

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 827**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 15178476 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2992899**

54 Título: **Respuesta inmune mejorada en especies aviares**

30 Prioridad:

14.05.2009 US 178099 P

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

02.03.2021

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

ABRAHAM, ALBERT

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 808 827 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

Respuesta inmune mejorada en especies aviares

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a una composición del inmunomodulador específica para su uso en la prevención de una reducción en la tasa de supervivencia cuando se administra conjuntamente con una vacuna de un polluelo nacido de un huevo de gallina embrionado, por administración *in ovo* al huevo de una cantidad efectiva de 0,05 a 10 microgramos de la composición del inmunomodulador, en que la vacuna es una vacuna utilizada para protección contra el virus de la enfermedad de Marek (MDV).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las vacunas se utilizan para prevenir enfermedades infecciosas y para tratar enfermedades establecidas. Las enfermedades infecciosas son causadas por agentes infecciosos que incluyen ejemplos tales como virus, bacterias, parásitos y otros hongos. Se han desarrollado muchos reactivos y métodos para prevenir y tratar enfermedades infecciosas para todo tipo de especies, incluidos mamíferos, aves, peces y primates.

- 15 Los programas de vacunación son particularmente importantes para los animales criados comercialmente utilizados en la industria alimentaria. Las aves son objetivos principales para muchos tipos de infecciones. Los pollos, pavo y otras aves de corral tanto comerciales como para reproducción se vacunan habitualmente para protegerlos contra la exposición ambiental a los patógenos. Una de las enfermedades económicamente más importantes para la industria avícola es la enfermedad de Marek, que es una enfermedad linfoproliferativa que se produce de forma natural en los pollos. La enfermedad es causada por un virus del herpes altamente contagioso que se propaga horizontalmente y ha sido responsable de grandes pérdidas económicas para la industria avícola. Los síntomas de la enfermedad de Marek aparecen ampliamente en los nervios, los órganos genitales, los órganos internos, los ojos y la piel de las aves infectadas, lo que causa parálisis motriz, disminución de la funcionalidad de los órganos y desnutrición crónica que finalmente conduce a la muerte.

- 20 Las aves incubadoras están expuestas a microorganismos patógenos poco después de su nacimiento. Aunque estas aves están inicialmente protegidas contra los patógenos por anticuerpos derivados de la madre, esta protección es solo temporal, y el sistema inmune inmaduro del ave debe comenzar a proteger al ave contra los patógenos. A menudo es deseable prevenir la infección en aves jóvenes cuando son más susceptibles. También es deseable prevenir la infección en las aves más viejas, especialmente cuando las aves se alojan en espacios cerrados, lo que lleva a la rápida propagación de la enfermedad.

- 30 En la mayoría de las parvadas comerciales, los polluelos recién nacidos reciben ciertas vacunas parenteralmente en la eclosión. Debido a que la exposición a los patógenos a menudo ocurre a una edad muy temprana, a menudo necesitan ser vacunados antes de ser colocados en casas de cría. Dicho esquema de vacunación requiere el manejo individual de las aves e implica el posible riesgo de autoinyección accidental. Además, estas vacunas no siempre son efectivas. Los polluelos jóvenes pueden quedar expuestos a una forma virulenta de la enfermedad demasiado pronto después de la vacunación antes de que tengan la oportunidad de desarrollar una inmunidad protectora adecuada.

- 35 Algunas vacunas virales vivas se pueden administrar en huevos antes de que las aves eclosionen. Este procedimiento se conoce como "vacunación *in ovo*". "Las aves vacunadas *in ovo* desarrollan resistencia a la enfermedad objetivo. Sin embargo, muchas vacunas utilizadas para aves eclosionadas no pueden utilizarse para la vacunación *in ovo* debido a la patogenicidad embrionaria de los agentes vacunales. Los embriones en etapa tardía son altamente susceptibles a la infección con la mayoría de los virus vacunales examinados. No todos los virus vacunales que no son patógenos para los polluelos recién nacidos también son seguros para los embriones en etapa tardía. Por ejemplo, las cepas vacunales del virus de la bronquitis infecciosa (IBV) y el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), que se utilizan habitualmente como vacunas neonatales en polluelos recién nacidos, son letales para los embriones que siguen a la inoculación *in ovo*. Estos virus se han modificado para que sean seguros para su utilización *in ovo*. La modificación de los virus debilita la respuesta inmune provocada y, por lo tanto, es un agente de vacuna menos eficaz en la protección de los embriones en etapa tardía.

- 50 El programa de vacunación resultante de vacunas tan dispares necesarias para brindar protección contra enfermedades infecciosas y pérdidas económicas es complejo. Por lo tanto, existe la necesidad de un método para provocar una respuesta inmune no específica de antígeno que mejore la protección de las aves contra las enfermedades infecciosas y que sea fácil de administrar. Además, es deseable tener un método para provocar

una respuesta inmune que proporcione una función protectora para más de un agente infeccioso. Además, existe la necesidad de un método para provocar una respuesta inmune que tenga una duración más larga o que no requiera inyecciones de refuerzo de una vacuna. El uso de CpG en un vehículo de suministro de liposomas catiónicos para la vacunación in ovo y para proteger el polluelo eclosionado contra una exposición con *E. coli* se ha descrito en la técnica (Taghavi et al. Avian Dis. 2008 Sep; 52 (3): 398-406). Además, se ha descrito en la técnica que el tratamiento con CpG-ODN protege a los polluelos neonatales contra una infección bacteriana intracelular y que el tratamiento conjunto de CpG-ODN con polifosfaceno aumenta el efecto inmunoprotector de CpG-ODN (Taghavi A. "Immunostimulatory effect of oligodeoxynucleotides containing CpG motifs in neonatal broiler chickens." Efecto inmunoestimulador de oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG (CpG-ODN) en pollos de engorde neonatales. Tesis de maestría. Saskatoon 2008). La presente invención proporciona una composición del inmunomodulador específica para su uso en la prevención de una reducción en la tasa de supervivencia cuando se administra conjuntamente con una vacuna de un polluelo nacido de un huevo de gallina embrionado, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La FIG. 1 representa gráficamente la tasa de eclosión entre grupos de huevos de gallina embrionados tratados diferencialmente. Los grupos de estudio analizados incluyen T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

20 La FIG. 2 muestra gráficamente la mortalidad diaria promedio por corral por día después de la eclosión. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

25 La FIG. 3 ilustra gráficamente la proporción de aves que sobreviven en un día de estudio particular por corral en función del número inicial de huevos embrionados. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

30 La FIG. 4 representa gráficamente la viabilidad de las aves después de la eclosión. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

35 La FIG. 5 ilustra gráficamente las tasas de supervivencia, la mortalidad en la eclosión y la mortalidad después de la eclosión hasta el día de estudio 7. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

40 La FIG. 6 representa gráficamente las tasas de supervivencia, la mortalidad en la eclosión y la mortalidad después de la eclosión hasta el día 14 de estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

45 La FIG. 7 representa gráficamente las tasas de supervivencia, la mortalidad en la eclosión y la mortalidad después de la eclosión hasta el día de estudio 21. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

50 La FIG. 8 ilustra gráficamente las tasas de supervivencia, la mortalidad en la eclosión y la mortalidad después de la eclosión hasta el día de estudio 28. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

ES 2 808 827 T3

La FIG. 9 representa gráficamente las tasas de supervivencia, la mortalidad en la eclosión y la mortalidad después de la eclosión hasta el día de estudio 35. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

- 5 La FIG. 10 representa gráficamente las tasas de supervivencia, la mortalidad en la eclosión y la mortalidad después de la eclosión hasta el día de estudio 45. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 10 La FIG. 11 muestra la tasa de mortalidad acumulada por grupo desde los embriones de 18 días hasta el día de estudio 45. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 15 La FIG. 12 muestra la tasa de mortalidad acumulada por grupo después de la eclosión, desde el día de estudio 0 hasta el día de estudio 45. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 20 La FIG. 13 muestra el aumento de peso corporal promedio total observado desde el día 0 hasta el día 7 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 25 La FIG. 14 muestra el aumento de peso corporal promedio total observado desde el día 0 hasta el día 14 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 30 La FIG. 15 muestra el aumento de peso corporal promedio total observado desde el día 0 hasta el día 21 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 35 La FIG. 16 muestra el aumento de peso corporal promedio total observado desde el día 0 hasta el día 28 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 40 La FIG. 17 muestra el aumento de peso corporal promedio total observado desde el día 0 hasta el día 35 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 45 La FIG. 18 muestra el aumento de peso corporal promedio total observado desde el día 0 hasta el día 45 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.
- 50 La FIG. 19 representa gráficamente el número de polluelos eclosionados por grupo de estudio de huevos de gallina embrionados. Los grupos de estudio analizados incluyen T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de

inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo más 1 dosis de la vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

5 La FIG. 20 ilustra gráficamente el número de polluelos vivos por grupo en el día de estudio 7. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo más 1 dosis de la vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

10 La FIG. 21 muestra una comparación de polluelos vivos y polluelos muertos por grupo en el día de estudio 7.

15 La FIG. 22 muestra el porcentaje de mortalidad por grupo de estudio hasta el día 7 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo más 1 dosis de la vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

20 La FIG. 23 ilustra gráficamente el número de aves vivas al final del estudio (día 7) para cada grupo, incluidos embriones muertos, polluelos muertos y polluelos vivos (verde). Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T2, 0.1 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T3, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y expuestos a E. coli; T4, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo más 1 dosis de la vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos; y T6, 1.0 µg de inmunomodulador / huevo y no expuestos.

La FIG. 24 representa gráficamente el porcentaje de polluelos eclosionados por grupo de estudio de huevos de gallina embrionados. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 4.

25 La FIG. 25 muestra el porcentaje de mortalidad para los grupos de estudio no expuestos a E. coli después de la eclosión hasta el día de estudio 7. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 4.

La FIG. 26 muestra el porcentaje de mortalidad para los grupos de estudio expuestos a E. coli después de la eclosión hasta el día 7 del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 4.

30 La FIG. 27 representa gráficamente el porcentaje de mortalidad para cada grupo de estudio después de la eclosión hasta el día 7 del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 4.

La FIG. 28 muestra el porcentaje de supervivencia para cada grupo de estudio después de la eclosión hasta el día 7 del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 4.

35 La FIG. 29 muestra el porcentaje de supervivencia para cada grupo de estudio en el día de estudio 7. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 4.

La FIG. 30 muestra la mortalidad semanal para cada grupo de estudio hasta los días 7 y 14 del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen un subgrupo de los enumerados en la Tabla 4.

40 La FIG. 31 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de HVT en células de bazo en la semana uno del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 5.

La FIG. 32 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de HVT en PMBC en la semana uno del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 5.

La FIG. 33 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de SB-1 en células de bazo en la semana uno del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 5.

5 La FIG. 34 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de SB-1 en PMBC en la semana uno del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 5.

La FIG. 35 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna de la MD de HVT en células de bazo en la segunda semana del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 5.

10 La FIG. 36 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de HVT en PMBC en la segunda semana del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 5.

15 La FIG. 37 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de SB-1 en células de bazo en la segunda semana del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 5.

La FIG. 38 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de SB-1 en PMBC en la segunda semana del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 5.

20 La FIG. 39 representa gráficamente la reducción de la saculitis aérea en los polluelos que recibieron el inmunomodulador in ovo, fueron vacunados contra ND y fueron expuestos. Los grupos de estudio analizados incluyen los enumerados en la Tabla 7.

La FIG. 40 representa gráficamente los ELISA en el día 26 para los grupos de estudio enumerados en la Tabla 7.

25 La FIG. 41 representa gráficamente las tasas de supervivencia de los polluelos en los grupos de estudio enumerados en la Tabla 8.

La FIG. 42 representa gráficamente la incidencia de la enfermedad de Marek entre los grupos de estudio enumerados en la Tabla 8.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 El método para provocar una respuesta inmune en un miembro de la especie aviar de la presente descripción incluye administrar al miembro de la especie aviar una cantidad eficaz de una composición del inmunomodulador para provocar una respuesta inmune en el miembro de la especie aviar. La composición del inmunomodulador de la invención incluye un vehículo de suministro de liposomas catiónicos y un plásmido de ADN que no codifica un inmunógeno para su uso en la prevención de una reducción en la tasa de supervivencia cuando se administra conjuntamente con una vacuna de una gallina nacida de un huevo de gallina eclosionado, por administración in ovo al huevo de una cantidad efectiva de 0,05 a 10 microgramos, preferiblemente de 0,1 a 5 microgramos, de la composición del inmunomodulador, en que la vacuna es una vacuna utilizada para protección contra el virus de la enfermedad de Marek (MDV). En particular, el inmunomodulador provoca una respuesta inmune no específica de antígeno que puede potenciarse aún más con la administración de al menos un agente biológico como por ejemplo una vacuna.

40 Los métodos proporcionan nuevas estrategias de tratamiento para proteger a las especies de aves de enfermedades infecciosas y tratar a las poblaciones que tienen enfermedades infecciosas. Además, al utilizar la composición del inmunomodulador de la presente descripción no hay reducción en la tasa de incubabilidad o supervivencia después de la eclosión cuando el inmunomodulador se administra in ovo y no hay reducción en la tasa de incubabilidad o supervivencia cuando se administra conjuntamente con una vacuna. Además, la preadministración del inmunomodulador antes de la administración de una vacuna mejora aún más la respuesta inmune no específica de antígeno. Los métodos de la presente descripción también permiten el uso seguro de vacunas que antes solo estaban disponibles para la administración después de la eclosión para ser utilizadas in ovo. Además, el método de la presente descripción permite la combinación de más de una vacuna con la

composición del inmunomodulador. Finalmente, el método de la presente descripción proporciona una protección más prolongada contra una enfermedad cuando el inmunomodulador se utiliza en combinación con una vacuna.

La invención se define por medio de las reivindicaciones adjuntas.

1. Composición

5 a. Inmunomodulador

En una forma de realización de la descripción, la composición del inmunomodulador incluye un vehículo de administración de liposomas y al menos una molécula de ácido nucleico, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.693.086.

10 Un vehículo de administración de liposomas adecuado comprende una composición lipídica que es capaz de administrar moléculas de ácido nucleico a los tejidos del sujeto tratado. Un vehículo de suministro de liposomas es preferiblemente capaz de permanecer estable en un sujeto durante una cantidad de tiempo suficiente para administrar una molécula de ácido nucleico y / o un agente biológico. En una forma de realización, el vehículo de administración de liposomas es estable en el sujeto receptor durante al menos aproximadamente 30 minutos. En
15 otra forma de realización, el vehículo de administración de liposomas es estable en el sujeto receptor durante al menos aproximadamente 1 hora. En otra forma de realización más, el vehículo de administración de liposomas es estable en el sujeto receptor durante al menos aproximadamente 24 horas.

Un vehículo de suministro de liposomas de la presente descripción comprende una composición lipídica que es capaz de fusionarse con la membrana plasmática de una célula para administrar una molécula de ácido nucleico a una célula. En una forma de realización, cuando se administra un ácido nucleico: el complejo de liposomas de
20 la presente descripción es al menos aproximadamente 1 picogramo (pg) de proteína expresada por miligramo (mg) de proteína tisular total por microgramo (μ g) de ácido nucleico administrado. En otra forma de realización, la eficacia de transfección de un complejo de ácido nucleico: liposoma es al menos aproximadamente 10 pg de proteína expresada por mg de proteína tisular total por μ g de ácido nucleico administrado; y en otra forma de realización adicional, al menos aproximadamente 50 pg de proteína expresada por mg de proteína tisular total
25 por μ g de ácido nucleico administrado. La eficiencia de transfección del complejo puede ser tan baja como 1 femtogramo (fg) de proteína expresada por mg de proteína tisular total por μ g de ácido nucleico administrado, en que las cantidades anteriores son más preferentes.

Un vehículo de suministro de liposomas preferente de la presente invención tiene entre aproximadamente 100 y 500 nanómetros (nm), en otra forma de realización, entre aproximadamente 150 y 450 nm y en otra forma de
30 realización más, entre aproximadamente 200 y 400 nm de diámetro.

Los liposomas adecuados incluyen cualquier liposoma, como por ejemplo los comúnmente utilizados en, por ejemplo, métodos de administración de genes conocidos por los expertos en la materia. Los vehículos de suministro de liposomas preferentes comprenden lípidos de vesículas multilamelares (MLV) y lípidos extruidos. Los métodos para la preparación de MLV son bien conocidos en la técnica. Los vehículos de suministro de
35 liposomas más preferentes comprenden liposomas que tienen una composición lipídica policationica (es decir, liposomas catiónicos) y / o liposomas que tienen una cadena principal de colesterol conjugada con polietilenglicol. Ejemplos de composiciones de liposomas catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi) propil]-N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) y colesterol, N-[1-(2,3 -dioleiloxi) propil]-N, N, N-cloruro de trimetilamonio (DOTAP) y colesterol, 1-[2-(oleiloxi) etil]-2-oleil-3-(2-hidroxi)etil imidazolinio cloruro (DOTIM) y colesterol, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y colesterol, y combinaciones de los mismos. Una composición de liposomas más preferente para ser utilizada como vehículo de administración incluye DOTIM y colesterol.
40

Una molécula de ácido nucleico adecuada incluye cualquier secuencia de ácido nucleico como por ejemplo una secuencia codificante o no codificante, y ADN o ARN. Las secuencias de ácido nucleico codificantes codifican al
45 menos una parte de una proteína o péptido, mientras que la secuencia no codificante no codifica ninguna parte de una proteína o péptido. De acuerdo con la presente descripción, los ácidos nucleicos "no codificantes" pueden incluir regiones reguladoras de una unidad de transcripción, como por ejemplo una región promotora. El término "vector vacío" puede utilizarse indistintamente con el término "no codificante", y se refiere en particular a una secuencia de ácido nucleico en ausencia de una parte de codificación de proteínas, como por ejemplo un vector plasmídico sin un inserto génico. No se requiere la expresión de una proteína codificada por la molécula de ácido
50 nucleico para obtener una respuesta inmune no específica de antígeno; por lo tanto, la molécula de ácido nucleico no necesita necesariamente estar operativamente unida a una secuencia de control de la transcripción.

Sin embargo, se pueden obtener ventajas adicionales (es decir, inmunidad específica de antígeno y mejorada) al incluir en la composición la secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica un inmunógeno y / o una citocina.

La formación de complejos de un liposoma con una molécula de ácido nucleico se puede lograr utilizando métodos estándar en la técnica o tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.693.086. Una concentración adecuada de una molécula de ácido nucleico para agregar a un liposoma incluye una concentración efectiva para administrar una cantidad suficiente de molécula de ácido nucleico en un sujeto de manera que se genere una respuesta inmune sistémica. Cuando la molécula de ácido nucleico codifica un inmunógeno o una citocina, una concentración adecuada de molécula de ácido nucleico para agregar a un liposoma incluye una concentración efectiva para administrar una cantidad suficiente de molécula de ácido nucleico en una célula de manera que la célula pueda producir suficiente proteína de inmunógeno y / o citocina para regular la inmunidad de las células efectoras de la manera deseada. En una forma de realización, se combinan de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1,0 µg de molécula de ácido nucleico con aproximadamente 8 nmol de liposomas, en otra forma de realización, se combinan de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 5 µg de molécula de ácido nucleico con aproximadamente 8 nmol de liposomas, y en otra forma de realización adicional, se combinan aproximadamente 1,0 µg de molécula de ácido nucleico con aproximadamente 8 nmol de liposomas. En una forma de realización, la relación de ácidos nucleicos por lípidos (µg de ácido nucleico: nmol de lípidos) en una composición es al menos aproximadamente 1:1 de ácido nucleico: lípido en peso (es decir, 1 µg de ácido nucleico: 1 nmol de lípido), y en otra forma de realización, al menos aproximadamente 1:5, y en otra forma de realización más, al menos aproximadamente 1:10, y en una forma de realización adicional al menos aproximadamente 1:20. Las proporciones expresadas en este documento se basan en la cantidad de lípido catiónico en la composición, y no en la cantidad total de lípido en la composición. En otra forma de realización, la relación de ácidos nucleicos por lípidos en una composición de la descripción es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:64 de ácido nucleico: lípido en peso; y en otra forma de realización, de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:50 de ácido nucleico: lípidos en peso; y una forma de realización adicional, de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 de ácido nucleico: lípidos en peso; y en otra forma de realización más, de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:30 de ácido nucleico: lípidos en peso. Otra relación de ácido nucleico: lípido es de aproximadamente 1:8 a 1:16, prefiriéndose aproximadamente de 1:8 a 1:32.

30 **b. Agente Biológico**

En otra forma de realización de la descripción, el inmunomodulador incluye un vehículo de administración de liposomas, una molécula de ácido nucleico y al menos un agente biológico.

Los agentes biológicos adecuados son agentes que son efectivos para prevenir o tratar la enfermedad aviar. Dichos agentes biológicos incluyen proteínas potenciadoras inmunes, inmunógenos, vacunas o cualquier combinación de los mismos. Las proteínas potenciadoras inmunes adecuadas son aquellas proteínas conocidas por mejorar la inmunidad. A modo de ejemplo no limitador, una citocina, que incluye una familia de proteínas, es una familia de proteínas potenciadoras de la inmunidad conocida. Los inmunógenos adecuados son proteínas que provocan una respuesta inmune humoral y / o celular de tal manera que la administración del inmunógeno a un sujeto genera una respuesta inmune específica de inmunógeno contra las mismas proteínas o proteínas similares que se encuentran dentro de los tejidos del sujeto. Un inmunógeno puede incluir un antígeno patógeno expresado por una bacteria, un virus, un parásito o un hongo. Los antígenos preferidos incluyen antígenos que provocan una enfermedad infecciosa en un sujeto. De acuerdo con la presente descripción, un inmunógeno puede ser cualquier parte de una proteína, de origen natural o derivada sintéticamente, que provoca una respuesta inmune humoral y / o celular. Como tal, el tamaño de un antígeno o inmunógeno puede ser tan pequeño como aproximadamente 5-12 aminoácidos y tan grande como una proteína de longitud completa, incluidos los tamaños intermedios. El antígeno puede ser una proteína multimérica o una proteína de fusión. El antígeno pueden ser antígenos peptídicos purificados derivados de células nativas o recombinantes. Las secuencias de ácido nucleico de las proteínas e inmunógenos potenciadores de la inmunidad están operativamente unidas a una secuencia de control de la transcripción, de modo que el inmunógeno se expresa en un tejido de un sujeto, provocando así una respuesta inmune específica del inmunógeno en el sujeto, además de la no respuesta inmune específica.

En otra forma de realización de la descripción, el agente biológico es una vacuna. La vacuna puede incluir una vacuna viva, infecciosa, viral o una vacuna viral muerta, inactivada. En una forma de realización, se pueden utilizar una o más vacunas, vacunas virales vivas o muertas, en combinación con la composición del inmunomodulador de la presente descripción. Las vacunas adecuadas incluyen las conocidas en la técnica para las especies de aves. Las vacunas ejemplares, sin limitación, incluyen las utilizadas en la técnica para la protección contra el virus de la enfermedad de Marek (MDV), el virus de la enfermedad de New Castle (NDV), el virus de la anemia de polluelo (CAV), el virus de la enfermedad de la bolsa infecciosa (IBDV), el virus de la

bronquitis infecciosa (IBV), el herpesvirus de pavo (HVT), el virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV), el virus de la encefalomiélitis aviar (AEV), el virus de la viruela aviar (FPV), el cólera de aves, el virus de la gripe aviar (AIV), reovirus, virus de la leucosis aviar (ALV), el virus de la reticuloendoteliosis (REV), el adenovirus aviar y el virus de la enteritis hemorrágica (HEV), coccidios y otras enfermedades conocidas en la técnica. En otro ejemplo, la vacuna puede ser una vacuna tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos No. 5.427.791, 6.048.535 y 6.406.702. Tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, se utiliza una vacuna para la protección de la enfermedad de Marek en combinación con la composición del inmunomodulador de la presente invención.

II Métodos

10 a. *Métodos de estimulación inmune.*

En una forma de realización de la descripción, se provoca una respuesta inmune en un miembro de la especie aviar mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición del inmunomodulador al miembro de la especie aviar. La cantidad efectiva es suficiente para provocar una respuesta inmune en el miembro de la especie aviar. El inmunomodulador incluye un vehículo de administración de liposomas y una molécula de ácido nucleico.

En una forma de realización, la cantidad efectiva del inmunomodulador es de aproximadamente 0,05 microgramos a aproximadamente 10 microgramos. En otra forma de realización, la cantidad efectiva del inmunomodulador es de aproximadamente 0,1 microgramos a aproximadamente 5 microgramos.

En otra forma de realización de la descripción, se produce una respuesta inmune en un miembro de la especie aviar mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición del inmunomodulador que incluye un vehículo de administración de liposomas, una molécula de ácido nucleico aislada y un agente biológico. Se contempla que el agente biológico pueda coadministrarse con el inmunomodulador o independientemente del mismo. La administración independiente puede ser antes o después de la administración del inmunomodulador. También se contempla que se puede utilizar más de una administración del inmunomodulador o agente biológico para extender la inmunidad mejorada. Además, más de un agente biológico puede coadministrarse con el inmunomodulador, administrarse antes del inmunomodulador o administrarse después de la administración del inmunomodulador tal como se describe en los Ejemplos de la presente memoria descriptiva. En una forma de realización, la cantidad efectiva del inmunomodulador es de aproximadamente 0,05 microgramos a aproximadamente 5 microgramos de vehículo de administración de liposomas y molécula de ácido nucleico aislada y de aproximadamente 300 a aproximadamente 30000 agente biológico del virus TCID50. En otra forma de realización, la cantidad efectiva del inmunomodulador es de aproximadamente 0,1 microgramos a aproximadamente 3 microgramos de vehículo de administración de liposomas y molécula de ácido nucleico aislada y de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 agentes biológicos del virus EID50.

b. *Enfermedades*

Los métodos de la descripción provocan una respuesta inmune en un sujeto de tal manera que el sujeto está protegido de una enfermedad que es susceptible de provocar una respuesta inmune. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "protegido de una enfermedad" se refiere a reducir los síntomas de la enfermedad; reducir la aparición de la enfermedad, y reducir la gravedad de la enfermedad. La protección de un sujeto puede referirse a la capacidad de una composición terapéutica de la presente descripción, cuando se administra a un sujeto, para prevenir que se produzca una enfermedad y / o para curar o aliviar los síntomas, signos o causas de la enfermedad. Como tal, proteger a un miembro de la especie aviar de una enfermedad incluye tanto prevenir la aparición de la enfermedad (tratamiento profiláctico) como tratar a un miembro de la especie aviar que tiene una enfermedad (tratamiento terapéutico). En particular, la protección de un sujeto contra una enfermedad se logra provocando una respuesta inmune en el miembro de la especie aviar induciendo una respuesta inmune beneficiosa o protectora que, en algunos casos, puede asimismo suprimir, reducir, inhibir o bloquear una actividad hiperactiva o respuesta inmune dañina. El término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de la salud normal de un miembro de la especie aviar e incluye un estado en el que están presentes los síntomas de la enfermedad, así como las condiciones en las que se ha producido una desviación (por ejemplo, infección, mutación genética, defecto genético, etc.), pero los síntomas aún no se han manifestado.

Los métodos de la descripción pueden utilizarse para la prevención de enfermedades, para la estimulación de la inmunidad de las células efectoras contra la enfermedad, para la eliminación de la enfermedad, para el alivio de la enfermedad y para la prevención de una enfermedad secundaria resultante de la aparición de una enfermedad primaria.

