolisina de *E. faecalis* y *E. faecalis* cuando se administra oralmente a un modelo de ALD de ratones humanizados que se colonizan con bacterias de las heces de los pacientes con hepatitis alcohólica. Un esquema del experimento se proporciona en la Figura 1.

10 ***Métodos***

Preparación de huevo en polvo hiperinmunitario

- Se iniciaron dos (2) mL de cultivo primario de *Enterococcus faecalis* a partir de cepas de glicerol. Se desarrolló un gran lote de cultivo al inocular con el cultivo primario al 0,2 % en una botella de cultivo de 500 mL, y se cultivó durante la noche a 37 °C con agitación a 180 rpm. Las bacterias se precipitaron por centrifugación a 6000 rpm a 4°C. El precipitado se lavó una vez con PBS frío. El precipitado se suspendió nuevamente en PBS frío, transferido a un tubo de vidrio, y se sonicó por 10 ciclos en la configuración más alta por 30 minutos cada ciclo. El lisado resultante se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C por 15 min y se recolectó el sobrenadante. La proteína total se cuantificó por el ensayo de proteína BCA.

20 **Preparación de citolisina recombinante**

La toxina citolisina recombinante pura de *E. faecalis* se preparó por GenScript USA, Piscataway, NJ.

Protocolo de hiperinmunización

- Una mezcla del lisado bacteriano de *E. faecalis* y la toxina citolisina de *E. faecalis* se diluyeron a 2 mg/mL y 1 mg/mL en PBS, respectivamente, y se usaron como inóculo. Se inmunizaron gallinas separadas con cada uno de los antígenos usando una mezcla 1:1 del inóculo y el adyuvante completo de Freund. Las inmunizaciones se realizaron a los 0, 4, 7, 14 y 28 días, y se recolectaron los huevos.

Extracción de anticuerpos para la evaluación del título y la neutralización

El anticuerpo IgY se extrajo de huevos hiperinmunizados usando un método de dilución en agua. 100 µL de la yema se diluyeron en 10 mL de agua, se mezcló a fondo y se centrifugó para precipitar los lípidos, mientras que los anticuerpos y otras proteínas solubles del huevo se extrajeron en la fase acuosa. La fase acuosa se usó para evaluar la determinación del título por ELISA como se describe a continuación.

Para los ensayos de neutralización, se extrajo IgY de yemas de huevo hiperinmunizadas por dilución de agua y por el método de precipitación de NaCl. Se diluyeron de cuatro a cinco yemas de huevo en una relación 1:10 con agua acidificada a un pH de 5 usando HCl 0,5 M, y se congeló durante la noche. La yema de huevo diluida se descongeló a 37 °C y se centrifugó a 6000 rpm por 20 min para separar los lípidos. El sobrenadante se filtró y mezcló con NaCl al 8,8 % a un pH de 4 y se dejó precipitar por 2 h. Se separó IgY del precipitado por centrifugación y se eliminó el exceso de sal por diálisis en PBS. La IgY total se cuantificó por valores de A_{280} (absorción a 280 nm) usando un espectrofotómetro NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific). La pureza de IgY se analizó en un gel SDS-PAGE.

Detección de especificidad y título de anticuerpos por ELISA

La especificidad y el título del anticuerpo se determinaron por ELISA. Brevemente, para determinar el título de anticuerpos anti-*E. faecalis*, se cubrió una placa de 96 pozos con 1 mg/mL del lisado de *E. faecalis* en un amortiguador de bicarbonato-carbonato (pH 9,3), y se incubaron durante la noche a 4 °C. La placa se lavó una vez con PBS y se bloqueó con BSA al 1 % en PBS por 1 h a 37 °C. La placa se lavó una vez con PBS con Tween-20 al 0,05 % en peso (PBS-T) y se trató con anticuerpo primario anti-*E. faecalis* diluido en serie en la placa por 1 h a 37 °C. La placa se lavó y trató con anticuerpo secundario HRP (por sus siglas en inglés) anti-gallina de cabra. Se adicionó el sustrato TMB (por sus siglas en inglés) para desarrollar la señal y la reacción se detuvo con HCl. La placa se leyó a 450 nm en un lector de placas. Para determinar el título de anticuerpos anti-citolisina, otra placa de 96 pozos se cubrió con 0,5 mg/mL de citolisina, y se realizó un experimento similar con anticuerpos anti-citolisina.