Los métodos de la descripción incluyen administrar la composición para proteger contra la infección de una amplia variedad de patógenos. La composición administrada puede incluir o no un antígeno específico para provocar una respuesta específica. Se contempla que los métodos de la descripción protegerán al sujeto receptor de la enfermedad resultante de agentes microbianos infecciosos que incluyen, sin limitación, virus, bacterias, hongos y parásitos. Las enfermedades infecciosas virales ejemplares, sin limitación, incluyen las que resultan de la infección con el virus de la anemia infecciosa de polluelo (CIAV), el virus de la enfermedad de Marek (MDV), el virus del herpes de pollo (HCV), el herpesvirus del pavo (HTV), el virus de la enfermedad de la bolsa infecciosa (IBDV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), el virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), el paramixovirus tipo 3, la encefalomiелitis aviar (AEV), el virus de la viruela aviar (FPV), el cólera de las aves, el virus de la gripe aviar (AIV), reovirus, el virus de la leucosis aviar (ALV), el virus de la reticuloendoteliosis (REV), el adenovirus aviar, el virus de enteritis hemorrágica (HEV), neumovirus, el virus de la viruela de las palomas, recombinantes de los mismos y otros virus conocidos en la técnica. Las infecciones bacterianas ejemplares, sin limitación, incluyen aquellas que resultan de la infección con bacterias y hongos gram positivos o negativos como por ejemplo *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae*, *Bordetella Sp*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium colinum*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella sp*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Clostridium botulinum*, *Hemophilus gallinarum*, *Erysipelothrix insidiosa*, *riemerella anatipestifer* (RA), y otras bacterias conocidas en la técnica. Los ejemplos de infección por hongos o mohos, sin limitación, incluyen aquellos que resultan de la infección con *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, y otros hongos o mohos infecciosos conocidos en la técnica. Las condiciones ejemplares de la enfermedad, sin limitación, incluyen aquellas que resultan de toxinas de bacterias y hongos gram positivos o negativos como por ejemplo toxinas de *clostridium perfringens*, toxina de *clostridium botulinum*, enterotoxina de *E. coli*, toxinas de estafilococo, leucotoxina de *pasteurella* y micotoxinas de *fusarium* y otras toxinas conocidas en la técnica. Los parásitos ejemplares incluyen, sin limitación, *Eimeria meleagridis*, *coccidia sp*, *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinae*, *Capillaria annulata*, *Capillaria contorta*, *Capillaria obsignata*, *Syngamus trachea* y otros parásitos conocidos en la técnica.

c. Sujetos

Los métodos de descripción pueden administrarse a cualquier sujeto o miembro de la especie aviar, ya sea doméstica o salvaje. En particular, puede administrarse a aquellos sujetos que son criados comercialmente para la cría, la carne o la producción de huevos. Los sujetos aviarios adecuados, sin limitación, incluyen pollos, pavos, gansos, patos, faisanes, codornices, palomas, avestruces, aves enjauladas, aves en colecciones zoológicas y aviarios y similares. En una forma de realización de la descripción, el miembro de la especie aviar se selecciona del grupo que consiste en pollo o pavo. Un experto en la técnica apreciará que los métodos de la descripción serán en gran medida beneficiosos para las aves criadas en criaderos de alta densidad, como por ejemplo pollos de engorde y gallinas ponedoras, ya que son especialmente vulnerables a la exposición ambiental a agentes infecciosos.

d. Administración

Se encuentra disponible una variedad de rutas de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de los agentes biológicos particulares seleccionados, de la edad y el estado general de salud del sujeto, de la condición particular que se está tratando y de la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de esta descripción se pueden practicar utilizando cualquier modo de administración que produzca niveles efectivos de una respuesta inmune sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica.

La vacunación de las aves se puede realizar a cualquier edad. Normalmente, las vacunas se realizan en embriones de 18 días (in ovo) y superiores para un microorganismo vivo y de 3 semanas en adelante para un microorganismo inactivado u otro tipo de vacuna. Para la vacunación in ovo, la vacunación se puede realizar en el último cuarto del desarrollo del embrión. La vacuna puede administrarse por vía subcutánea, foliculo de plumas, por pulverización, por vía oral, intraocular, intratraqueal, nasal, in ovo o por otros métodos conocidos en la técnica. La vacuna oral se puede administrar en el agua potable. Además, se contempla que los métodos de la descripción se pueden utilizar en base a programas de vacunación rutinarios. De acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, la composición del inmunomodulador de la presente invención se administra in ovo. En otra forma de realización, la composición del inmunomodulador se administra como un aerosol después de la exposición a *E. coli*.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de liberación por tiempo, liberación retardada o liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de las composiciones, aumentando así la conveniencia. Muchos tipos de sistemas de administración de liberación están disponibles y

- son conocidos por los expertos en la materia. Incluyen sistemas basados en polímeros como por ejemplo poli (lactida-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides como por ejemplo colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-di y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; tabletas comprimidas con aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, sistemas erosivos en los que un agente de la descripción está contenido en una forma dentro de una matriz como por ejemplo las descritas en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152, y sistemas de difusión en los que un componente activo impregna a una velocidad controlada de un polímero tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 3, 854,480, 5,133,974 y 5,407,686. Además, se pueden utilizar sistemas de administración de aparatos basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.
- Dado que se podrían realizar varios cambios en la composición, los productos y los métodos anteriores sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y en los ejemplos que se dan a continuación, se interprete como ilustrativa y no en un sentido limitativo.

DEFINICIONES

- El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad efectiva de inmunomodulador para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa es la cantidad necesaria para provocar el desarrollo de una respuesta inmune específica de antígeno tras la exposición al microbio, causando así una reducción en la cantidad de microbio dentro del sujeto y preferiblemente la erradicación del microbio. La cantidad efectiva para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección a tratar, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la materia puede determinar empíricamente la cantidad efectiva de inmunomodulador sin necesidad de experimentación excesiva.
- El término "citocina" se refiere a una familia de proteínas potenciadoras del sistema inmune. La familia de las citocinas incluye el factor de crecimiento hematopoyético, interleucinas, interferonas, moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas, moléculas de la familia del factor de necrosis tumoral y quimiocinas (es decir, proteínas que regulan la migración y activación de las células, particularmente las células fagocíticas). Las citocinas ejemplares incluyen, sin limitación, interleucina-2 (IL-2), interleucina -12 (IL12), interleucina-15 (IL-15), interleucina-18 (IL-18), interferón-a (IFN α) interferón-a (IFN α) e interferón α (IFN α).
- El término "provocar" se puede usar indistintamente con los términos activar, estimular, generar o regular al alza.
- El término "provocar una respuesta inmune" en un sujeto se refiere a controlar o influir específicamente en la actividad de la respuesta inmune, y puede incluir activar una respuesta inmune, regular al alza la respuesta inmune, mejorar una respuesta inmune y / o alterar una respuesta inmune (como por ejemplo provocando un tipo de respuesta inmune que a su vez cambia el tipo prevalente de respuesta inmune en un sujeto de uno que es dañino o ineficaz a uno que es beneficioso o protector).
- El término "unido operativamente" se refiere a unir una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la transcripción de tal manera que la molécula pueda expresarse cuando se transfecta (es decir, se transforma, transduce o transfecta) en una célula huésped. Las secuencias de control transcripcional son secuencias que controlan el inicio, el alargamiento y la terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, como las secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Los expertos en la materia conocen una variedad de dichas secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de transcripción preferidas incluyen aquellas que funcionan en células de aves, peces, mamíferos, bacterias, plantas e insectos. Aunque se puede utilizar cualquier secuencia de control de la transcripción con la invención, las secuencias pueden incluir secuencias de control de la transcripción de origen natural asociadas de forma natural con una secuencia que codifica un inmunógeno o una proteína estimuladora del sistema inmunitario.
- Los términos "molécula de ácido nucleico" y "secuencia de ácido nucleico" pueden utilizarse indistintamente e incluyen ADN, ARN o derivados de ADN o ARN. Los términos también incluyen oligonucleótidos y secuencias más grandes, que incluyen tanto moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína o un fragmento de la misma, como moléculas de ácido nucleico que comprenden regiones reguladoras, intrones u otro ADN o ARN no codificante. Habitualmente, un oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico de aproximadamente 1 a

aproximadamente 500 nucleótidos, y más habitualmente, tiene al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud. La molécula de ácido nucleico puede derivarse de cualquier fuente, incluidas fuentes de mamíferos, peces, bacterias, insectos, virus, plantas o sintéticas. Se puede producir una molécula de ácido nucleico mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica, como por ejemplo la tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación, clonación) o síntesis química. Las moléculas de ácido nucleico incluyen moléculas de ácido nucleico natural y sus homólogos, que incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas naturales y moléculas de ácido nucleico modificadas en las que los nucleótidos se han insertado, eliminado, sustituido o invertido de tal manera que dichas modificaciones no interfieren sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico para codificar un inmunógeno o una proteína estimulante del sistema inmune útil en los métodos de la presente descripción. Se puede producir un homólogo de ácido nucleico utilizando diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación Molecular. Un manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Labs Press, 1989). Los expertos en la técnica conocen técnicas para evaluar la inmunogenicidad, como por ejemplo la inmunogenicidad del antígeno patógeno o la actividad de las citocinas e incluyen una variedad de ensayos in vitro e in vivo.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran diversas formas de realización de la descripción.

Ejemplo 1. Materiales y métodos.

Inmunomodulador

El inmunomodulador utilizado en este estudio fue una composición que comprende un lípido catiónico y un ADN no codificante. Los componentes lipídicos del inmunomodulador sintético [1- [2- [9- (Z) -octadecenoiloxi]] - 2- [8] (Z) -heptadecenil] -3- [hidroxietil] imidazolinio cloruro (DOTIM) y un colesterol lipídico neutro sintético fueron formulados para producir liposomas de aproximadamente 200 nm de diámetro (Véase, Patente de los Estados Unidos 6.693.086). El componente de ADN era un plásmido de ADN no codificante de 4292 pares de bases (pMB 75.6) producido en E. coli, que, al estar cargado negativamente, se asocia con los liposomas cargados positivamente (catiónicos) (Ver, Patente de Estados Unidos 6.693.086).

Tabla 1. Esquema de dilución del inmunomodulador para dosis administradas a 600 huevos / grupo.

Grupo	Dosis Objetivo (microgramo / huevo)	Dosis Calculada (microgramo)	Volumen Acumulado (ml.)	Diluyente (D5W) (mL)	Volumen Total (mL)	Volumen de Dosis por Animal (mL)
T1	0	0	0	25.00	25.00	0.05
T2	0.1	0.11	0.15	24.85	25.00	0.05
T3	1.0	1.02	1.50	23.50	25.00	0.05
T4	10.0	9.97	14.70	10.3	25.00	0.05
T5	0	0	0	25.00	25.00	0.05
T6	1.0	1.02	1.50	23.50	25.00	0.05

Animales de Estudio

5 Los huevos de gallina disponibles en el mercado (polluelos de carne) se sometieron a análisis para determinar la viabilidad a los 18 días de incubación. Se incluyeron embriones sanos en los estudios y se descartaron embriones infértiles, muertos y no saludables. Los polluelos fueron alojados en un gallinero convencional al estilo de California. Cada corral tenía 50 aves colocados en línea recta en el día 0. Los polluelos fueron alimentados con raciones que cumplían con las recomendaciones de MRC para la edad y el peso de los animales de estudio y los polluelos tenían acceso ad libitum al agua provista a través de un bebedero conectado al suministro de agua para cada corral.

Infección Experimental y Exposición

15 Los polluelos fueron expuestos con organismos para determinar la eficacia de la respuesta inmune. La exposición, o infección experimental, incluyó la exposición a un inóculo de organismos como Escherichia coli (E. coli). Los organismos se utilizaron a una concentración de 2.63×10^5 y se administraron por pulverización de 0,15 ml de los inóculos en cada huevo embrionado mientras estaban en la bandeja de eclosión.

Ejemplo 2. La administración del inmunomodulador aumenta la capacidad de eclosión.

20 Se realizó un estudio para determinar la eficacia de un inmunomodulador, tal como se describe en el ejemplo 1, administrado a huevos de gallina embrionados de 18 días seguido de exposición a Escherichia coli (E. coli). El estudio incluyó dos grupos (Tabla 2), un grupo expuesto a E. coli (T1-4) y el otro no expuesto (T5 y T6). Dentro del grupo expuesto a E. coli, había cuatro subgrupos a los que se les administró una dosis diferente de inmunomodulador, incluidas dosis de ninguna (T1), 0.1 µg (T2), 1.0 µg (T3) y 10.0 µg (T4). El grupo no expuesto incluía dos subgrupos a los que no se les administró inmunomodulador (T5) o se les administró 1,0 µg de inmunomodulador (T6).

Tabla 2. Grupos de Tratamiento del Estudio

Grupo	Inmunomodulador	Exposición a E. coli
T1	0	Sí
T2	0.1 µg / huevo	Sí
T3	1.0 µg / huevo	Sí
T4	10.0 µg / huevo	Sí
T5	0	No
T6	1.0 µg / huevo	No

5 El día 0 del estudio, se inyectaron in ovo huevos embrionados de 18 días que recibieron el inmunomodulador. El día 1, se rociaron huevos embrionados de 19 días de edad en los grupos expuestos (T1-T4) con 0,15 ml de inóculos que contenían E. coli a una concentración de $2,63 \times 10^5$.

10 El análisis de todos los grupos resultó en un efecto de tratamiento estadísticamente significativo sobre la eclosionabilidad de los huevos embrionados. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos de control no expuestos (T5, 0 µg / huevo al 91% versus T6, 1.0 µg / huevo al 89%). Además, la comparación entre los dos grupos no tratados (T1-expuesto y T5-no expuesto) resultó en más eclosiones de huevos embrionados en el grupo no expuesto (85% contra 91%, respectivamente). Por lo tanto, el modelo de exposición se confirmó como un modelo efectivo para evaluar las tasas de eclosión.

15 Para aquellos grupos tratados con el inmunomodulador, el grupo T3 (1.0 µg / huevo - huevos tratados) eclosionó más aves (91.5%) que el T1 no tratado / expuesto (84.5%) o el T4 (10.0 µg / huevo - huevos tratados). huevos) (85%) (FIG. 1). Se mostraron diferencias similares entre el grupo de control no tratado / no expuesto (T5) y estos mismos dos grupos de tratamiento (T1, tal como se ha indicado anteriormente, y T4). No se mostraron otros hallazgos significativos entre ninguna de las comparaciones de grupos restantes por pares (Figura 1).

20 No hubo diferencias significativas en la proporción de aves que mueren por corral, por grupo, por día de estudio. (FIG. 2). La proporción de aves que sobrevivieron en cualquier día de estudio en particular no dio lugar a una interacción estadísticamente significativa entre el tratamiento y el tiempo, pero sí mostró un efecto significativo del tratamiento (FIG. 3). Las aves en los grupos T3, T5 y T6 tuvieron significativamente más aves en cualquier día en comparación con los grupos T1, T2 y T4. Además, las aves T5 también tenían significativamente más aves vivas que T3. La evaluación de la viabilidad de las aves después de la eclosión dio como resultado hallazgos significativos similares a los anteriores (Figuras 4-12).

25 No se observaron diferencias significativas en los pesos de los corrales en los días 7, 14, 21 o 28 (Figuras 13-16). Los análisis de los pesos totales de los corrales en el día 35 dieron como resultado una diferencia significativa entre los grupos T5 y T2 (un promedio de 87 kg frente a 75 kg, respectivamente) (FIG. 17). Los pesos de los corrales al final del estudio (día 45) fueron mayores para los grupos T5 (120 kgs) y T6 (117 kgs) en comparación con T1 (105 kgs) y T5 en comparación con T2 (106 kgs) y T4 (105 kgs) (FIG. 18).

30 En resumen, se evaluó el efecto del inmunomodulador cuando se administra in ovo antes de la infección por E. coli en polluelos de engorde comerciales. Para aquellos grupos tratados con el inmunomodulador, el grupo T3 eclosionó más aves (92%) que el grupo T1 no tratado / expuesto (85%) o el grupo T4 (85%). Se mostraron diferencias similares entre el grupo de control no tratado / no expuesto (T5) y los mismos grupos de tratamiento T1 y T4. No hubo diferencias significativas en la mortalidad (FIG. 2-12) y los pesos corporales (FIG. 13-18). En este estudio, el inmunomodulador fue eficaz para aumentar la eclosionabilidad de los huevos de engorde comerciales expuestos con E. coli antes de la eclosión, especialmente a la dosis de 1.0 µg que indica una inmunidad mejorada entre los grupos receptores de inmunomodulador.

Ejemplo 3. La administración del inmunomodulador aumenta la inmunidad no específica de antígeno.

40 Se realizó un estudio para determinar el efecto de un inmunomodulador, tal como se describe en el ejemplo 1, en pollos vacunados contra la enfermedad de Marek expuestos a E. coli. El estudio incluyó dos grupos, un grupo expuesto a E. coli (T1-T4) y el otro no expuesto (T5 y T6). Dentro del grupo expuesto a E. coli, había cuatro subgrupos a los que se les administró una dosis diferente de inmunomodulador, incluyendo dosis de ninguna (T1), 0.1 µg (T2), 1.0 µg (T3), 1.0 µg más 1 dosis de vacuna de Marek (T4) (Tabla 3). El grupo no expuesto incluía dos subgrupos a los que no se les administró inmunomodulador (T5) o se les administró 1,0 µg de inmunomodulador (T6).

Tabla 3. Grupos de Tratamiento del Estudio

Grupo	Administración in ovo	Número de huevos embrionados	Número de corrales
T1	0 µg inmodulador / huevo	1000	12
T2	0.1 µg inmodulador / huevo	1000	12
T3	1.0 µg inmodulador / huevo	1000	12
T4	1.0 µg inmodulador / huevo + 1 dosis de vacuna de Marek / huevo	1000	12
T5	0 µg inmodulador / huevo	1000	12
T6	1.0 µg inmodulador / huevo	1000	12

5 Los huevos de engorde comerciales se incubaron durante 18 días, se analizaron para garantizar su viabilidad y luego se inyectaron huevos embrionados de 18 días que recibieron el inmunomodulador. A continuación, los huevos embrionados de 19 días de edad en los grupos expuestos se pulverizaron con 0,15 ml de inóculo que contenía E. coli a una concentración de $2,8 \times 10^7$ por mililitro. Los huevos eclosionaron el día 0 del estudio, que se extendió durante 45 días.

10 Se registró el número de huevos embrionados eclosionados para cada grupo (n = 1000 por grupo o bandeja de eclosión) (FIG. 19). De los polluelos eclosionados, se registró el número de polluelos vivos restantes el día 7 después de la eclosión (FIG. 20). También se registró el número de polluelos vivos / muertos por grupo el día 7 después de la eclosión (FIG. 21). El porcentaje de mortalidad disminuyó con el aumento del inmunomodulador en los grupos expuestos y la administración conjunta de la vacuna de Marek con el inmunomodulador disminuyó aún más el porcentaje de mortalidad (FIG. 22).

15 Los datos demuestran que no hubo reducción en la eclosionabilidad entre los grupos tratados con inmunomodulador y los grupos no tratados que no fueron expuestos con E. coli (FIG. 23). La eclosionabilidad fue significativamente mayor entre los grupos tratados con inmunomodulador y los grupos no tratados que fueron expuestos a E. coli. La eclosionabilidad de los huevos embrionados que reciben el inmunomodulador y una dosis de la vacuna de Marek fue similar a la del control no tratado y no expuesto. En resumen, el inmunomodulador aumenta la eclosionabilidad en condiciones de exposición y la respuesta protectora del inmunomodulador se mejora con la administración conjunta de la vacuna de Marek. Los resultados indican que se produce una respuesta inmune no específica de antígeno con la administración del inmunomodulador o el inmunomodulador y la vacuna de Marek.

Ejemplo 4. La administración del inmunomodulador provoca una respuesta inmune no específica de antígeno que se potencia con la administración adicional de un agente biológico.

25 Se realizó un estudio para determinar el efecto de un inmunomodulador en pollos vacunados contra la enfermedad de Marek expuestos a E. coli. El estudio incluyó nueve grupos que fueron tratados de forma diferencial tal como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos de Grupos del Estudio

Grupo	Administración in ovo	Número de huevos	Vacuna de la enfermedad de Marek (embriones de 18 días de vida)	Embriones de 18 días de vida tratados con inmunomodulador	Embriones de 19 días de vida expuestos a E. coli	Polluelos de 0 días tratados con inmunomodulador
T1	0 µg de inmunomodulador / huevo	400	Sí	No	No	No
T2	0 µg de inmunomodulador / huevo	400	Sí	No	Sí	No
T3	1.0 µg de inmunomodulador / huevo	400	Sí	No	No	Sí
T4	1.0 µg de inmunomodulador / huevo	400	Sí	No	Sí	Sí
T5	1.0 µg de inmunomodulador / huevo	400	Sí	Sí	No	No
T6	1.0 µg de inmunomodulador / huevo	400	Sí	Sí	Sí	No
T7	1.0 µg de inmunomodulador / huevo	400	Sí	Sí	No	Sí
T8	1.0 µg de inmunomodulador / huevo	400	Sí	Sí	Sí	Sí
T9	0 µg de inmunomodulador / huevo	400	No	No	No	No

5 Los huevos de engorde comerciales se incubaron durante 18 días, se analizaron para garantizar su viabilidad y a continuación se inyectaron huevos embrionados de 18 días que recibieron el inmunomodulador. A continuación, se rociaron huevos embrionados de 19 días de edad en los grupos expuestos con 0,15 ml de inóculos que contenían E. coli a una concentración de $2,63 \times 10^5$ por mililitro. Los huevos eclosionaron el día 0 del estudio, que se extendió durante 45 días.

10 Se calculó el porcentaje de huevos embrionados eclosionados para cada grupo (FIG. 24). De los polluelos eclosionados, el porcentaje de mortalidad se calculó el día 7 después de la eclosión para los grupos expuestos (FIG. 26) y no expuestos (FIG. 25). Los grupos expuestos demostraron porcentajes de mortalidad más altos que los grupos no expuestos tratados de manera similar (FIG. 27). El porcentaje de polluelos vivos por grupo se calculó desde la eclosión hasta el día 7 (FIG. 28), así como desde el día 3 (embrión vivo de 18 días) hasta el día 7 (FIG. 29, n = 400). Se produjo una tasa de supervivencia significativamente mayor para las aves tratadas con inmunomodulador antes de la exposición (> 98.2%, FIG. 28) en comparación con el grupo de control que fue expuesto (82.2%, FIG. 28). Además, se produjo una tasa de supervivencia significativamente mayor en el día 7 para las aves tratadas en la eclosión con inmunomodulador antes y después de la exposición en el día 7 (95%, FIG. 28) en comparación con los grupos de control expuestos (82.2%, FIG. 28). Estos resultados se recapitulaban utilizando un conjunto que contenía 400 huevos por grupo (FIG. 29). Se produjo una mayor tasa de supervivencia en el día 7 para los embriones tratados antes de la exposición (conjunto 400) (> 94.3%, FIG. 29) en comparación con el grupo de control (67.0%, FIG. 29). Del mismo modo, se produjo una tasa de

5 supervivencia significativamente mayor para las aves tratadas con inmunomodulador in ovo (97.4%, FIG. 30, sin segundo tratamiento, en el día 14 en comparación con el grupo de control expuesto (81.9%, FIG. 30). Hubo significativamente más aves vivas en el día 14 en el grupo tratado con el inmunomodulador en el día 1 de edad, después de la exposición, 93.9% (FIG. 30), sin primer tratamiento, en comparación con el grupo de control 81.9% (FIG. 30). También hubo significativamente más aves vivas en el día 14 en el grupo tratado con el inmunomodulador in ovo y a continuación en el día 1 de edad, 95.8% (FIG. 30), en comparación con el grupo de control, 81.9% (FIG. 30). La FIG. 30 muestra la mortalidad semanal de los grupos expuestos y no expuestos con diferentes tratamientos.

10 Los datos demuestran que no hubo reducción en la eclosionabilidad entre los grupos tratados con inmunomodulador (tratados una o dos veces) y los grupos no tratados que no fueron expuestos a E. coli. La eclosionabilidad fue mayor en los grupos que fueron tratados con el inmunomodulador antes de la exposición con E. coli. Este efecto se mejoró cuando el inmunomodulador se administró conjuntamente con la vacuna de Marek. Además, el tratamiento inmunomodulador se correlacionó con una disminución de la mortalidad entre los grupos no expuestos. La mortalidad disminuyó aún más con la administración conjunta de la vacuna de Marek y el pretratamiento con el inmunomodulador antes de la administración del inmunomodulador con la vacuna de Marek. Estos resultados fueron recapitulados en los grupos expuestos. En resumen, el inmunomodulador aumenta la eclosionabilidad en condiciones de exposición y la respuesta protectora del inmunomodulador se mejora con la administración conjunta de la vacuna de Marek. Los resultados indican que la respuesta inmune no específica de antígeno provocada por la administración del inmunomodulador aumenta cuando su administración se acompaña de la vacuna de Marek. La administración conjunta del inmunomodulador con la vacuna de Marek mejora aún más la respuesta inmune no específica de antígeno.

Ejemplo 5. La administración del inmunomodulador después de la infección que provoca una respuesta inmune no específica de antígeno que se potencia con la administración adicional de un agente biológico.

25 Se produjo una tasa de supervivencia significativamente mayor para las aves tratadas con inmunomodulador después de la exposición (95%, FIG. 28) en comparación con los grupos de control expuestos (82.2%, FIG. 28). Estos resultados se recapitularon utilizando un conjunto que contenía 400 huevos por grupo (FIG. 29).

30 Los resultados indican que la respuesta inmune no específica de antígeno provocada por la administración del inmunomodulador después de la exposición a E. coli aumenta cuando su administración se acompaña de la vacuna de Marek. La administración posterior del inmunomodulador después de la vacuna de Marek mejoró la respuesta inmune no específica de antígeno.

Ejemplo 6. La administración del inmunomodulador con un agente biológico bivalente no inhibe la replicación temprana del agente biológico bivalente.

35 Se realizó un estudio para determinar si un inmunomodulador afectaría negativamente la replicación temprana de la vacuna bivalente de la enfermedad de Marek. La vacuna bivalente de la enfermedad de Marek incluye HVT (virus del herpes de pavo) y SB1 (virus del herpes de pollo).

Los huevos de engorde comerciales se incubaron durante 18 días, y se analizó su viabilidad. Los huevos se separaron en 3 grupos, A-C con 20 huevos por grupo. Cada huevo fue vacunado tal como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5: Tratamiento

Grupo	Administración in ovo	Número de huevos embrionados de 18 (huevos que eclosionaron)	Vacuna de la enfermedad de Marek (embriones de 18 días de vida)	Embriones de 18 días de vida tratados con inmunomodulador
A	0 µg de inmunomodulador / huevo	20 (12)	NVT- SB1	No
B	1.0 µg de inmunomodulador / huevo	20 (18)	NVT- SB1	Sí
C	0 µg de inmunomodulador / huevo	20 (14)	Ninguna	No

5 Para evaluar el efecto del inmunomodulador sobre la replicación del virus de la vacuna in vivo, se realizó un nuevo aislamiento del virus a los 7 y 14 días después de la colocación de las células de bazo (SPC) y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Dado que la infección por el virus de la vacuna de la MD es conocida por la variación de aves a aves en el nivel de replicación del virus, el re-aislamiento se realizó utilizando grupos triplicados de polluelos (2 polluelos por grupo, 3 grupos por punto de muestreo).

10 A pesar de la variabilidad entre los grupos, existe una clara tendencia en la replicación de HVT y SB-1 en presencia del inmunomodulador. Estos datos fueron más significativos para la replicación de SB-1 durante la primera semana, pero las tendencias generales para HVT y SB-1 fueron similares para ambos tejidos en ambos puntos temporales (7 y 14 días después de la eclosión). Los datos se resumen en las FIG. 31-38. La FIG. 31 muestra el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de HVT en células de bazo en la semana 1. La FIG. 32 muestra el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de HVT en PBMC en la semana 1. La FIG. 33 muestra el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de SB-1 en células de bazo en la semana 1. La FIG. 34 muestra el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de SB-1 en PBMC en la semana 1. La FIG. 35 muestra el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de HVT en células de bazo en la semana 2. La FIG. 36 muestra el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de HVT en PBMC en la semana 2. La FIG. 37 muestra el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de SB-1 en células de bazo en la semana 2. La FIG. 38 muestra el efecto del inmunomodulador en la replicación de la vacuna de la MD de SB-1 en PBMC en la semana 2.

25 El inmunomodulador no tiene un impacto negativo en la replicación de la vacuna de la MD. El inmunomodulador parece tener un efecto adyuvante que aumenta la replicación de HVT y SB-1 en las primeras dos semanas después de la infección. Estos datos sugieren que el inmunomodulador tendría un impacto positivo en la eficacia de la vacuna de la MD.

Ejemplo 7. La administración del inmunomodulador con un agente biológico vivo modificado interfiere con el agente biológico vivo modificado

30 Se realizó un estudio para determinar el efecto de un inmunomodulador con pollos vivos vacunados contra la enfermedad de Newcastle modificada y expuestos a la enfermedad de Newcastle. El estudio incluyó nueve grupos que fueron tratados de manera diferencial, tal como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos de Grupos del Estudio

Día	Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
-3	Inmunomodulador (μg) in ovo				0.112	0.56	1.12			
	PBS in ovo	X	X	X				X	X	X
0	Asignar de forma aleatoria los polluelos que serán incluidos en el estudio	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Obtener sangre para títulos anti-NDV de polluelos seleccionados del estudio	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Inmunomodulador (μg) por aerosol							0.112	0.56	1.12
	Aerosol inmunomodulador			X	X	X	X	X	X	X
	Aerosol en PBS	X	X							
7	Obtener sangre para títulos anti-NDV	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	Obtener sangre para títulos anti-NDV	X	X	X	X	X	X	X	X	X
21	Obtener sangre para títulos anti-NDV	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Exposición a NDV		X	X	X	X	X	X	X	X
22-26	Observar los signos clínicos de infección por NDV	X	X	X	X	X	X	X	X	X
26	Patología macroscópica de la saculitis aérea.	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Histopatología traqueal	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Los huevos de engorde comerciales se incubaron durante 18 días, y se analizó su viabilidad. Los huevos se separaron en 9 grupos, T1-T9 con 60 huevos por grupo. El grupo T9 sufrió un ataque por parte de parásitos la primera noche después de la eclosión y hubo algunas muertes por causas desconocidas en el transcurso del estudio. En el momento del sacrificio, el número de aves por grupo era el que figura en la Tabla 7.

5

Tabla 7. Aves por grupo

Grupo	Tratamiento	Número de aves
1	Sin tratamiento, sin exposición	60
2	Solamente exposición	60
3	Vacuna + Exposición	60
4	Vacuna + Exposición + 0.112 µg de inmunomodulador in ovo	58
5	Vacuna + Exposición + 0.56 µg de inmunomodulador in ovo	58
6	Vacuna + Exposición + 1.12 µg de inmunomodulador in ovo	57
7	Vacuna + Exposición + 0.112 µg de inmunomodulador en aerosol	60
8	Vacuna + Exposición + 0.56 µg de inmunomodulador en aerosol	59
9	Vacuna + Exposición + 1.12 µg de inmunomodulador en aerosol	50

5 Los huevos embrionados de 18 días de edad en los grupos T4-T6 fueron inyectados con el inmunomodulador in ovo. Los grupos T1-T3 y T7-T9 fueron inyectados con solución salina. El día 0, los huevos eclosionaron y los polluelos en los grupos T1-T2 se rociaron con solución salina, los grupos T3-T6 recibieron la vacuna Newcastle, Newhatch-C2 fabricada por Intervet / Schering-Plough Animal Health, los grupos T7-T9 se rociaron con inmunomodulador y fueron vacunados.

10 Se obtuvo suero para títulos anti-NDV en los días 7, 14 y 21 después de la eclosión. En el día 21, los polluelos de los Grupos T2-T9 fueron expuestos con el virus lentogénico de la enfermedad de Newcastle. En el día 26, los polluelos fueron sacrificados, sangrados, se examinó la patología macroscópica de saculitis aérea y se realizó el análisis de suero.

15 Los datos demuestran que no hubo diferencias significativas en la serología entre los grupos en los días 7, 14 y 21. Sin embargo, el día 26, que fue 5 días después de la exposición, las aves que recibieron el inmunomodulador in ovo habían aumentado drásticamente los títulos de anti-NDV en todos los demás grupos, incluida la vacuna sola (FIG. 40).

La saculitis aérea se redujo drásticamente entre T2-T5, los polluelos que recibieron el modulador in ovo (FIG. 39). Los resultados indican que la administración in-ovo del inmunomodulador no interfiere con la vacunación de NDV.

20 **Ejemplo 8. Efectividad de la administración del inmunomodulador con agente biológico en una exposición virulenta**

Se realizó un estudio para evaluar la interferencia de una dosis única de inmunomodulador con la vacunación de rutina contra la enfermedad de Marek en huevos embrionados de 18 días. El estudio comparó la eficacia de la vacunación contra la enfermedad de Marek con una exposición virulenta.

25 Un total de 160 huevos embrionados se dividieron en 8 grupos. En la eclosión, se inoculó a cada ave portadora con el virus de la enfermedad de Marek, el día 0 del estudio. El número de aves portadoras que eclosionaron fue de 148 de 160 (véase la tabla 8 a continuación para ver el número inicial de huevos / aves versus aves reales al final del estudio en paréntesis). Después de tres semanas, se agregaron 80 aves más a cada grupo, 15 aves no vacunadas y no tratadas (contactos) y 65 aves tratadas (vacunados) (véase la Tabla 8 a continuación para el tratamiento de cada grupo).

30

Tabla 8: Tratamiento

Espacio	Grupo	Vacuna	Dosis	Ruta	Portadores	Contactos	Vacunados
2	A	HVT/SB1	1X	in ovo	20 (19)	15 (15)	65 (59)
3	A	HVT/SB1 + Inmunomodulador	1X	in ovo	20 (19)	15 (15)	65 (58)
4	A	HVT/SB1	1X	in ovo	20 (19)	15 (15)	65 (58)
5	A	HVT/SB1 + Inmunomodulador	1X	in ovo	20 (19)	15 (15)	65 (58)
6	A	HVT/SB1	1X	in ovo	20 (18)	15 (14)	65 (59)
7	A	HVT/SB1 + Inmunomodulador	1X	in ovo	20 (18)	15 (14)	65 (58)
8	A	HVT/SB1	1X	in ovo	20 (18)	15 (14)	65 (59)
9	A	HVT/SB1 + Inmunomodulador	1X	in ovo	20 (18)	15 (14)	65 (57)

5 En el día 42 del estudio, se retiraron las aves portadoras sobrevivientes y se les realizó una autopsia. En el día 63 del estudio (día 42 para los contactos y las vacunas), las aves del estudio sobrevivientes fueron retiradas y neocropsizadas.

10 La FIG. 41 muestra las curvas de supervivencia de aves portadoras inoculadas, aves de contacto no vacunadas, solo aves vacunadas, aves vacunadas / inmunomoduladoras. Los datos de contacto no vacunados son la media de 8 corrales, mientras que cada grupo vacunado es la media de 4 corrales cada uno. Tal como se puede observar, existe una similitud en la pendiente de las curvas de supervivencia para las aves vacunadas y las aves vacunadas / inmunomoduladoras.

15 La FIG. 42 muestra la incidencia media de la enfermedad de Marek entre las aves portadoras inoculadas, las aves de contacto no vacunadas, solo las aves vacunadas, las aves vacunadas / inmunomoduladoras. Tanto las portadoras como los datos de contacto son la media de 8 corrales, mientras que los grupos vacunados son la media de 4 corrales cada uno. Tal como se puede observar, el grupo vacunado solamente y el grupo vacunado / inmunomodulador tuvieron una incidencia mucho menor de la enfermedad de Marek. El grupo vacunado / inmunomodulador tuvo una menor incidencia de la enfermedad de Marek que el grupo solamente vacunado.

Tal como se puede apreciar en las FIG. 41-42, el inmunomodulador no tiene un efecto nocivo sobre la protección de la vacuna contra la Enfermedad de Marek. De hecho, provocó un aumento en la eficacia de la vacuna.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de inmunomodulador, en que la composición del inmunomodulador comprende:
 - 5 a. un vehículo catiónico de administración de liposomas; y
 - b. un plásmido de ADN que no codifica un inmunógeno,
para su utilización en la prevención de una reducción en la tasa de supervivencia cuando se
10 administra conjuntamente con una vacuna de un pollo eclosionado de un huevo de gallina
embrionado, por administración *in ovo* al huevo de una cantidad efectiva de 0,05 a 10 microgramos,
preferentemente de 0,1 a 5 microgramos, de la composición del inmunomodulador,
en que la vacuna es una vacuna utilizada para protección contra el virus de la enfermedad de
Marek (MDV).
- 15 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en que el plásmido de ADN es un vector aislado de
ácido nucleico derivado de bacterias sin un inserto génico, o un fragmento del mismo.
3. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en que la composición del
inmunomodulador se administra a un huevo de gallina embrionado en el día 18 de incubación.
- 20 4. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el vehículo de
administración de liposomas comprende lípidos seleccionados del grupo que consiste en lípidos de
vesículas multilamelares y lípidos extruidos.
- 25 5. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que el vehículo de
administración de liposomas catiónicos comprende pares de lípidos seleccionados del grupo que
consiste en DOTMA y colesterol; DOTAP y colesterol; DOTIM y colesterol; y DDAB y colesterol.
6. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que el vehículo de
administración de liposomas catiónicos comprende DOTIM y colesterol.

FIG 1

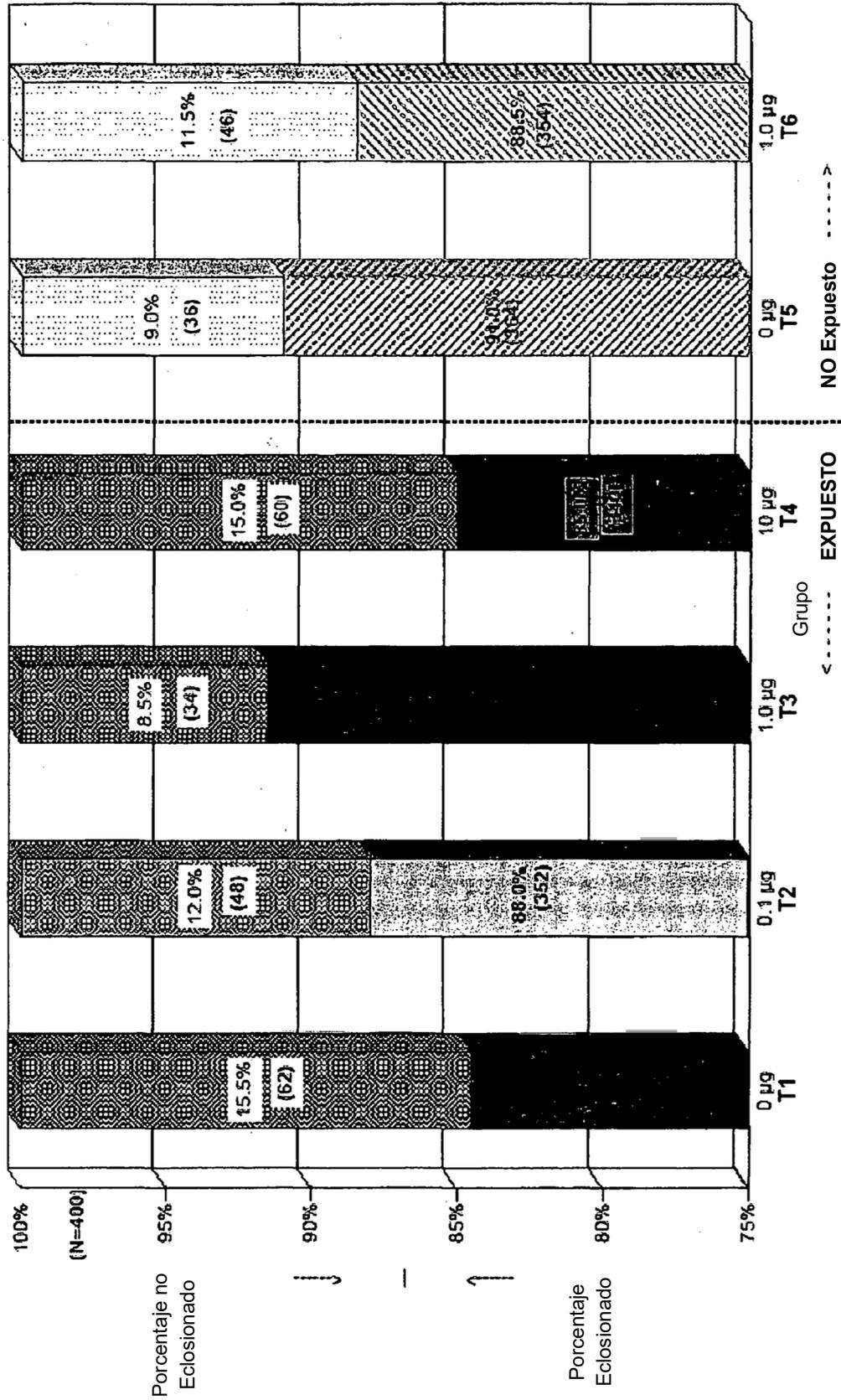


Fig 2

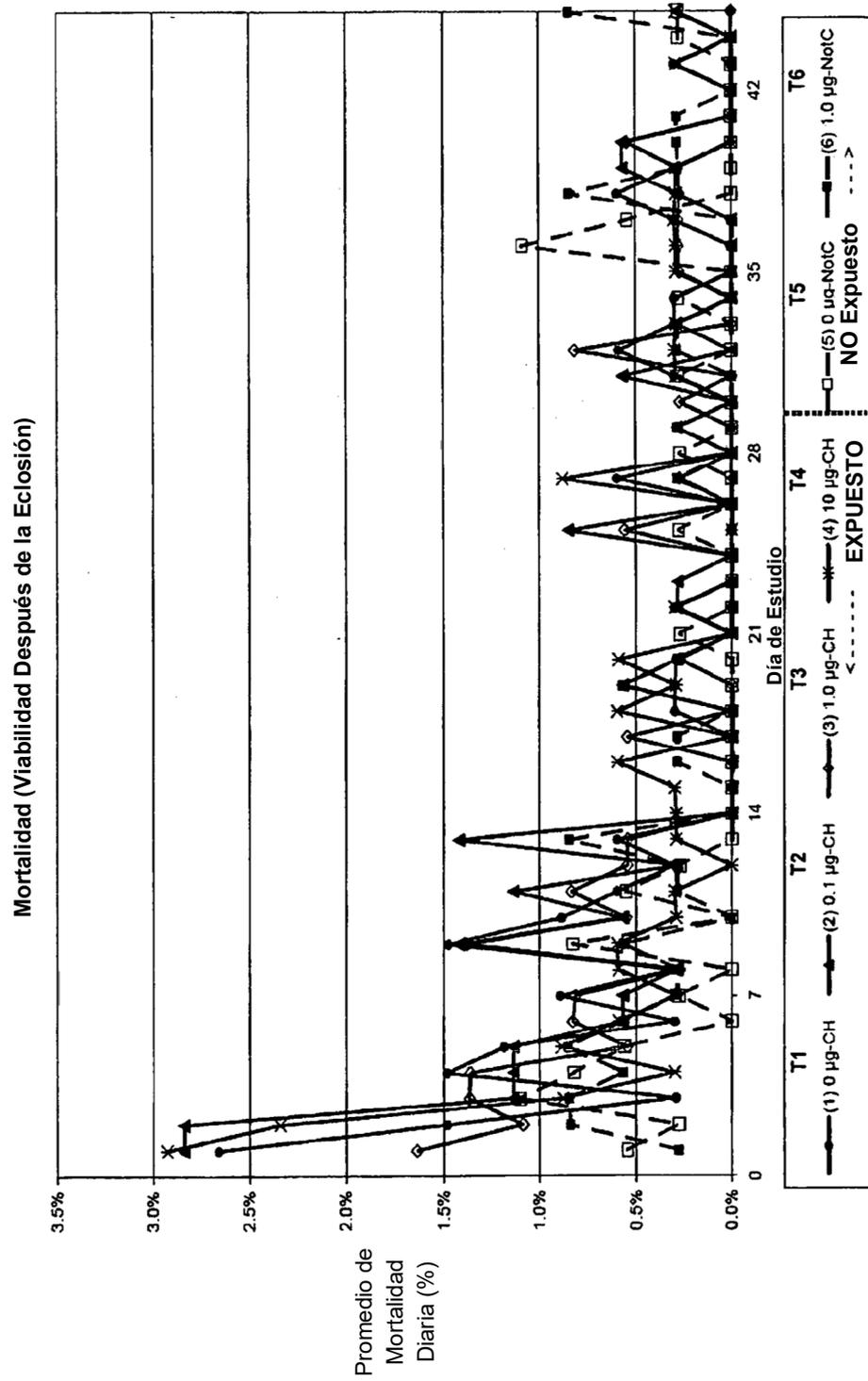


Fig 3

Supervivientes A partir de embriones de 18 días de vida
(N = 400 huevos por grupo)

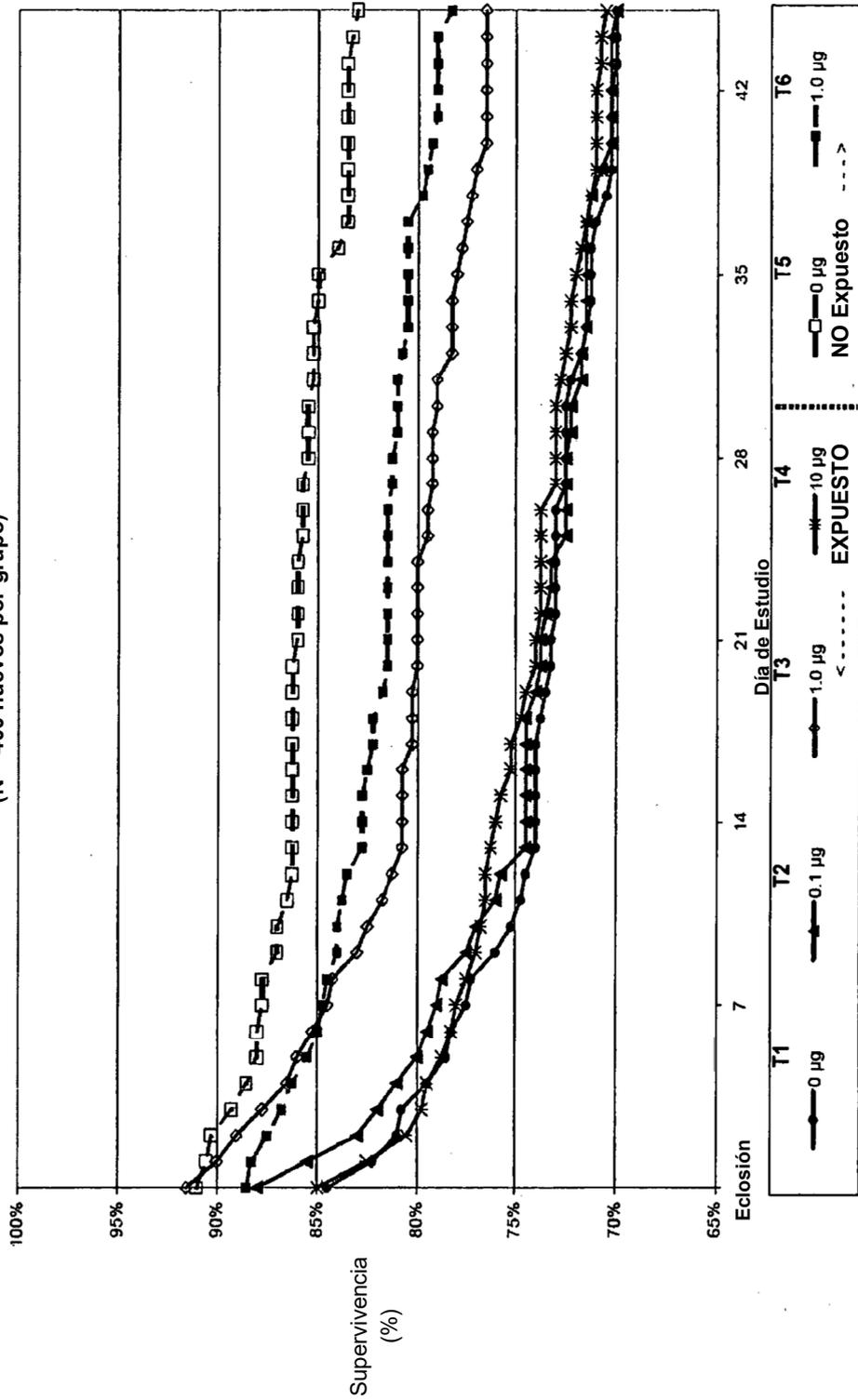


Fig 4

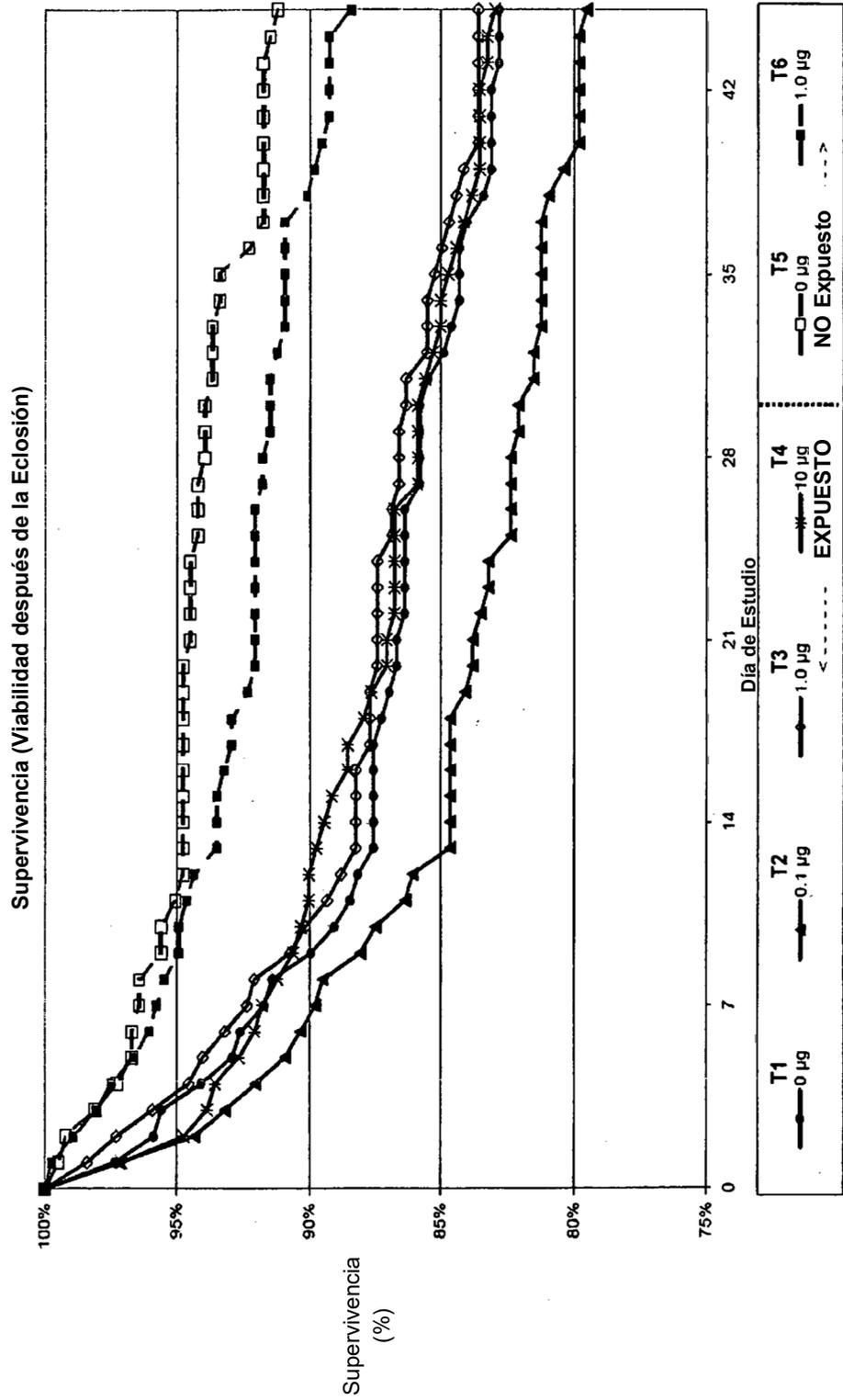
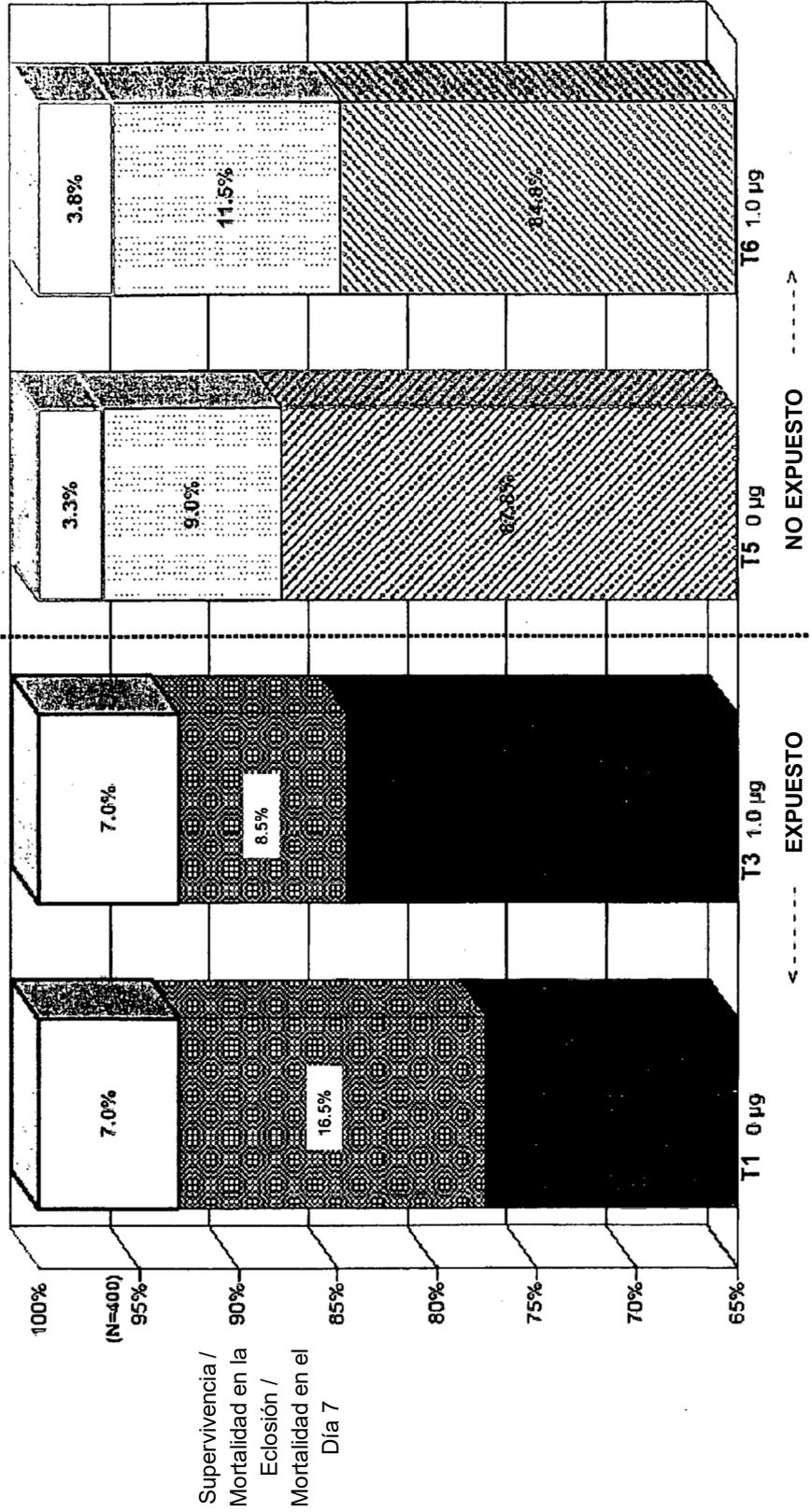