Prueba para las habilidades de neutralización de IgY

Enterococcus faecalis se cultivó durante la noche en caldo BHI (por sus siglas en

inglés), 0,5 mg/mL de citolisina a una OD₆₀₀ de 1,5, y se diluyó 1:50 en el caldo e incubó hasta una OD₆₀₀ de 0,3. El cultivo se diluyó aún más a 10³ UFC/mL en caldo BHI y se trató con anticuerpos a 15 mg/mL. Después de 24 h de incubación a 37 °C, los cultivos se diluyeron en serie 10⁴ veces y se platearon en placas estériles, y se incubaron a 37 °C por 12 horas. Las UFC/mL se cuantificaron al contar el número de colonias usando la función de la partícula del software ImageJ Count. Se calculó el porcentaje de inhibición de la formación de colonias bacterianas.

Resultados

Las proteínas solubles totales que incluyen IgY de yemas de huevo de gallina hiperinmunizadas se extrajeron por dilución en agua y el método NaCl. La pureza de IgY se analizó por electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. La IgY tiene un peso molecular de 180 kDa y se compone por dos subunidades, una cadena pesada de 67 kDa y una cadena ligera de 23 kDa. El patrón electroforético de la IgY extraída de yemas de huevo hiperinmunizadas fue similar al estándar de IgY. Ver la Figura 2.

Evaluación del título de anticuerpos específicos de objetivo

La actividad específica del anticuerpo IgY contra los antígenos de *E. faecalis* y citolisina se midió por ELISA indirecta. Los resultados de ELISA indicaron una unión positiva de IgY a los antígenos específicos en relación con el control de IgY con un título alto de 1:32.000. Ver las Figuras 3A y 3B.

Neutralización y evaluación de objetivo

Se investigaron los efectos inhibidores del crecimiento de los anticuerpos IgY sobre *E. faecalis*. Las bacterias de *E. faecalis* de células completas se incubaron con 15 mg/mL de IgY, y el análisis de UFC se realizó después de 24 h de incubación. El tratamiento con 15 mg/mL de IgY inhibió por > 70 % el crecimiento de *E. faecalis* como se visualiza por la reducción en el número de colonias en la placa de agar. Ver la Figura 4.

Se cuantificó el efecto inhibidor del crecimiento de IgY sobre *E. faecalis* y se graficó el porcentaje de inhibición. Ver la Figura 5. El tratamiento de *E. faecalis* con anticuerpos IgY anti-*E. faecalis* + citolisina a una concentración de 15 mg/mL produjo una inhibición de 75 % del crecimiento de *E. faecalis*, lo que indica una generación exitosa de anticuerpos neutralizantes contra *E. faecalis*. Ver la Figura 5.

Ejemplo 2. Efecto de la alimentación oral de anticuerpos IgY anti-*Enterococcus faecalis* y anti-citolisina en un modelo de ratones con enfermedad hepática alcohólica

Métodos

Preparación de huevo en polvo para estudios preclínicos

5 La clara de huevo y las yemas se homogeneizaron y liofilizaron para crear un huevo en polvo. El huevo en polvo se almacenó a 4 °C. El huevo liofilizado en polvo se analizó para determinar la actividad de anticuerpos como se describió anteriormente en el Ejemplo 1, y posteriormente se evaluó en el modelo humanizado de enfermedad hepática alcohólica (ALD) descrito a continuación.

10 Se usaron muestras de heces de pacientes humanos con hepatitis alcohólica positivas para citolisina para el trasplante fecal en ratones sin gérmenes. A los ratones se les administraron por sonda 100 µL de muestras de heces (1 g de heces disuelto en 30 mL de medio Luria-Bertani (LB, por sus siglas en inglés) con 15 % de glicerol bajo condiciones anaeróbicas), comenzando a una edad de 5-6 semanas y repitiéndose dos semanas después.

15 Dos semanas después de la segunda administración por sonda, los ratones se colocaron en una dieta de etanol o control (isocalórico), como se describe por Duan, *et al.*, 2019, *Nature* 575: 505-511. Periódicamente se evaluó a los ratones para detectar la ALT sérica, patología hepática y otros parámetros como aumento de peso, peso hepático, e ingesta de alimento.