FIG 5

Supervivencia (hasta el Día 7) / Mortalidad (Eclósión y Después de la Eclósión)

N = 400



Supervivencia /
Mortalidad en la
Eclósión /
Mortalidad en el
Día 7

FIG 6

Supervivencia (hasta el Día 14) / Mortalidad (Eclósión y Después de la Eclósión)

N = 400

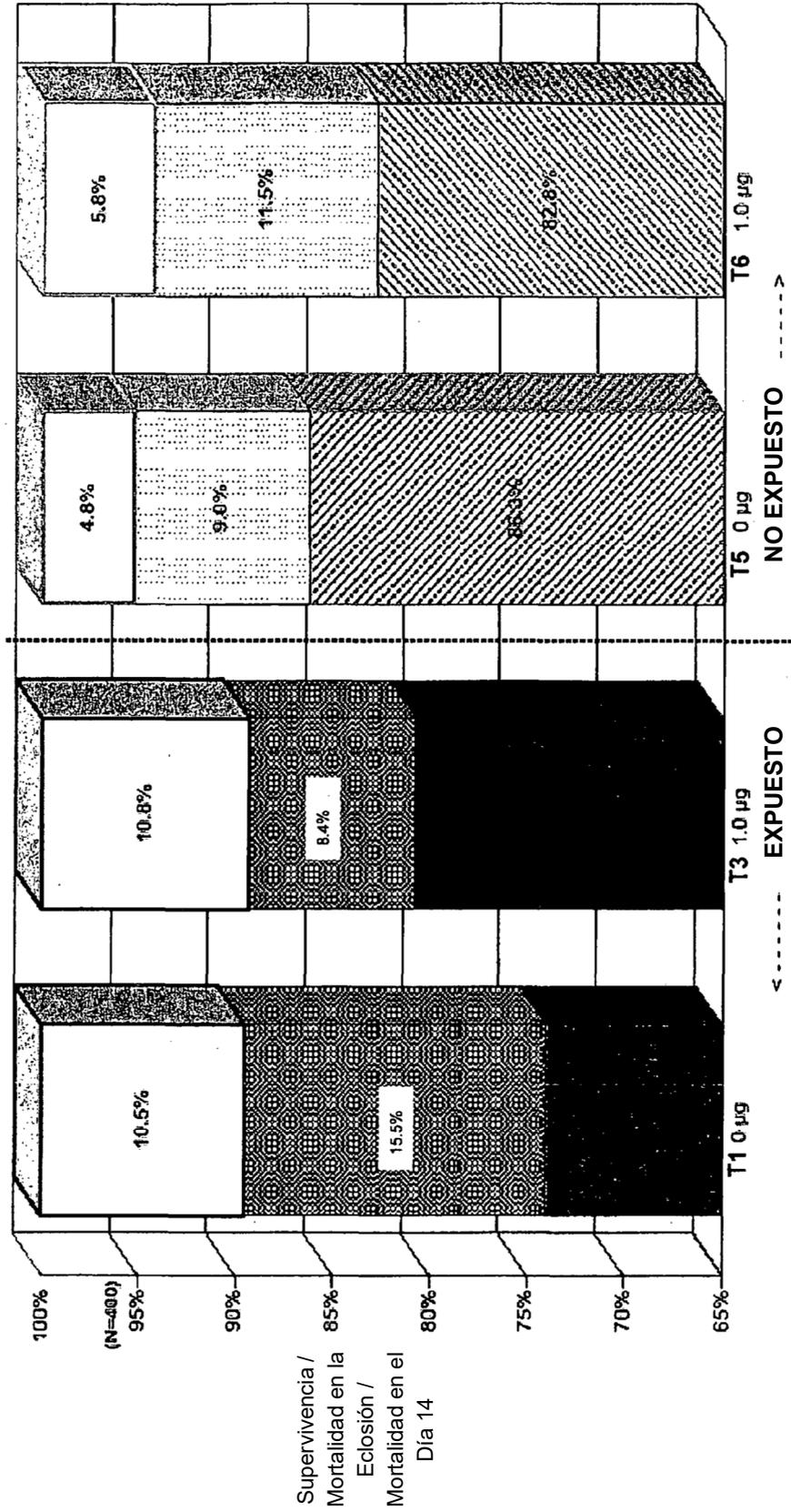


FIG 7

Supervivencia (hasta el Día 21) / Mortalidad (Eclosión y Después de la Eclosión) N = 400

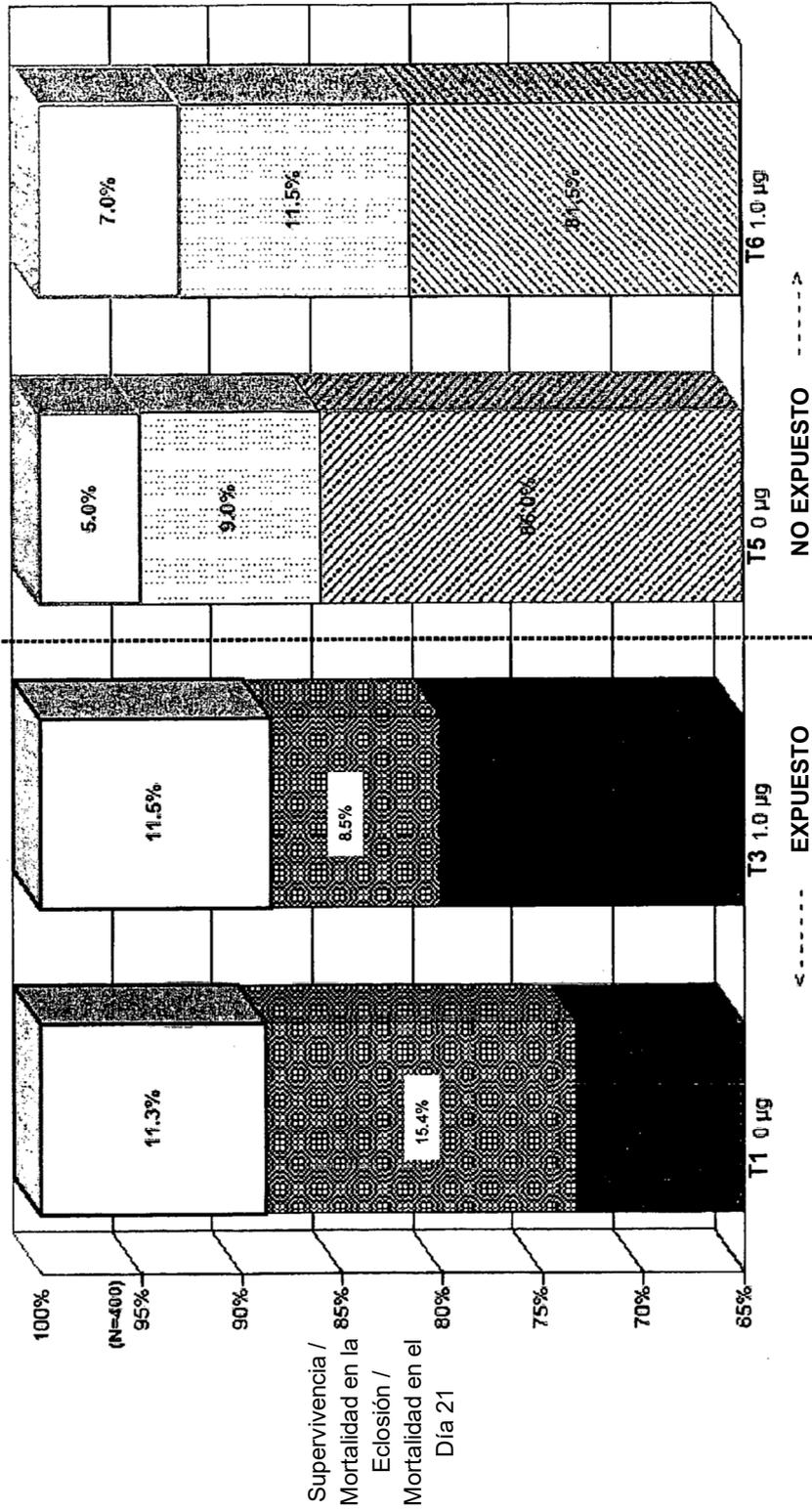


FIG 8

Supervivencia (hasta el Día 28) / Mortalidad (Eclósión y Después de la Eclósión) N = 400

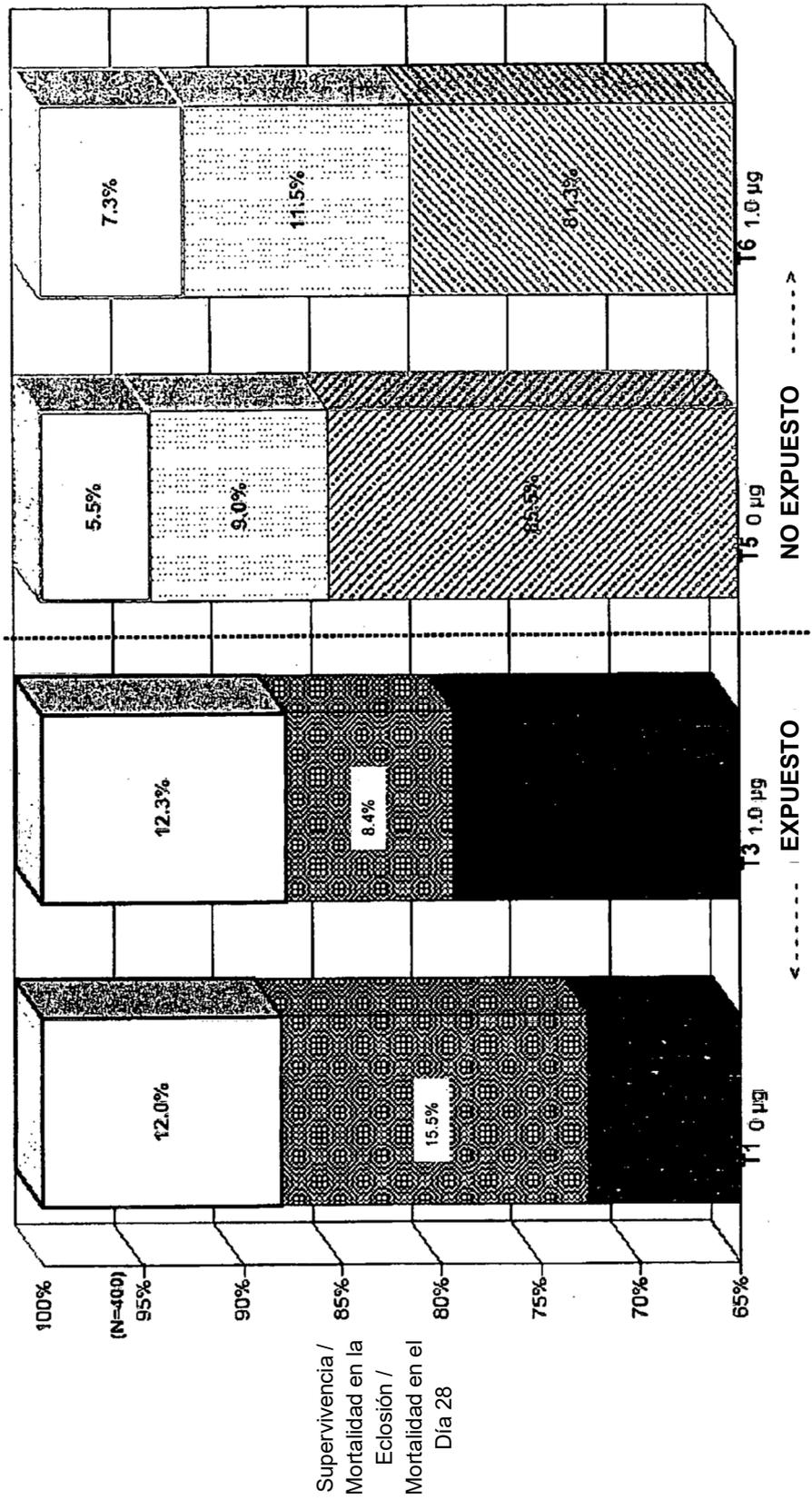


FIG 9

Supervivencia (hasta el Día 35) / Mortalidad (Eclósión y Después de la Eclósión) N = 400

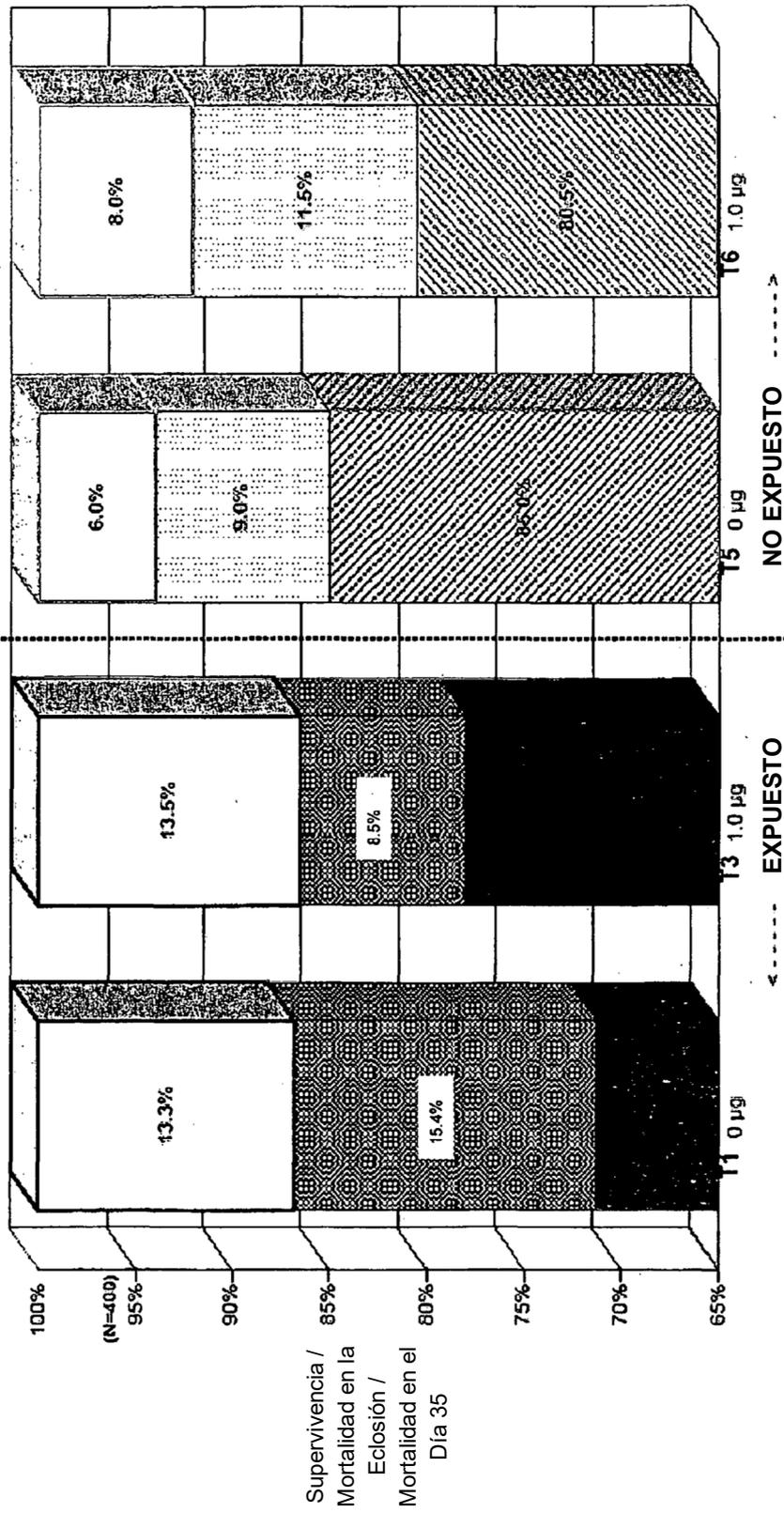


FIG 10

Supervivencia (hasta el Día 45) / Mortalidad (Eclósión y Después de la Eclósión) N = 400

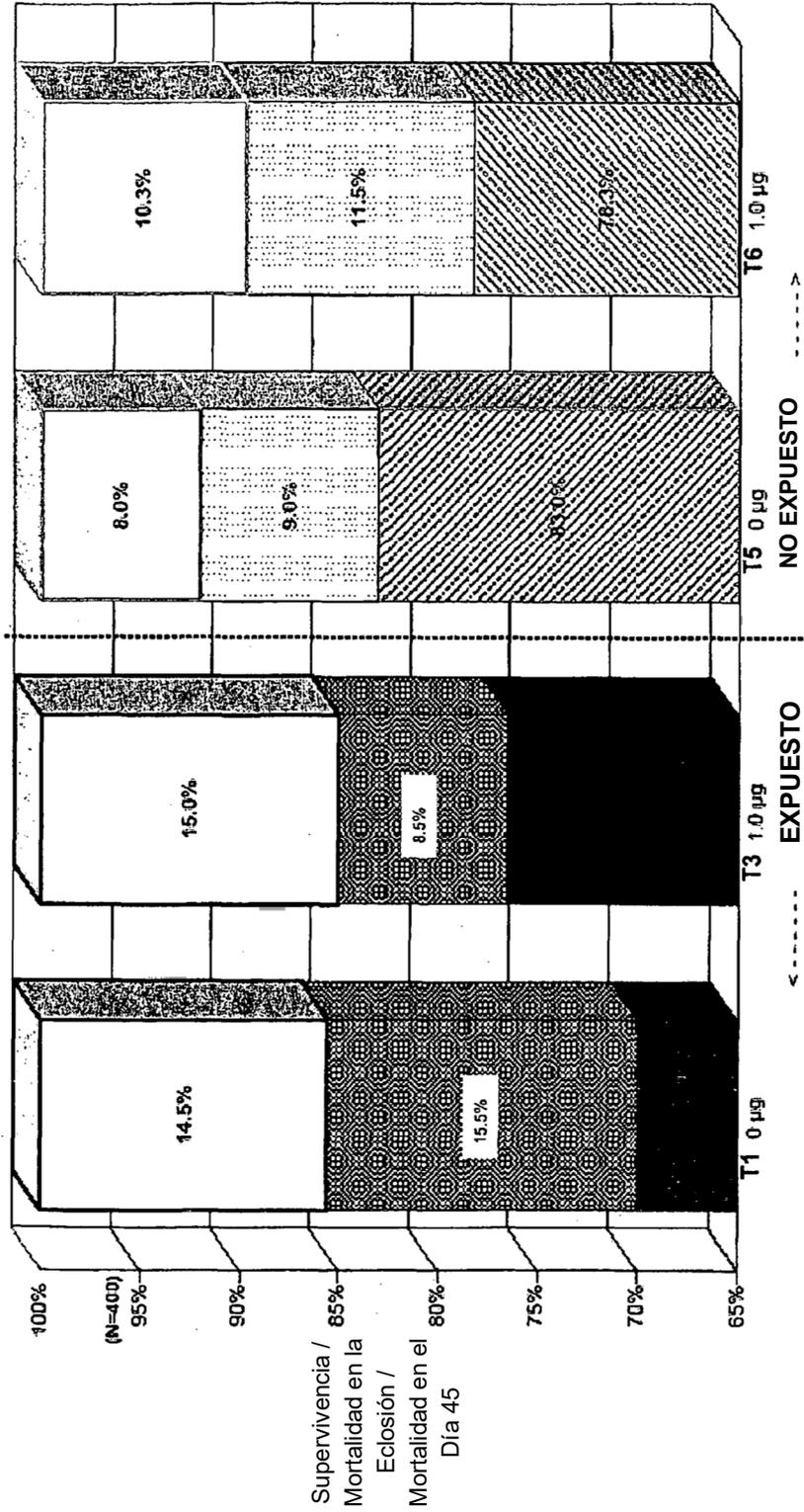


Fig 11

**Mortalidad – a partir de embriones de 18 días de vida
(N = 400 huevos por grupo)**

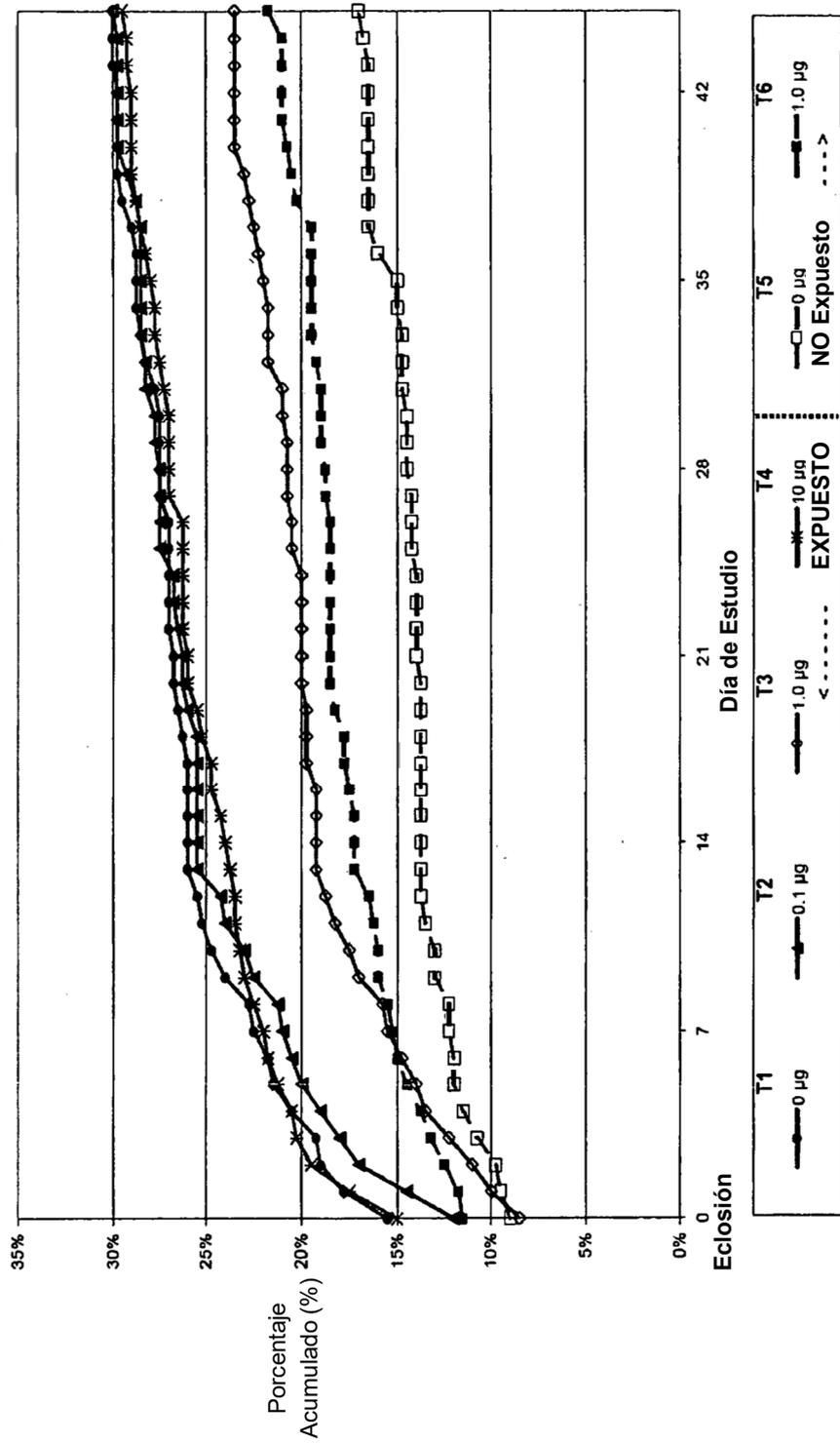


Fig 12

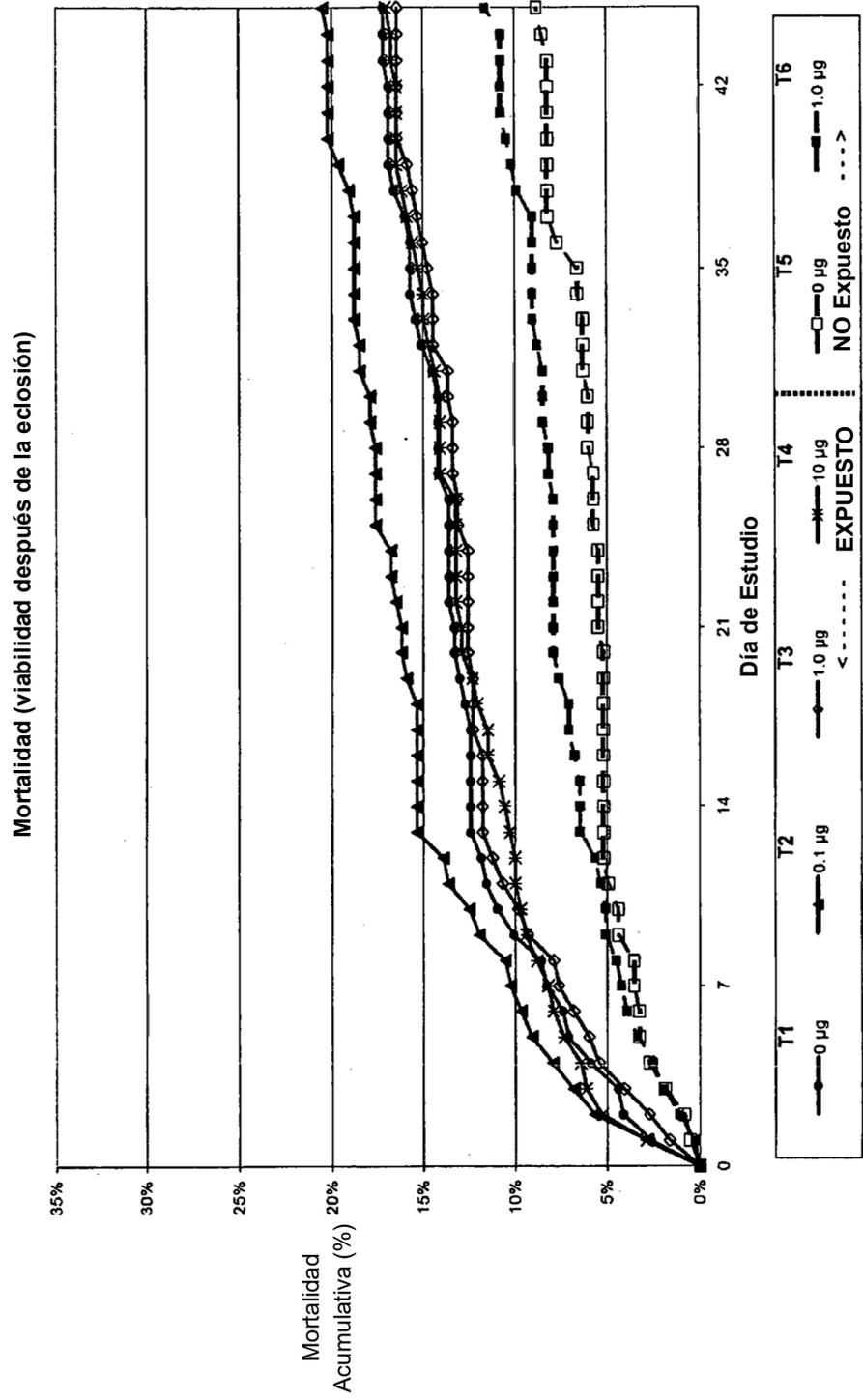


FIG 13

Aumento Total del Peso Corporal
(hasta el Día 7)

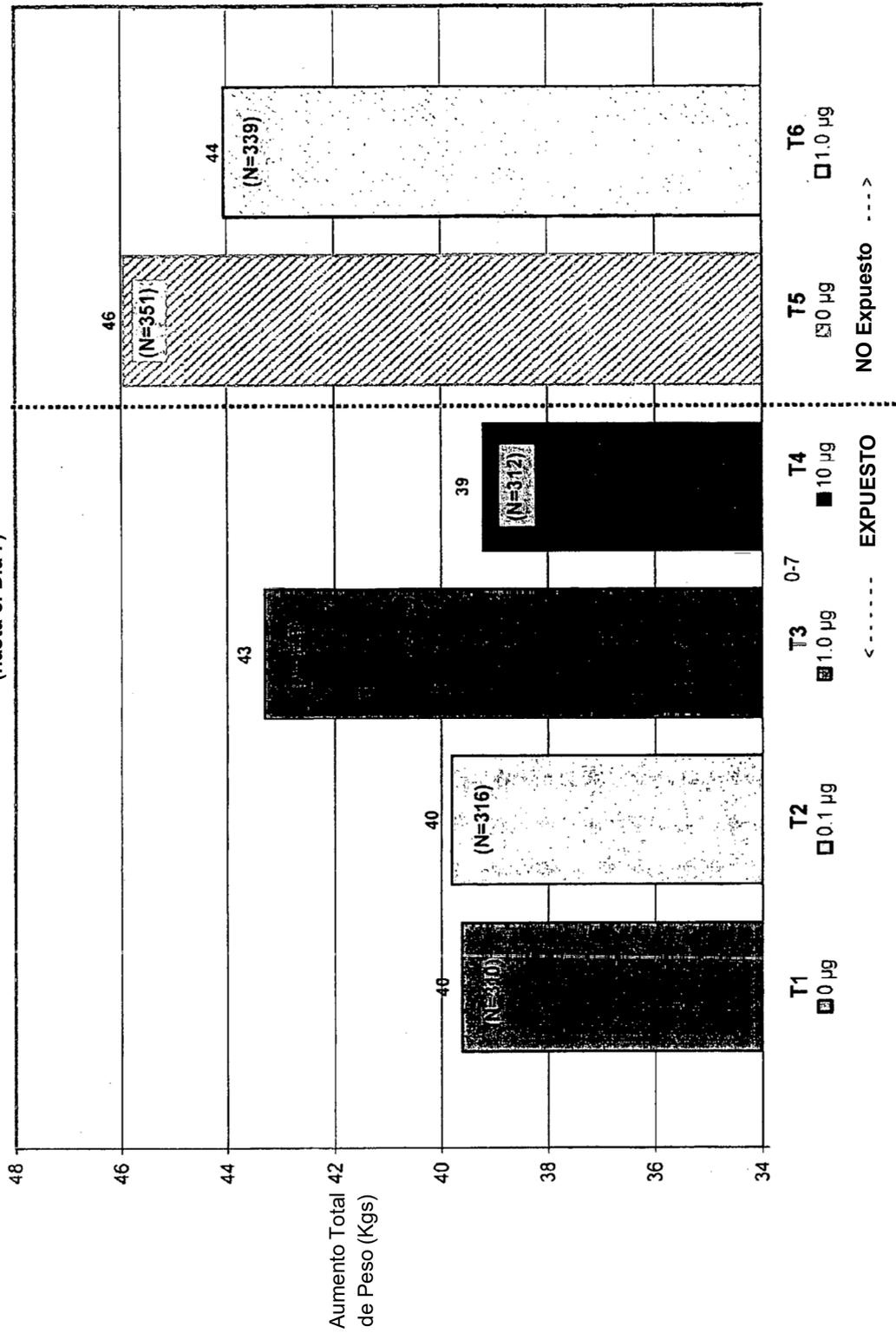


FIG 14

Aumento Total del Peso Corporal
(hasta el Día 14)

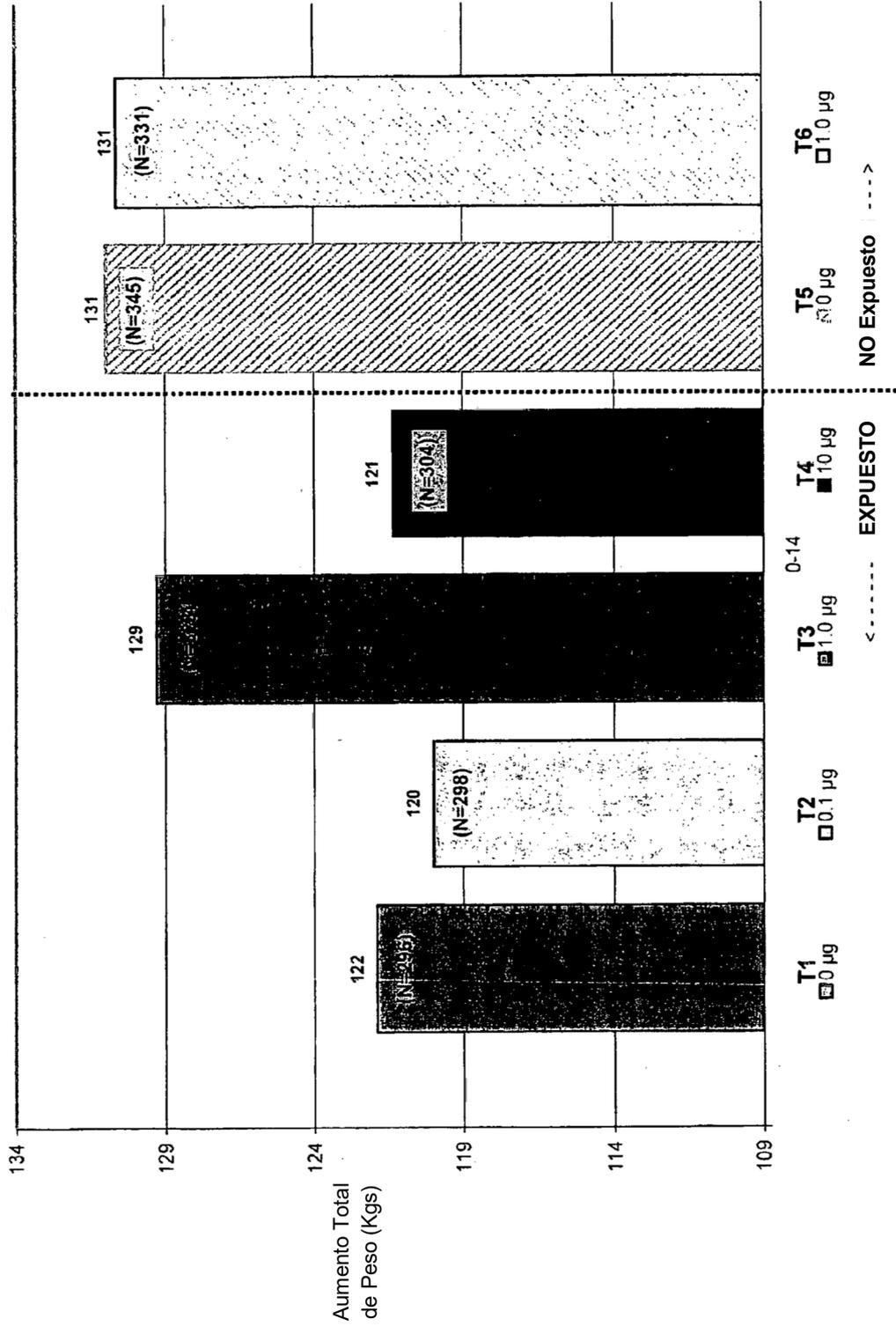


FIG 15
Aumento Total del Peso Corporal
(hasta el Día 21)

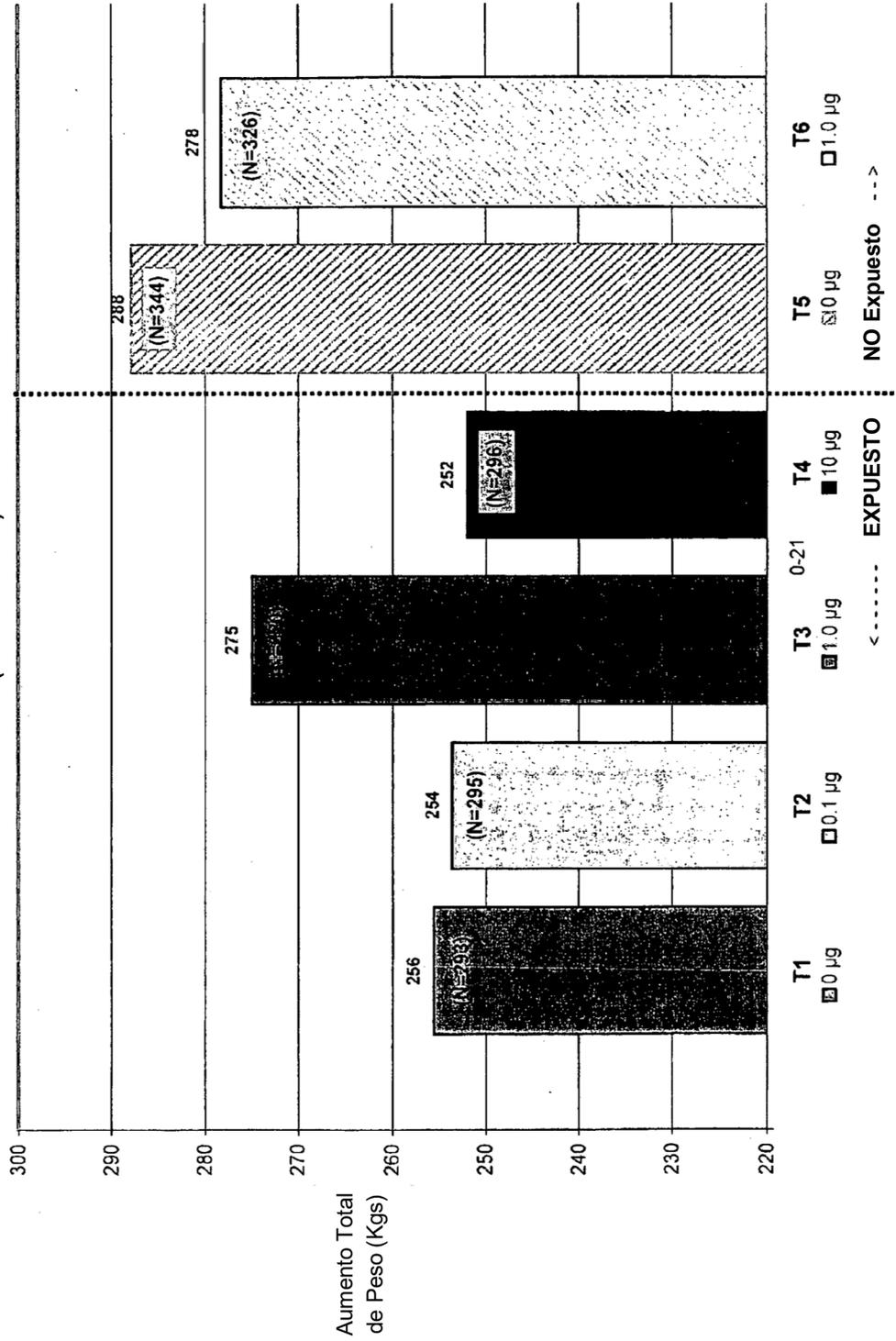


FIG 16

**Aumento Total del Peso Corporal
(hasta el Día 28)**

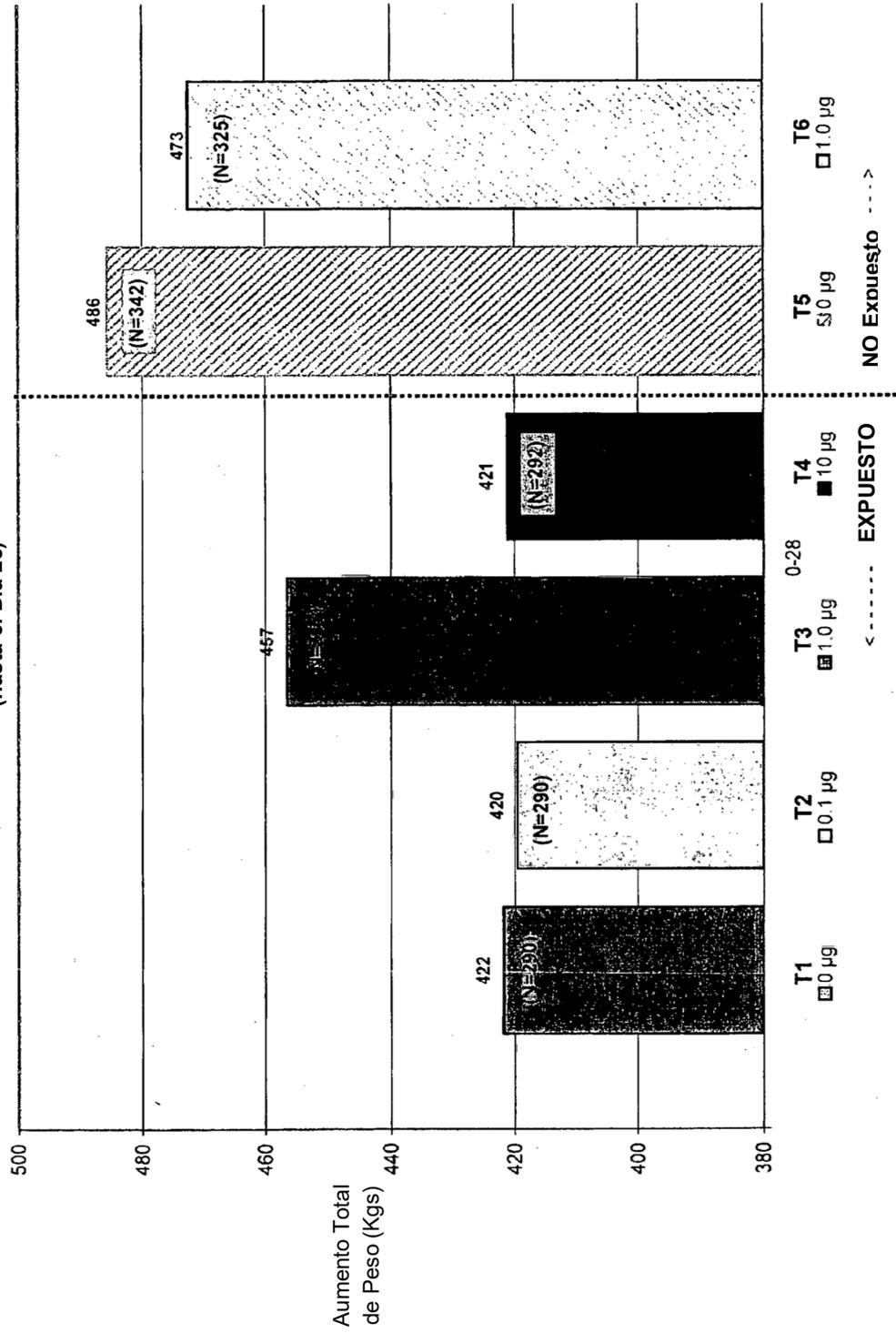


FIG 17

**Aumento Total del Peso Corporal
(hasta el Día 35)**

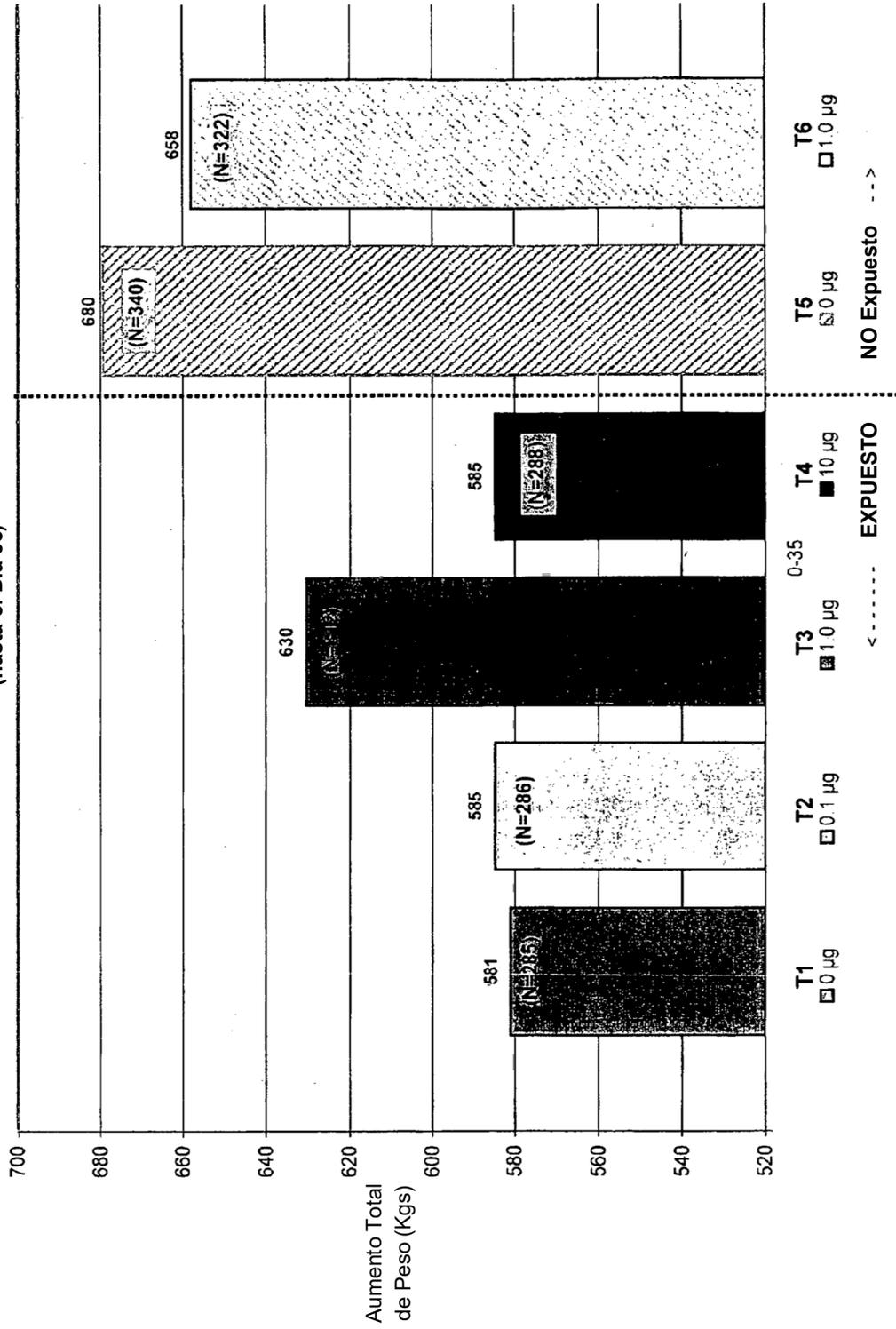


FIG 18

**Aumento Total del Peso Corporal
(hasta el Día 45)**

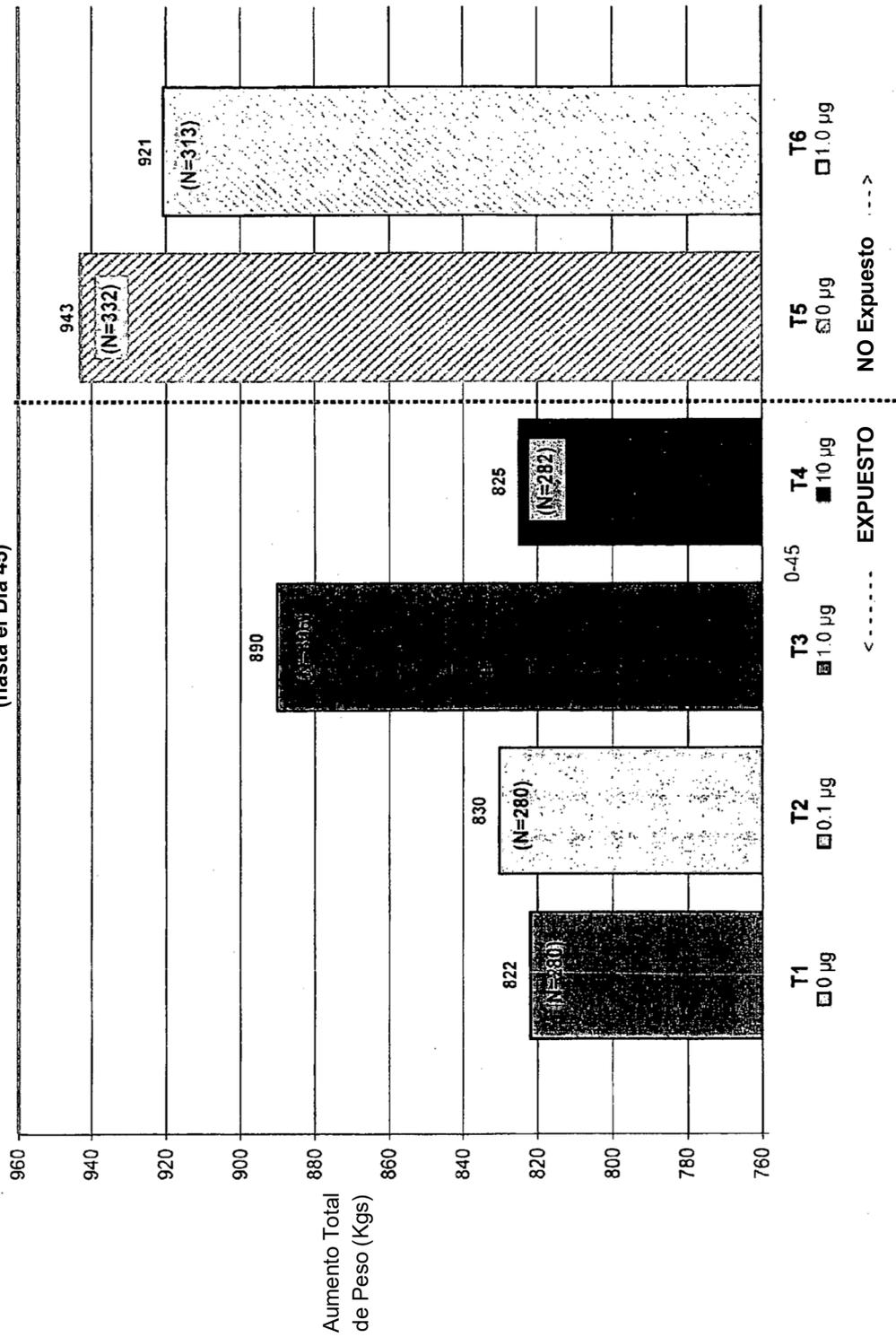


FIG 19
Polluelos Eclosionados (conjunto =1000)