Modelo de enfermedad hepática alcohólica (ALD)

20 Se criaron ratones C57BL/6 machos y hembras libres de gérmenes y se realizó un trasplante fecal con muestras de heces de un paciente humano positivo para citolisina con hepatitis alcohólica a la edad de 5 a 6 semanas y se repitió 2 semanas más tarde, como se describe por Duan, *et al.*, 2019, *Nature* 575: 505-511. Los ratones se alimentaron con dieta Lieber-DeCarli, y la ingesta calórica de etanol fue de 0 % en los días 1-5 y de 36 % desde el

25 día 6 hasta el final del período de estudio. En el día 16, a los ratones se les administro por sonda una dosis única de etanol (5 g/kg de peso corporal) por la mañana temprano y sacrificados 9 horas más tarde. Los ratones control alimentados de manera pareada recibieron una dieta con una sustitución isocalórica de dextrosa.

 El huevo en polvo que contiene control de IgY (15 mg/día) de los huevos de gallinas

30 no inmunizadas, o IgY anti-*E. faecalis* + anti-citolisina (1, 5 o 15 mg por día) se adicionó a la dieta líquida (conteniendo grasas, carbohidratos, proteínas y etanol/dextrosa isocalórica) al

inicio de la administración de alcohol. Ver la Tabla 1 a continuación para el peso seco del huevo en polvo. Las dietas se reemplazaron cada tres días. Los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos al comienzo del estudio. No hubo mortalidad en ninguno de los grupos durante el período de alimentación con etanol.

5 **Tabla 1.** Dosis de IgY para el modelo de ALD de ratón

Grupo de tratamiento	Dosis de IgY (mg)	Dosis de huevo completo en polvo (g)
IgY anti- <i>E. faecalis</i> + anti-citolisina	1	0,18
IgY anti- <i>E. faecalis</i> + anti-citolisina	5	0,88
IgY anti- <i>E. faecalis</i> + anti-citolisina	15	2,63
Control de IgY	15	2,24

Análisis bioquímico

Se midieron los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT; A prueba para daño hepático) con un kit de ALT Infinity (Thermo Scientific). Los niveles de triglicéridos hepáticos se midieron usando el kit de reactivos líquidos de triglicéridos (Pointe Scientific).

10 Procedimientos de tinción

Las muestras de tejido fijadas en formol se incrustaron en parafina (Paraplast plus, McCornick) y se tiñeron con hematoxilina-eosina (Surgipath).

Análisis estadístico

15 Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM. Los números de réplicas biológicas fueron $n = 5$ en cada grupo de dieta con etanol. La significancia se evaluó usando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con el prueba post-hoc de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron usando el software estadístico R, versión R 1.3.1093, 2020, R Foundation for Statistical Computing and GraphPad Prism v8.4.3.

20 *Resultados*

Para determinar el efecto de IgY anti-*E. faecalis* + anti-citolisina en un modelo de ratones con enfermedad hepática inducida por etanol, se colonizaron ratones C57BL/6 libres de gérmenes con heces de un paciente positivo para citolisina con hepatitis alcohólica y se

sometieron al modelo de alimentación crónica de etanol. La ingesta de alimentos, el peso corporal y el peso hepático no fueron significativamente diferentes en los grupos alimentados con etanol. Ver las Figuras 6A-6C. Hubo una tendencia hacia un menor peso corporal en los ratones tratados con IgY anti-*E. faecalis* + anti-citolisina, lo que se relaciona con un menor peso corporal al comienzo del estudio. Los ratones que recibieron 5 mg o 15 mg de IgY anti-*E. faecalis* + anti-citolisina mostraron significativamente menos lesiones hepáticas, como se indica por una disminución del nivel sérico de alanina aminotransferasa (ALT) en relación con los ratones que recibieron el control de IgY después de la alimentación crónica con etanol (ver la Figura 6D). No se observaron diferencias significativas en los triglicéridos hepáticos, aunque se observó una tendencia hacia una menor esteatosis hepática en los ratones tratados con IgY anti-*E. faecalis* + anti-citolisina (ver la Figura 6E). El análisis histológico mostró que los ratones tratados con IgY anti-*E. faecalis* + anti-citolisina mostraron significativamente menos lesiones hepáticas inducidas por etanol y esteatosis hepática (ver la Figura 7).