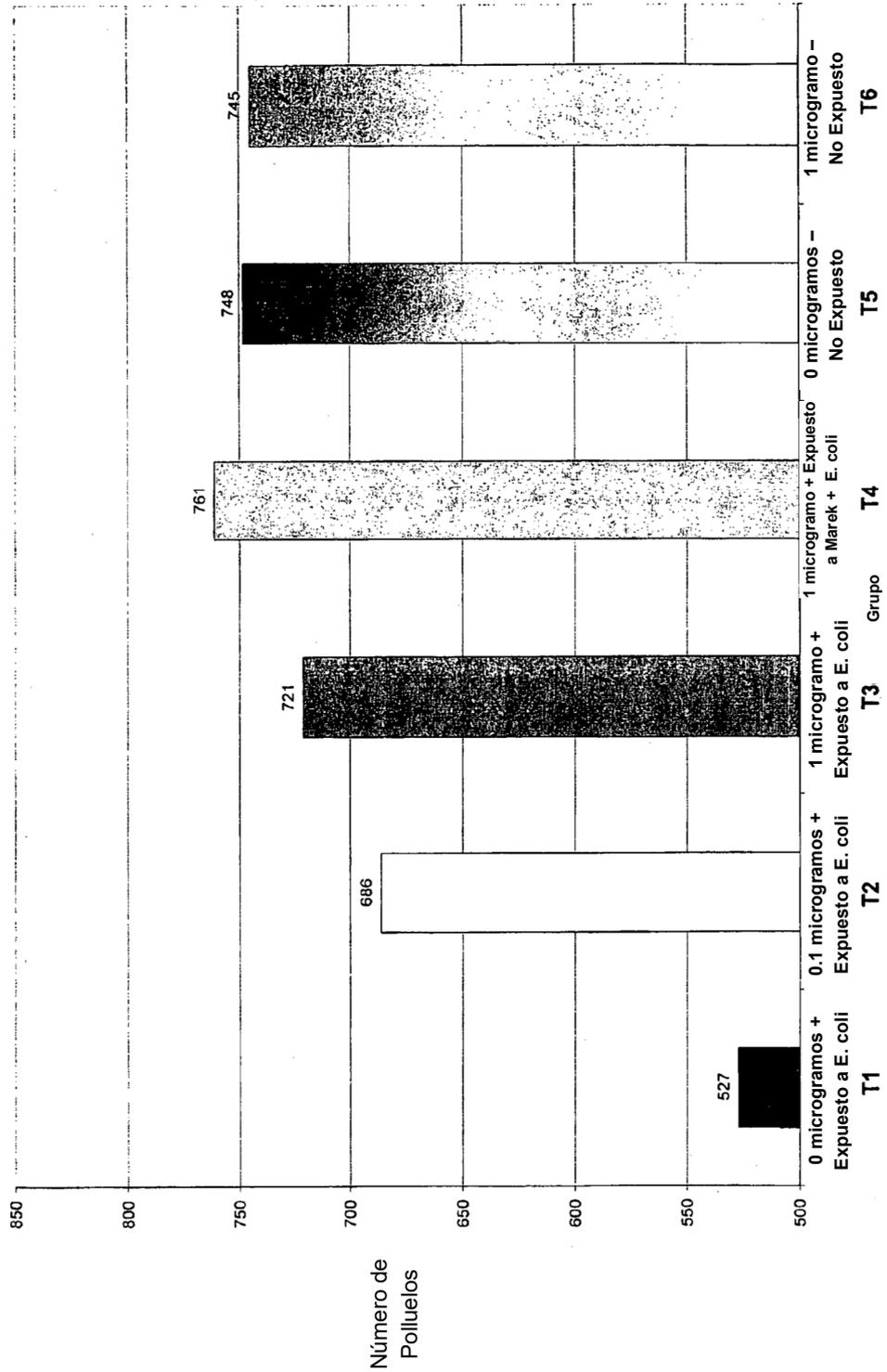


FIG. 20
Ningún Polluelo Vivo (N = 1000 / grupo) 7 Días

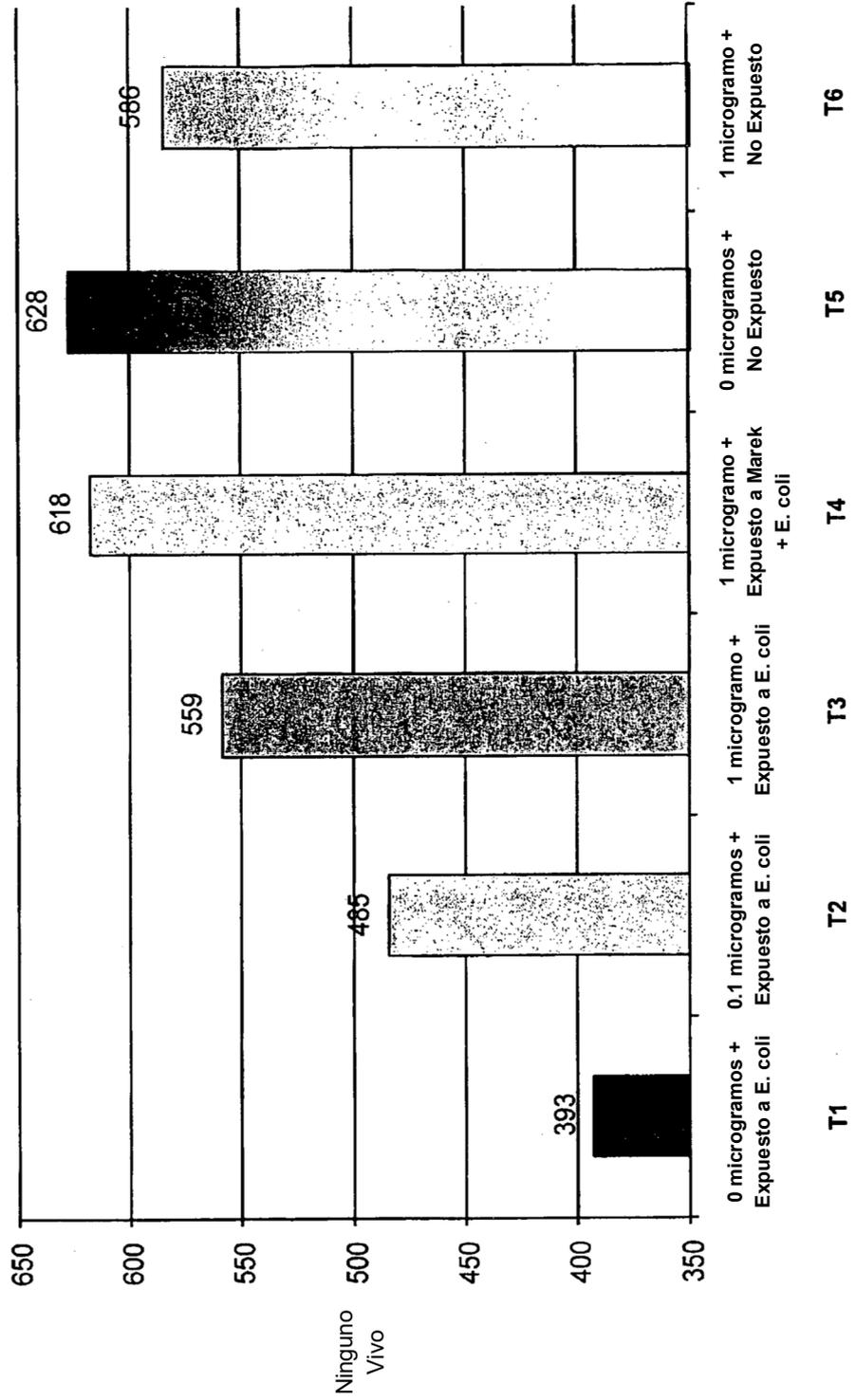


FIG 21
Polluelos Vivos / Mortalidad

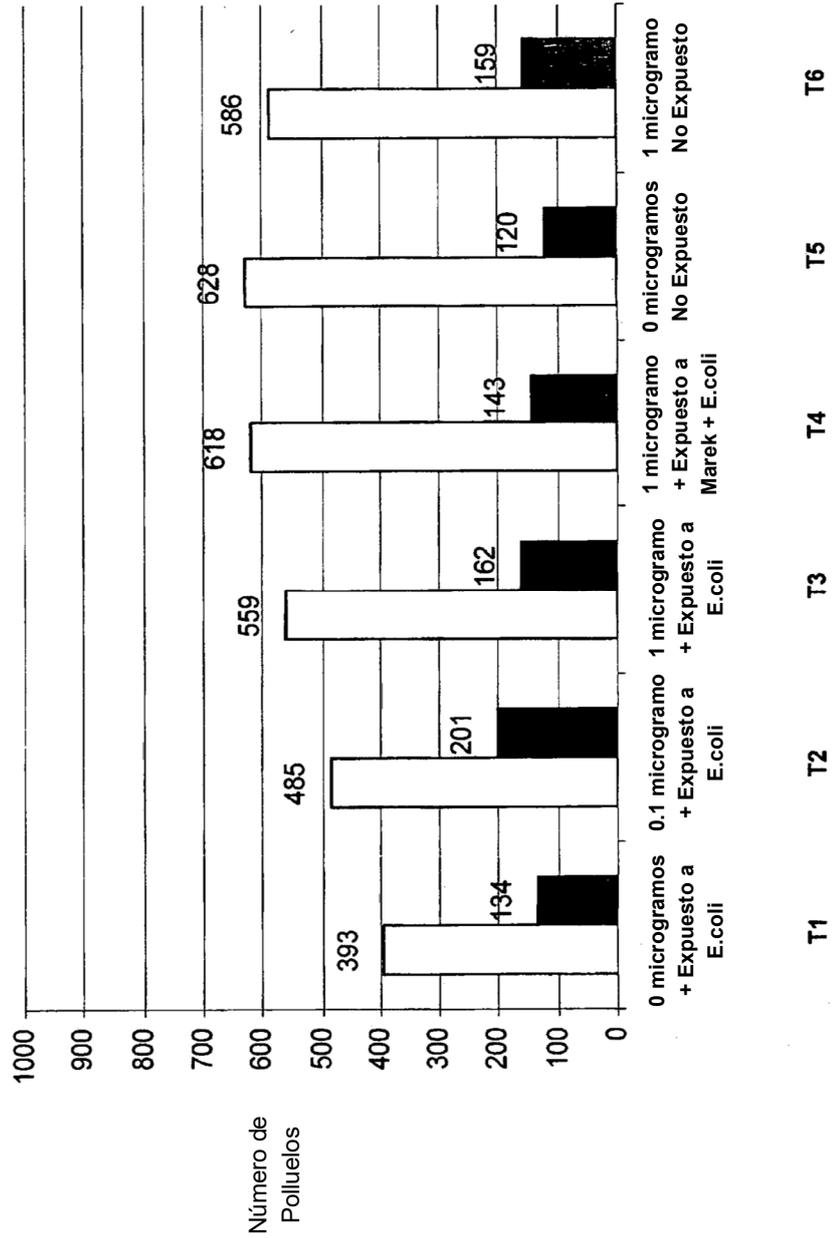
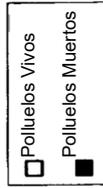


FIG 22
Porcentaje de Mortalidad (7 Días)

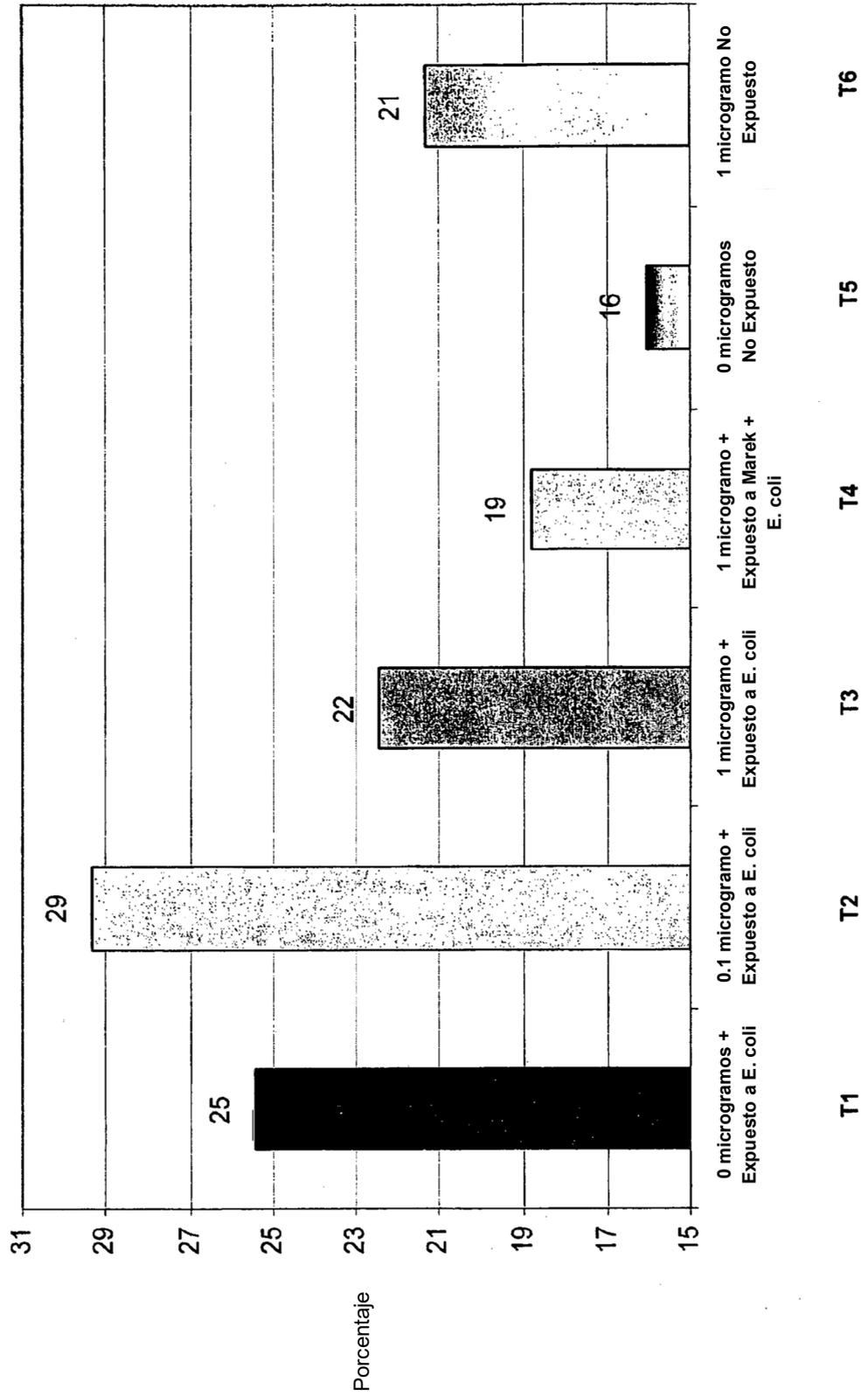


FIG 23
 Número de aves vivas al final del estudio (7 días)

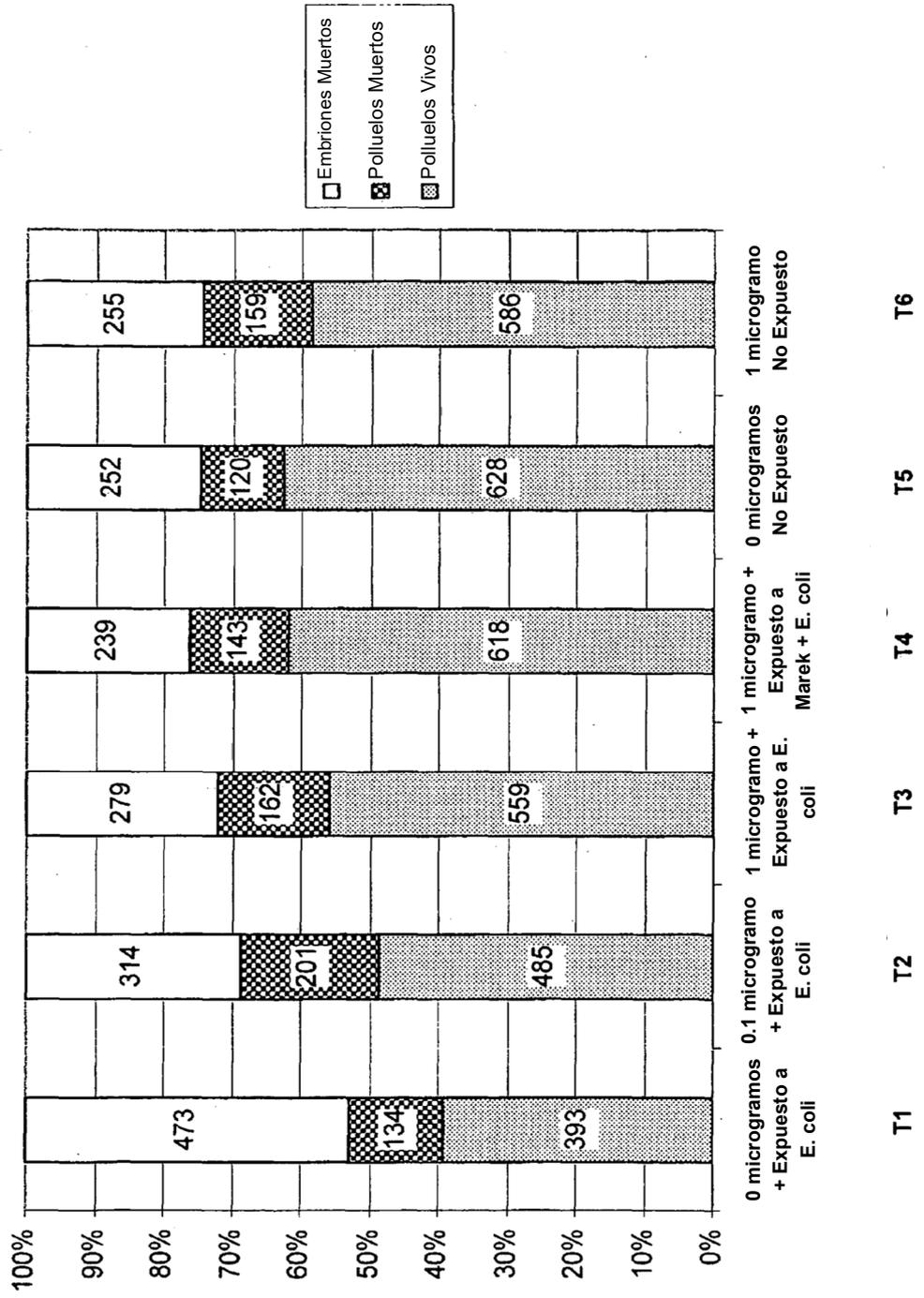


FIG 24

Porcentaje de Eclosión (%)

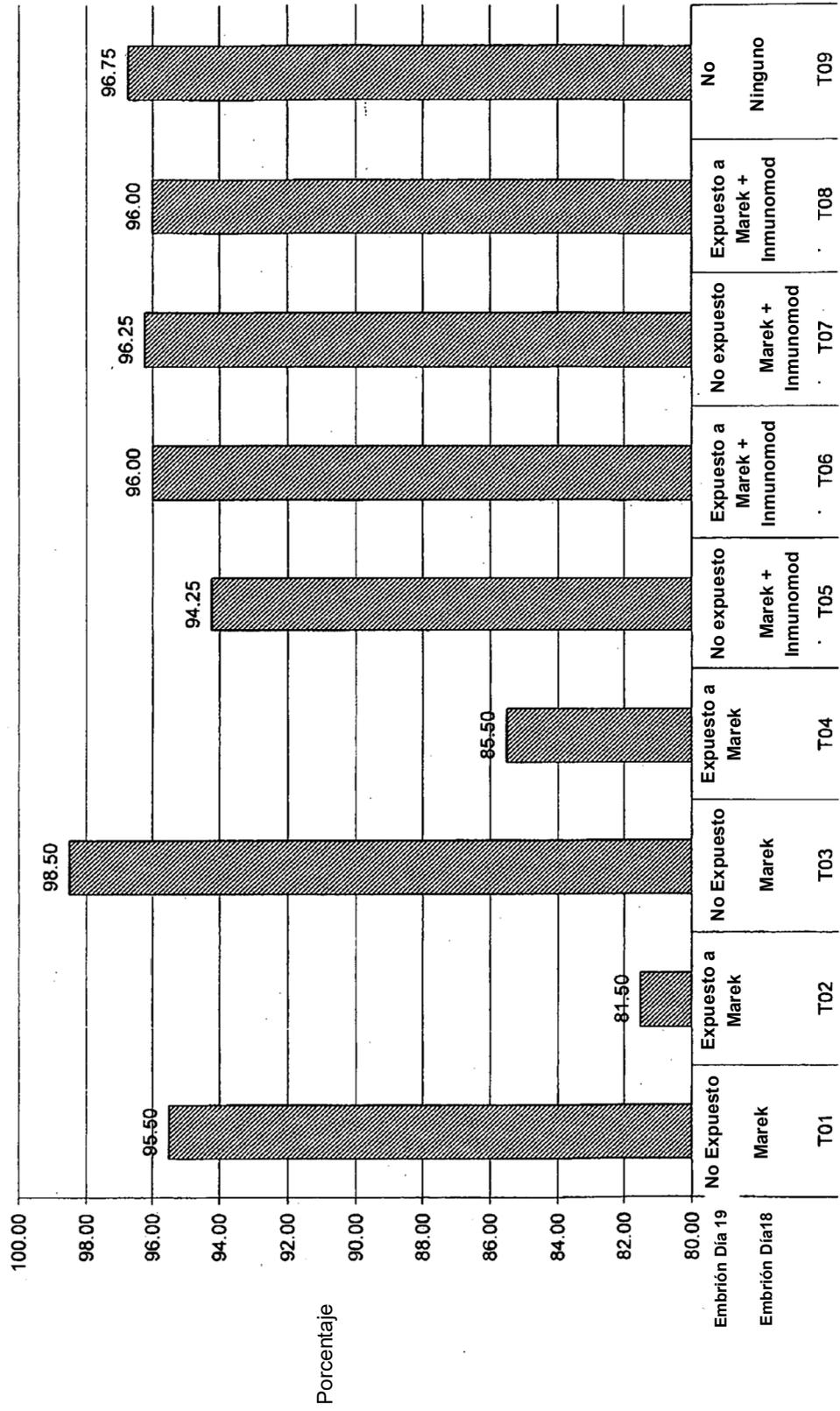


FIG 25
Post Eclosión - 7 Días - No Expuesto - Mortalidad

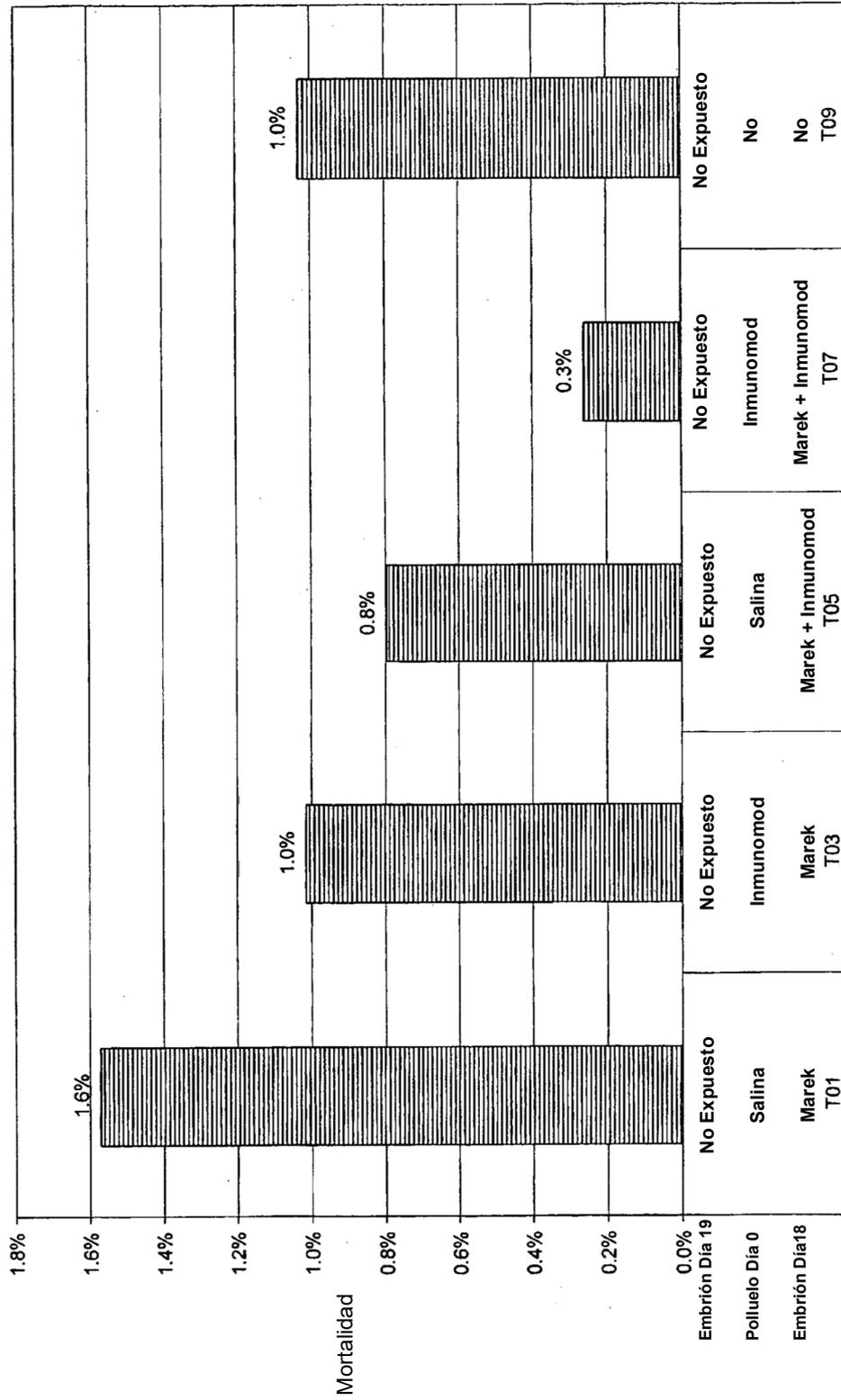


FIG 26
Post Eclosión – 7 Días – Expuesto - Mortalidad

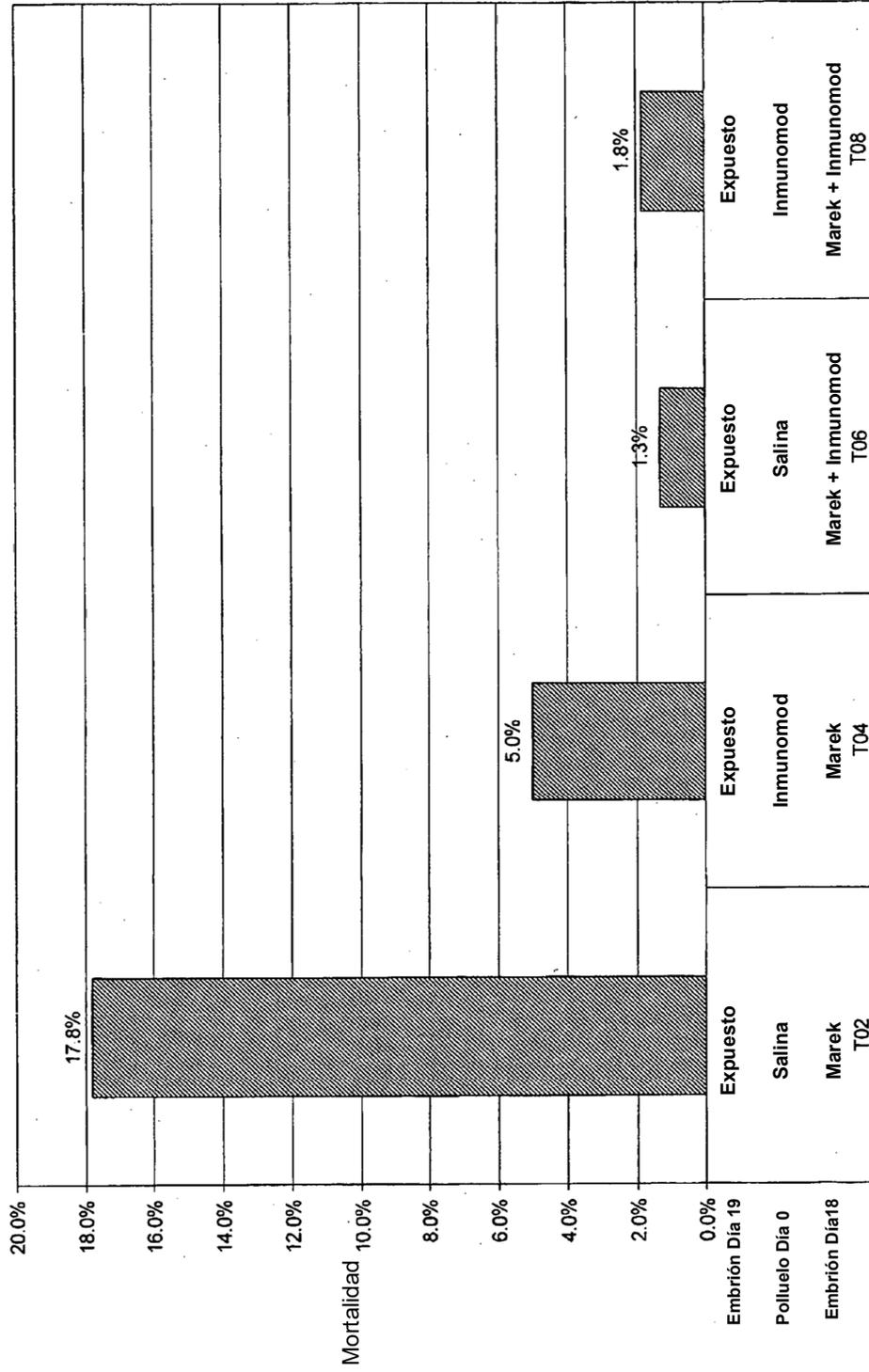


FIG 27
Post Eclosión – 7 Días - Mortalidad

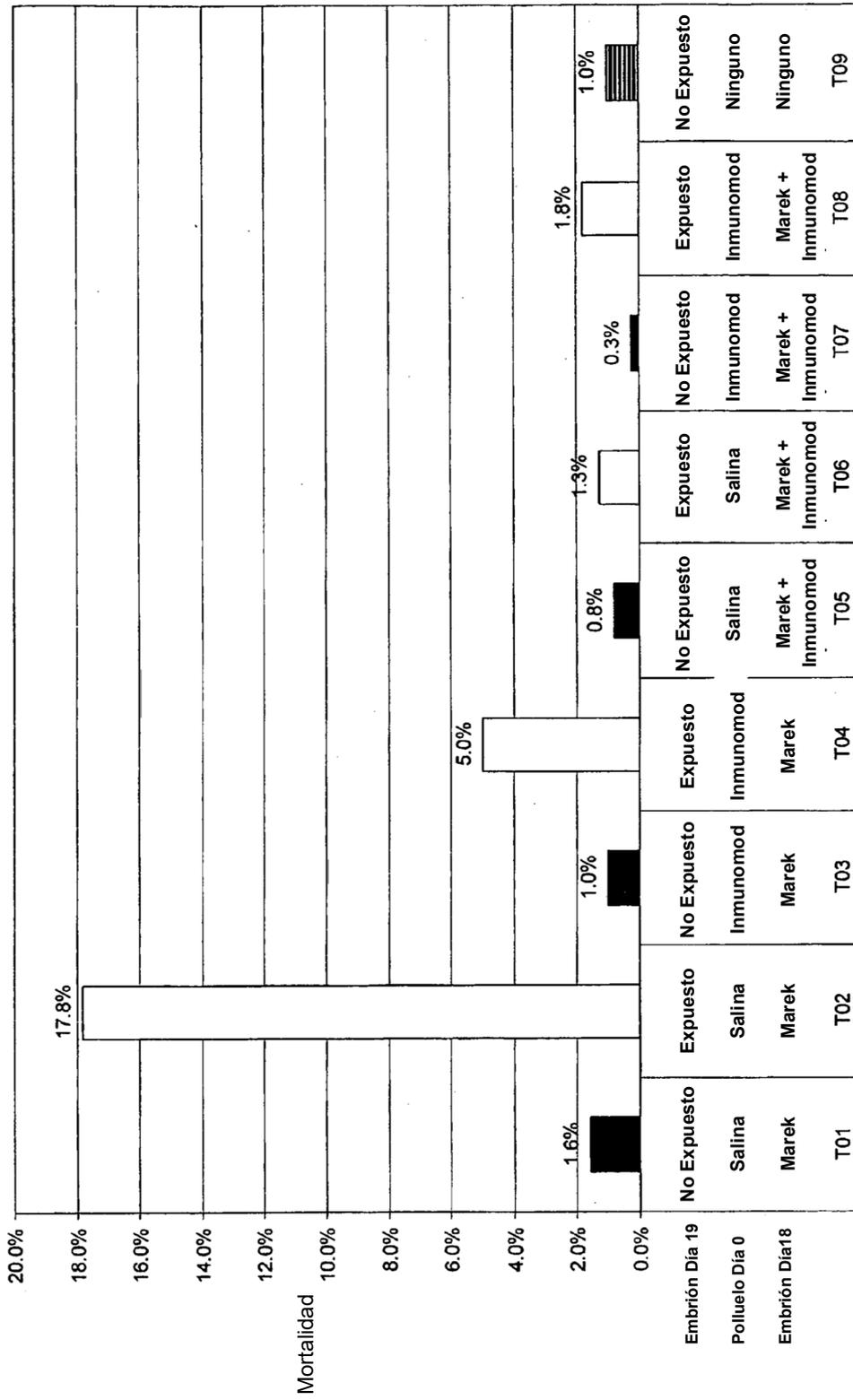


FIG 28
Post Eclosión – 7 Días - Vivos

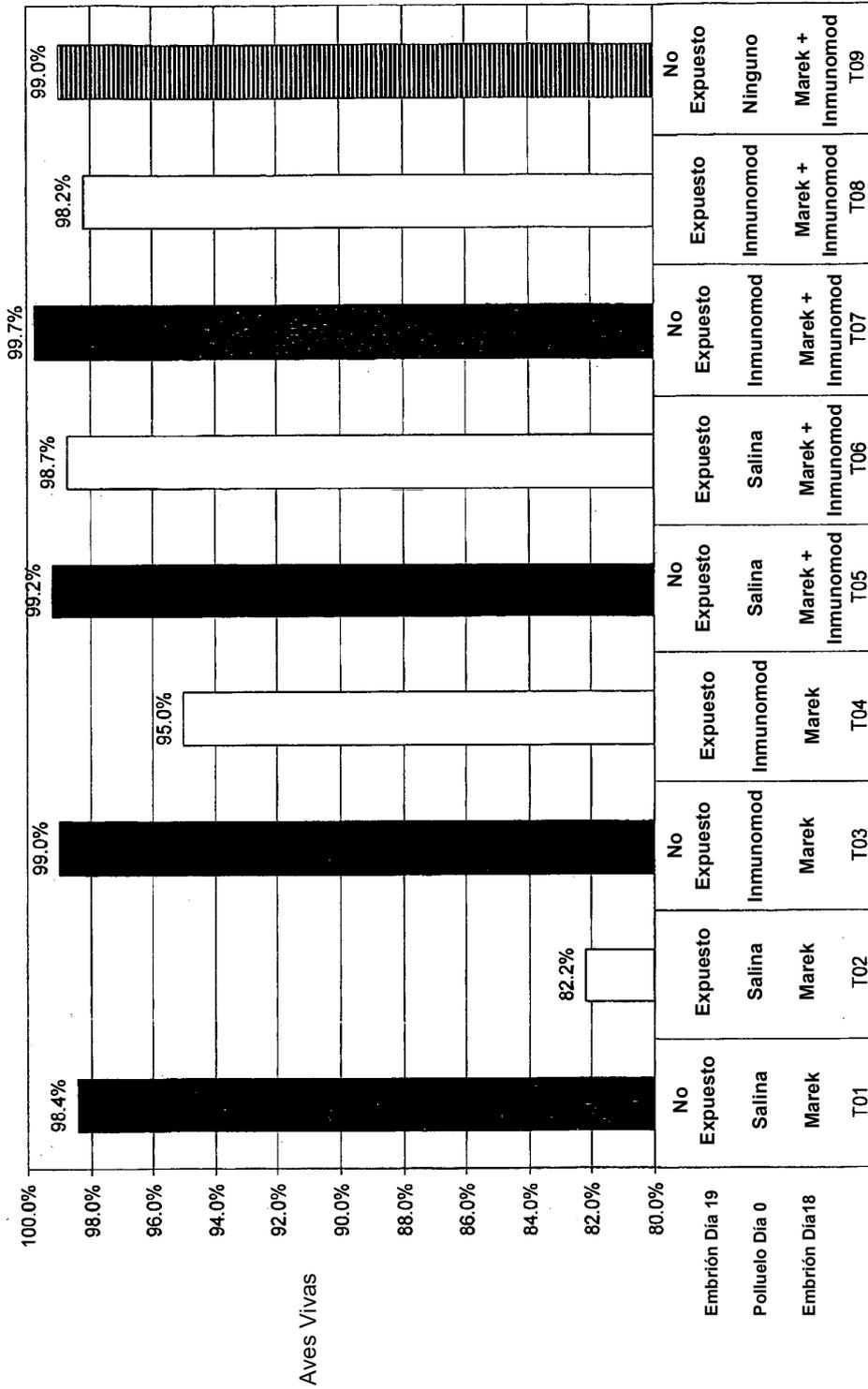


FIG 29
Post Puesta (N = 400) – 7 Días - Vivos

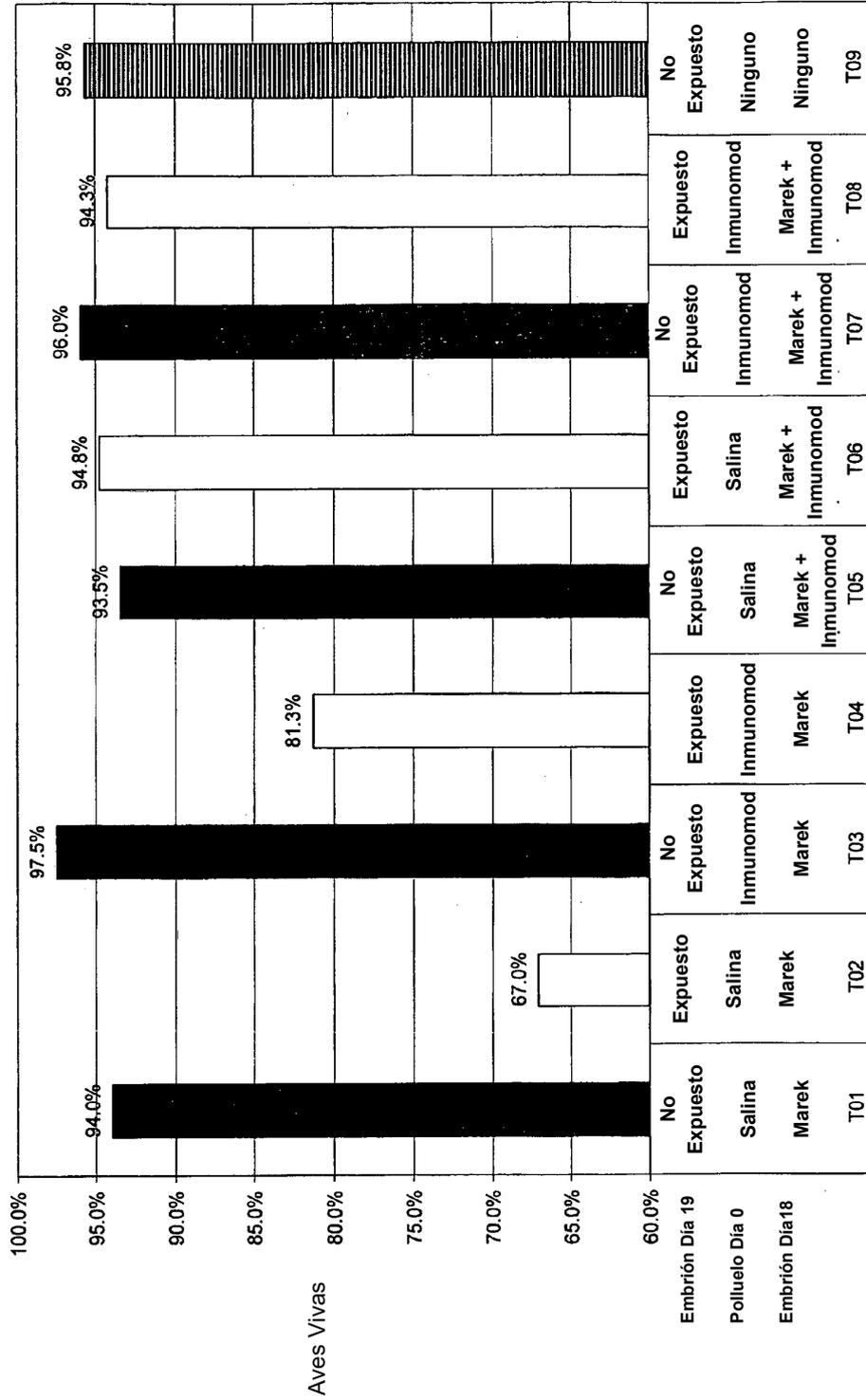


FIG 30

Mortalidad Semanal
(Polluelos muertos acumulados hasta el día 7 o 14)

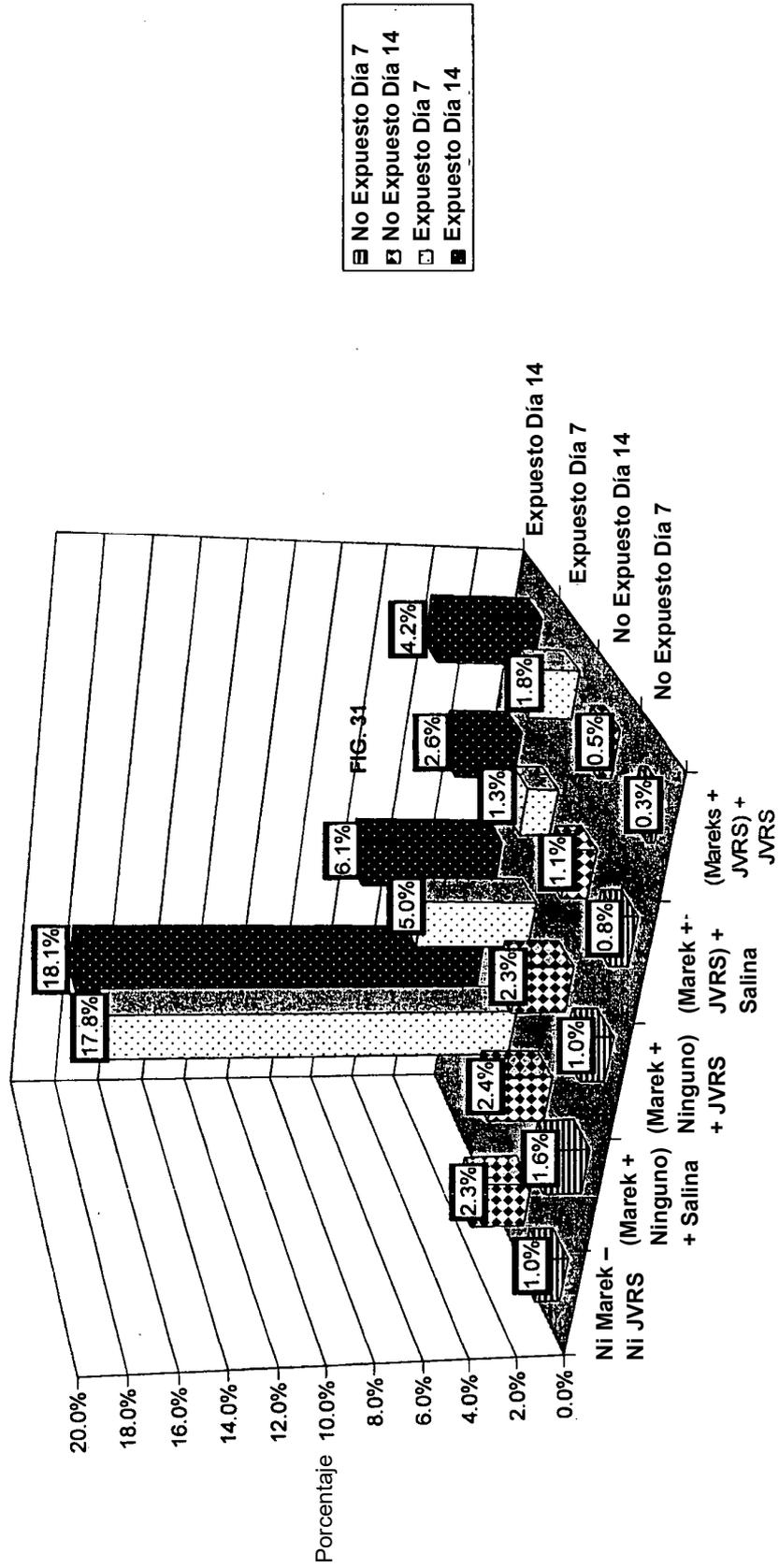


FIG 31

**Efecto del Inmunomodulador en Réplica de Vacuna de la MD:
HVT, Células de Bazo, Semana 1**

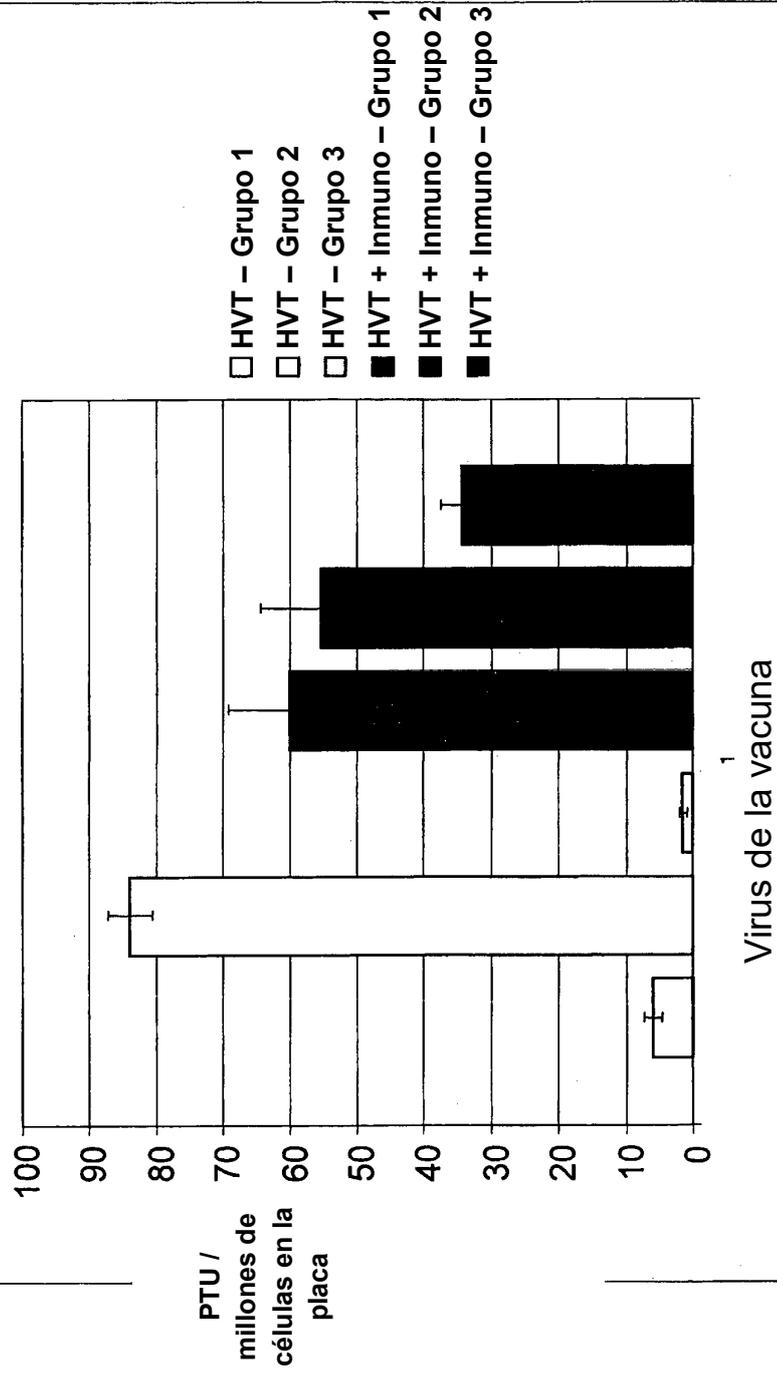
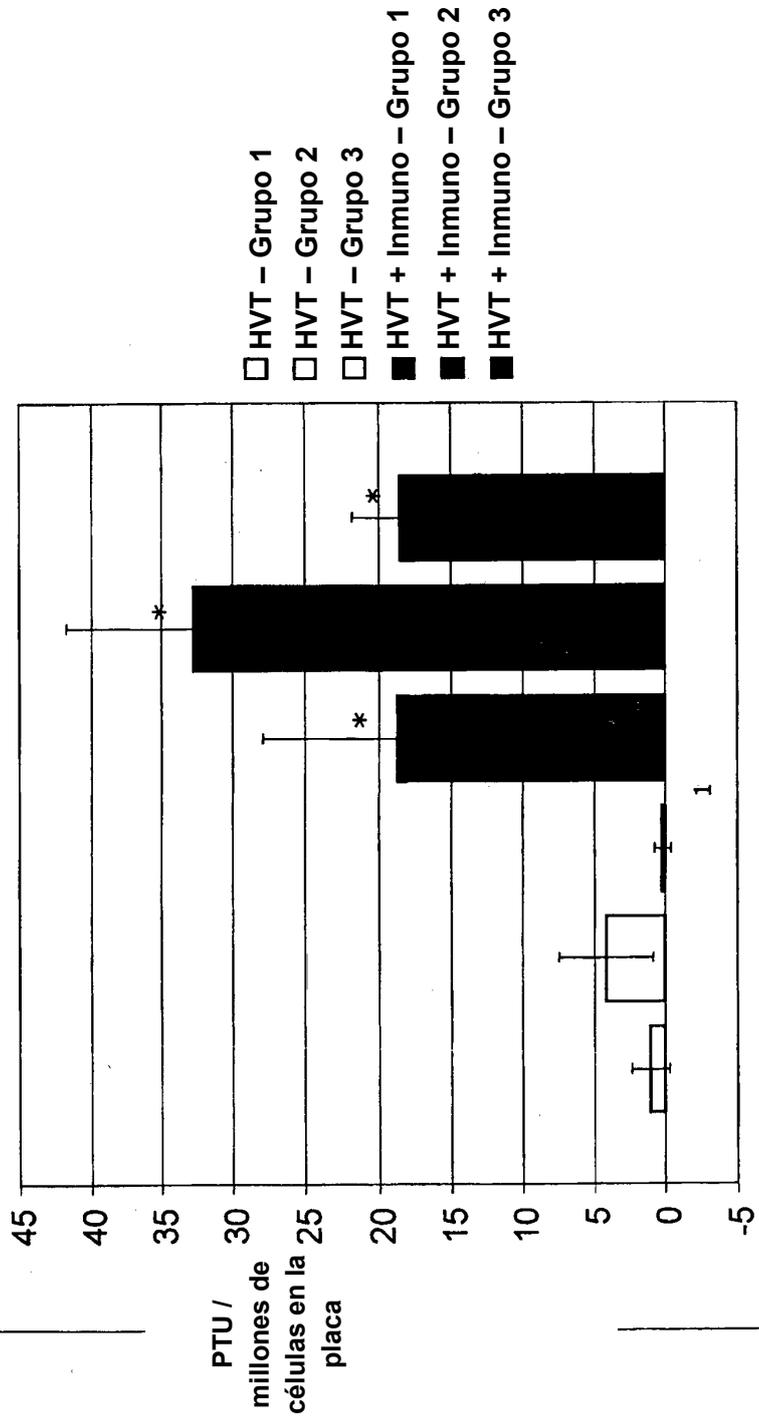


FIG 32

**Efecto del Inmunomodulador en Réplica de Vacuna de la MD: :
HVT, PBMC, Semana 1**



Virus de la vacuna

* p = 0.010

FIG 33

**Efecto del Inmunomodulador en Réplica de Vacuna de la MD:
SB-1, Células de Bazo, Semana 1**

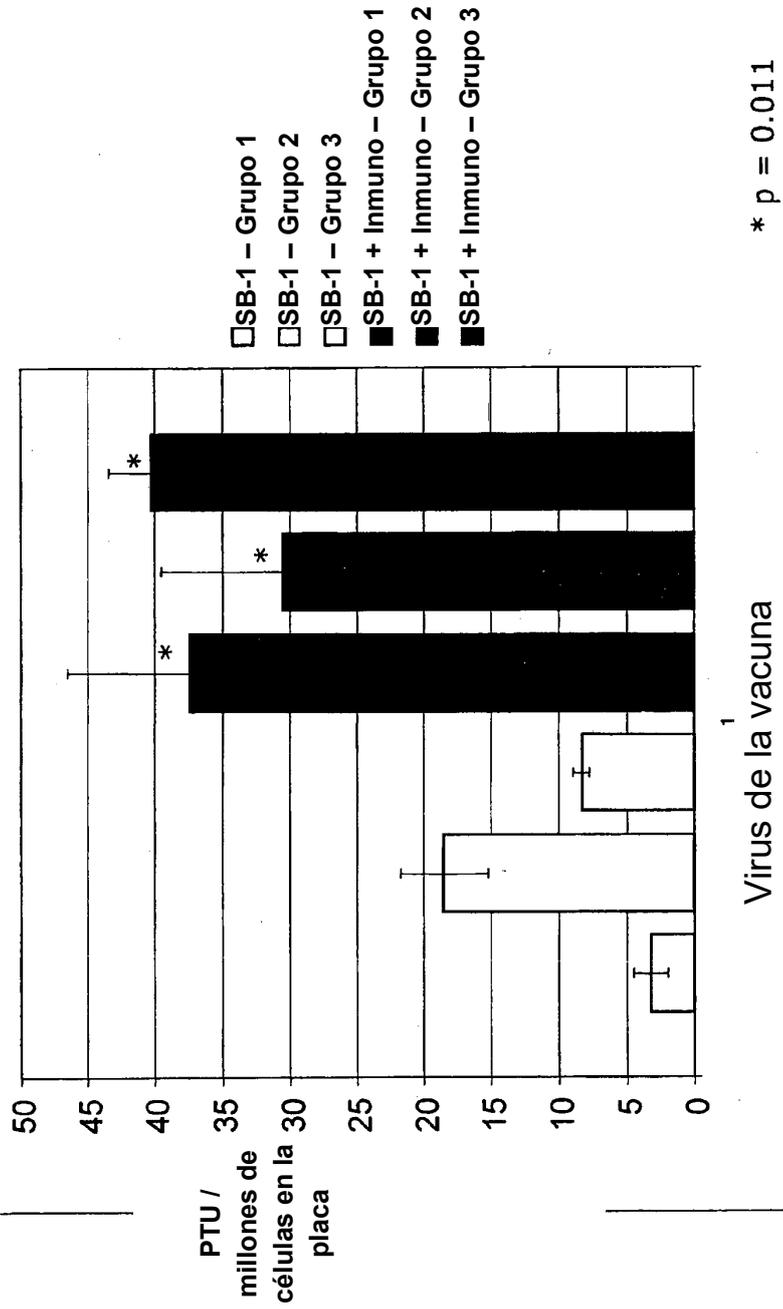


FIG 34

Efecto del Inmunomodulador en Réplica de Vacuna de la MD:
SB-1, PBMC, Semana 1

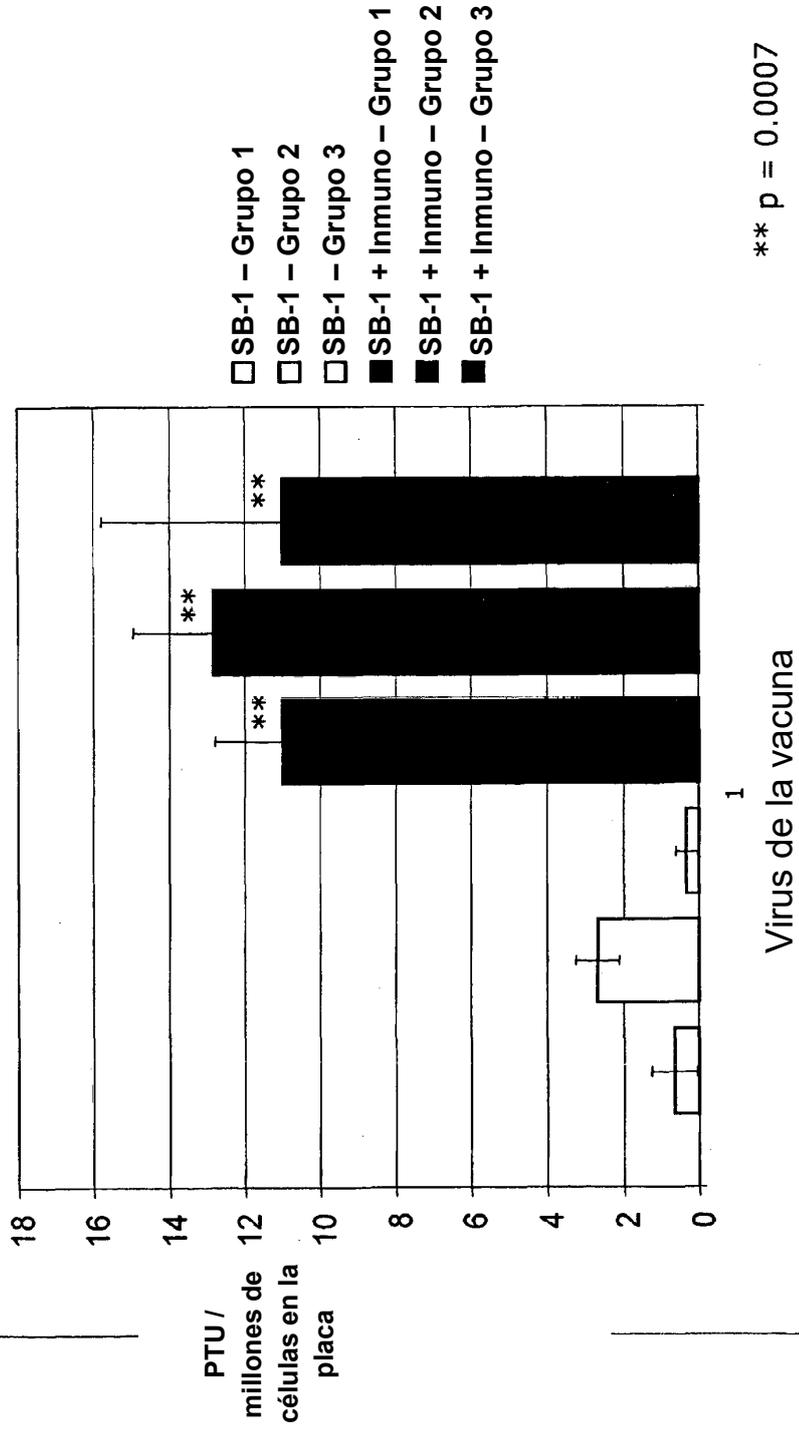


FIG. 35

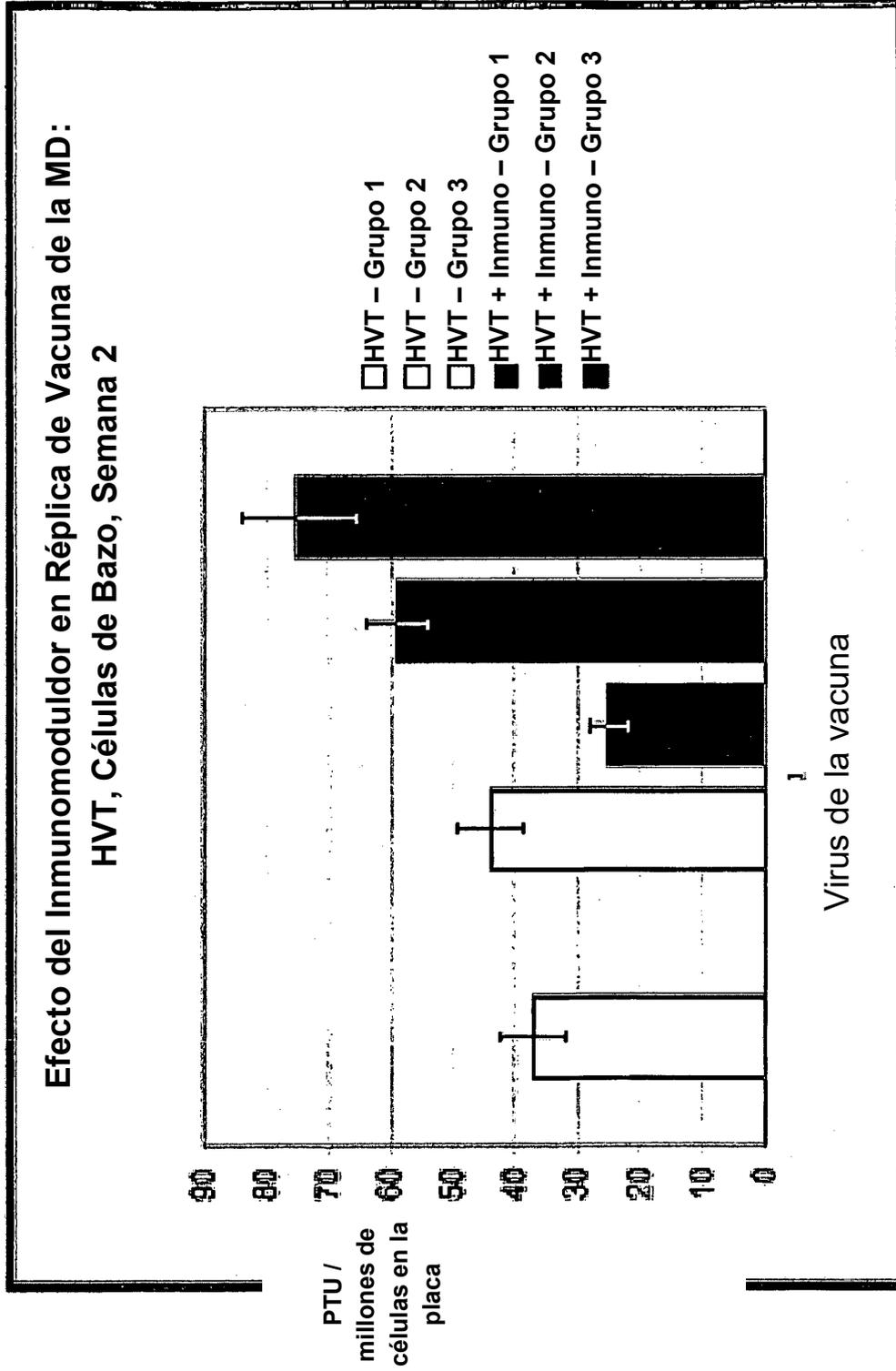


FIG 36

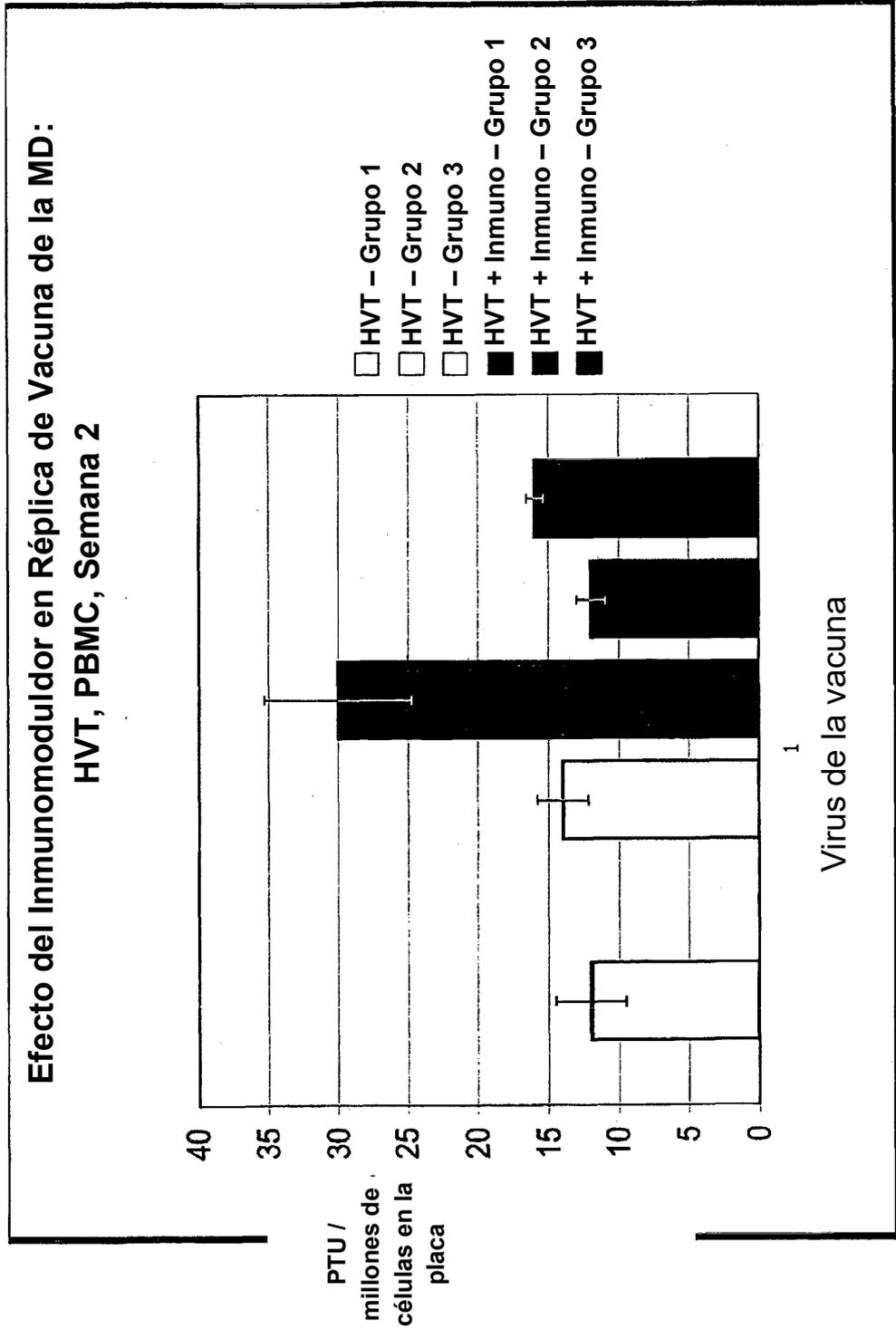


FIG 37

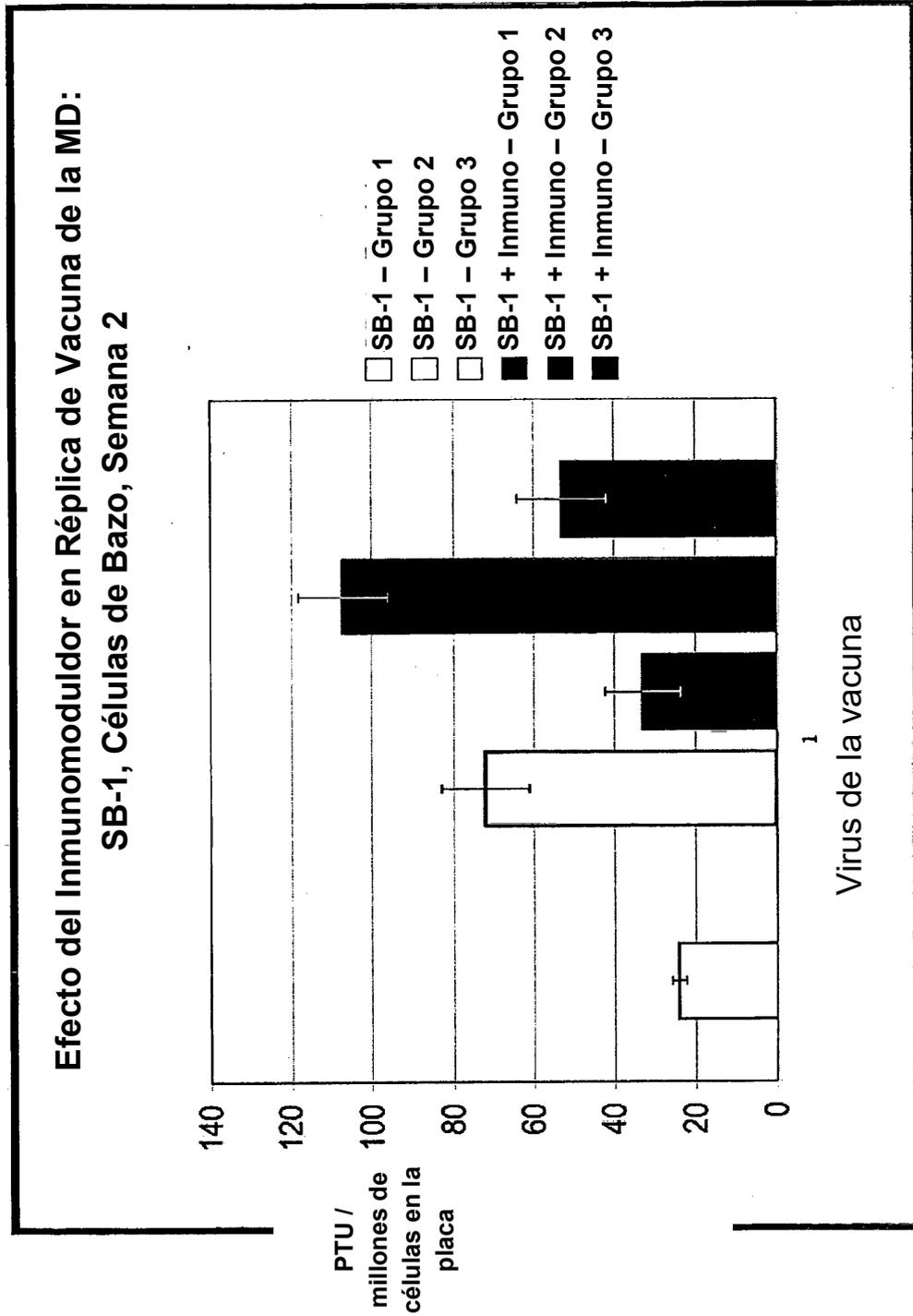


FIG 38

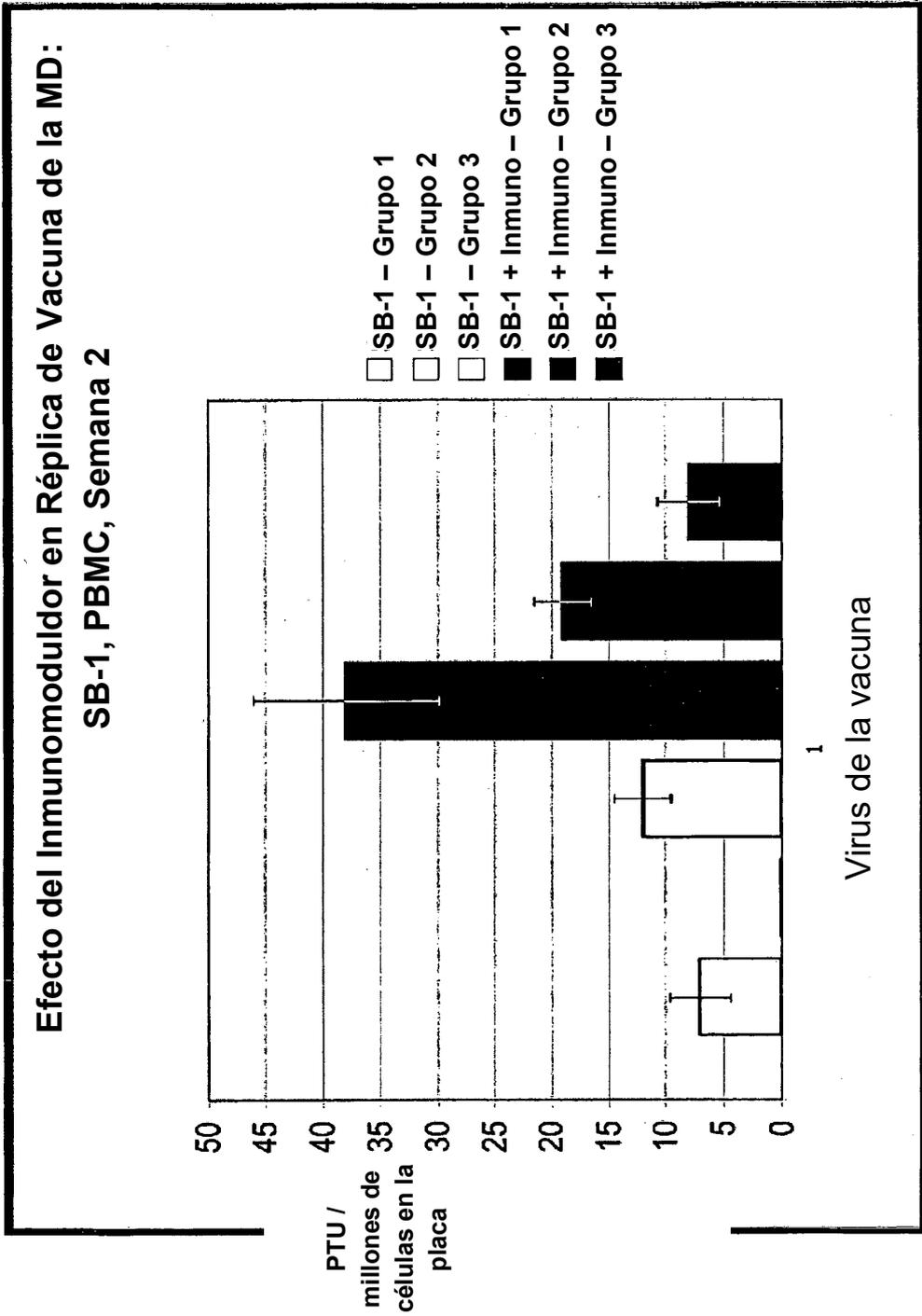


FIG 39

Saculitis Aérea

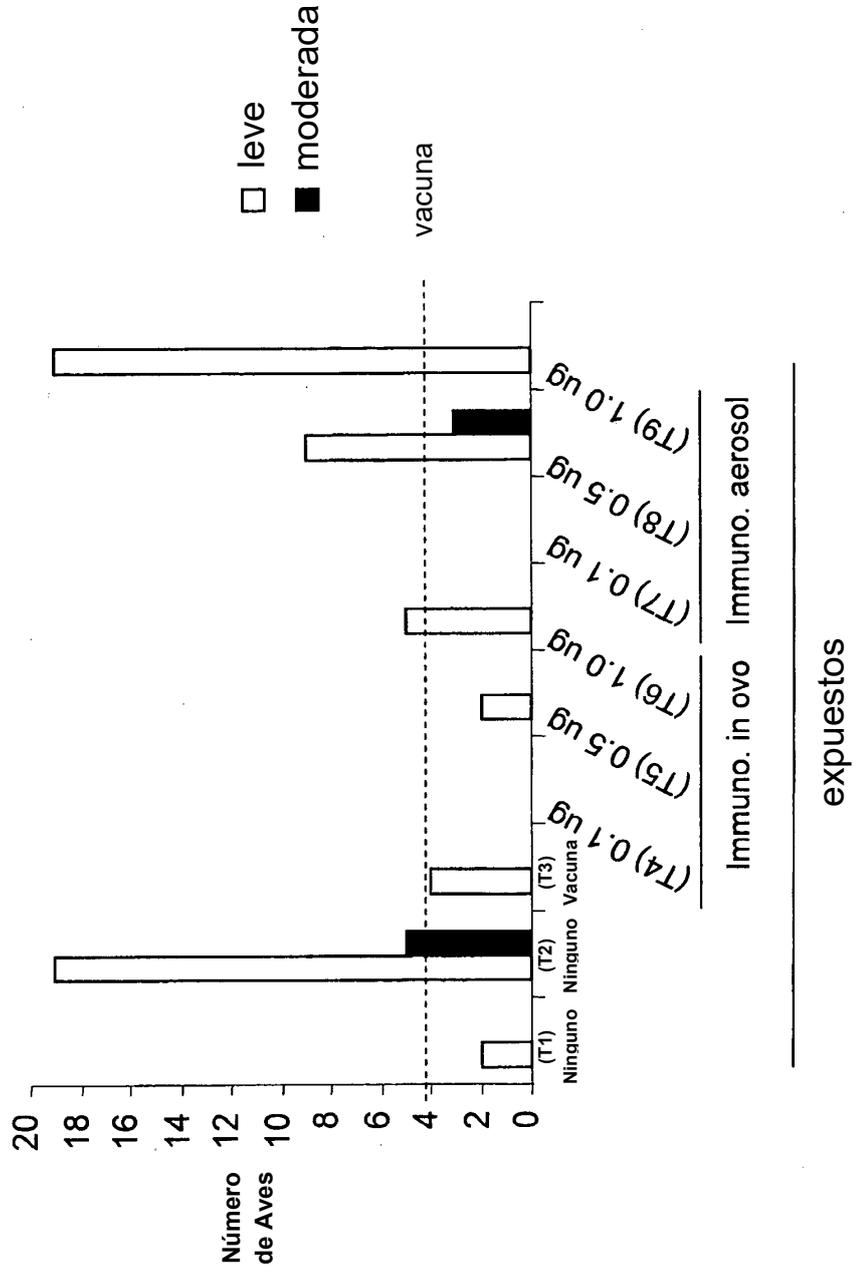


FIG 40
ELISA, Día 26

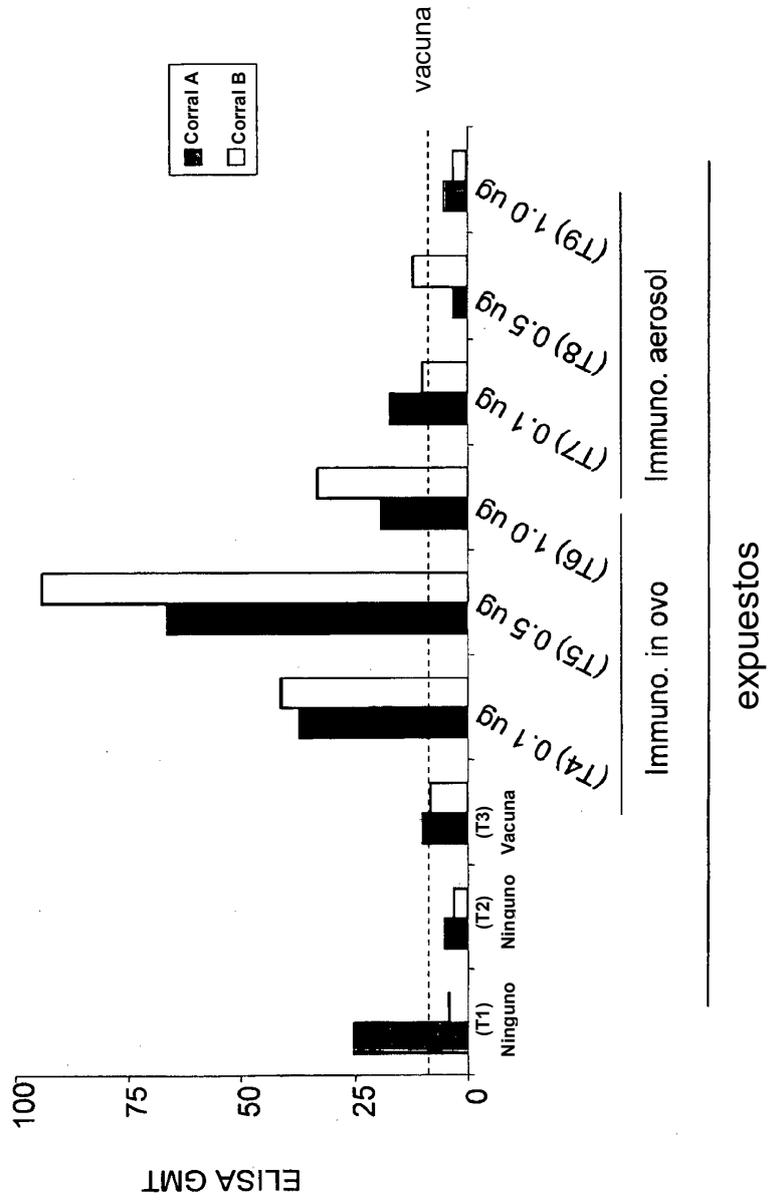


FIG 41

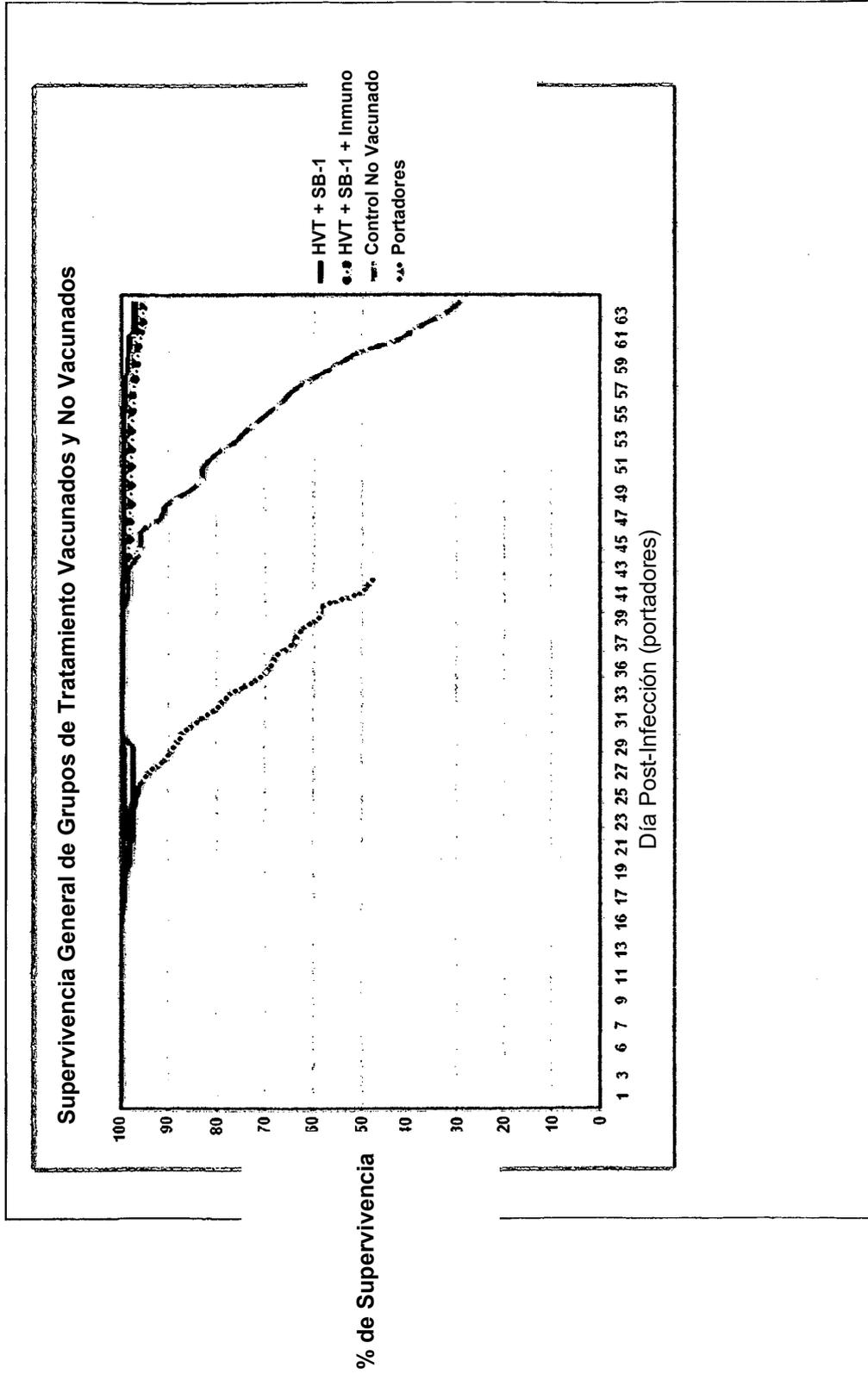


FIG 42

