



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 176**

51 Int. Cl.:

C12N 15/20 (2006.01)	C12N 15/21 (2006.01)
C12N 15/22 (2006.01)	C12N 15/23 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)	A61K 38/21 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)	A61K 39/255 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)	G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96903831 .4**

96 Fecha de presentación : **05.03.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0815233**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.1998**

54

Título: **Citocinas aviaries novedosas y secuencias genéticas que codifican para las mismas.**

30

Prioridad: **06.03.1995 AU PN1542**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2011

73

Titular/es: **COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND
INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION
Limestone avenue
Campbell, Act 2612, AU**

72

Inventor/es: **Lowenthal, John, William;
York, Jennifer, Joy;
O'Neil, Terri, Ellen;
Rhodes, Stephen y
Digby, Matthew, Robert**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 366 176 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

Citocinas aviares novedosas y secuencias genéticas que codifican para las mismas

5 La presente invención se refiere en general a polipéptidos recombinantes que tienen propiedades de citocina aviar o propiedades similares a citocina aviar y a secuencias genéticas que codifican para las mismas. Más particularmente, la presente invención se refiere a polipéptidos de interferón tipo II aviar recombinante y específicamente a un interferón- γ aviar (IFN- γ) y a usos del mismo como modulador de la respuesta inmunitaria y como agente potenciador del crecimiento.

10 Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia en esta memoria descriptiva por el autor se recogen al final de la descripción. Los números de identidad de secuencia (SEQ ID NO.) para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos a las que se hace referencia en la memoria descriptiva se definen tras la bibliografía.

A lo largo de toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

15 La sofisticación en rápido crecimiento de la tecnología de ADN recombinante facilita enormemente la investigación en los campos médico y veterinario. La investigación en citocinas es de particular importancia, especialmente puesto que estas moléculas regulan la proliferación, diferenciación y función de una gran variedad de células, tales como células implicadas en la mediación de una respuesta inmunitaria. La administración de citocinas recombinantes o la regulación de la función y/o síntesis de citocinas se está convirtiendo, de manera creciente, en el centro de la investigación médica en el tratamiento de una gama de estados patológicos en seres humanos y animales.

20 En mamíferos, los interferones (IFN) representan una familia de citocinas que comparten la capacidad para inhibir la replicación viral y ejercer efectos sobre la función inmunitaria. Existen dos tipos distintos de IFN. El IFN tipo I lo produce una variedad de tipos de células en respuesta a la infección viral e incluye a IFN- α y β . Normalmente, el IFN- α lo producen leucocitos tales como monocitos y macrófagos mientras que los fibroblastos y las células epiteliales son la fuente principal de IFN- β . Los IFN tipo I comparten un alto grado de homología de aminoácidos, se unen al mismo receptor de superficie celular y sus funciones biológicas son resistentes al tratamiento con pH bajo y calor. (Weissmann y Weber, 1986).

25 En cambio, la producción de IFN- γ tipo II en mamíferos se restringe a células T activadas y células NK y está codificada por un gen que no está relacionado con los que expresan IFN- α o IFN- β . Las características que distinguen IFN- γ de α/β incluye su unión a receptores de superficie celular diferentes y que el primero es sumamente sensible al tratamiento con pH bajo y calor (Weissmann y Weber, 1986). Otra diferencia es la capacidad de IFN- γ , pero no de IFN- α o IFN- β , para estimular que los macrófagos produzcan productos intermedios de nitrógeno reactivos tales como óxido nítrico, nitrato y nitrito (Fast *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993).

30 Las células T de pollo producen IFN tras la estimulación con antígeno o mitógeno (Prowse y Pallister, 1989; Lowenthal *et al.*, 1993; Pusztai *et al.*, 1986; Weiler y von Bulow, 1987; Dijkmans *et al.*, 1990) tal como se mide mediante la capacidad para proteger fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) frente a la lisis mediada por virus. Existe controversia con respecto a si esta actividad de IFN es el equivalente de tipo I o tipo II de IFN de mamífero (Lillehoj *et al.*, 1992). De hecho, se ha cuestionado la existencia de IFN- γ en especies aviares (Dijkmans *et al.*, 1990).

35 Lillehoj *et al.* (1993a) tratan IL-2 aviar e interferón- γ . Lillehoj *et al.* (1993b) notifican la purificación parcial de IL-2 e IFN- γ a partir de linfocitos de pollo.

40 El gen para IFN tipo I de pollo (ChIFN- α) se ha clonado recientemente (Sekellick *et al.*, 1994) y cuando se comparó la proteína con IFN de mamífero se mostró que tenía un 20-24% de identidad de secuencia de aminoácidos con IFN tipo I, mientras que no estaba relacionada con polipéptidos de IFN- γ de mamífero. Además, se mostró que ChIFN- α recombinante tiene actividad antiviral, pero carece de función de activación de macrófagos porque no puede inducir la secreción de nitrito en monocitos (Schultz *et al.*, 1995), lo que concuerda con las propiedades de IFN tipo I de mamífero.

45 En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores han generado varias líneas de células T de pollo únicas a partir de cultivos de células de bazo transformadas con el virus de la reticuloendoteliosis (VRE) (Lowenthal *et al.*, 1995a,b). Estas líneas de células T se clonaron a partir de células individuales que expresaban los marcadores de células T CD3 y CD4/CD8. Los inventores han mostrado que algunos de estos clones de células T

producen de manera constitutiva altos niveles de interferón que tienen las propiedades de IFN- γ tal como se determina mediante la capacidad de sus sobrenadantes para prevenir la lisis mediada por virus de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF), la labilidad de la actividad de IFN al calor y pH bajo y la capacidad de estos sobrenadantes para inducir la producción de nitrito por macrófagos de pollo.

5 Los inventores han generado una biblioteca de ADNc a partir de una de las líneas de células T clonadas que producen una actividad de interferón- γ y han aislado y secuenciado satisfactoriamente una molécula de ácido nucleico que codifica para, o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para IFN- γ aviar (a continuación en el presente documento denominada "ChIFN- γ "). se han producido y expresado constructos genéticos recombinantes que comprenden la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención en células transformadas y se han producido moléculas inmunorreactivas, en particular anticuerpos monoclonales y policlonales, frente al polipéptido de IFN- γ recombinante producido a partir de los mismos. Sorprendentemente, el IDN-y de la presente invención posee muchas características útiles, incluyendo la capacidad para promover el crecimiento de una especie aviar o para prevenir la pérdida de peso durante infecciones patógenas cuando se administra a la misma por cualquier medio, además de la capacidad de actuar como molécula inmunomoduladora a través de los límites de especie.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende:

(i) una secuencia que codifica para un interferón- γ aviar que comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, o al menos el 40% idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1; o

(ii) una secuencia que es complementaria a la secuencia de (i).

El término "aviar" significa un miembro de la clase de vertebrados denominados comúnmente aves. Tal como se usa en el presente documento, el término "aviar" incluye ambos sexos y todos los estadios de desarrollo de las especies de aves de corral, aves domésticas y aves de caza seleccionadas de la lista que comprende pollos, pavos, gallinas de Bantam, codornices, gallinas de Guinea, patos, gansos, avestruces, emús, palomas, canarios, periquitos, loros y pinzones, entre otros.

A continuación en el presente documento, la expresión "polipéptido de citocina" se refiere a una molécula de polipéptido que comprende al menos una subunidad de una proteína biológicamente activa que posee una o más de las características biológicas características de una citocina, en particular la capacidad para afectar a las funciones de una célula que funciona en el sistema inmunitario de un animal.

A continuación en el presente documento, la expresión "polipéptido de interferón tipo II" se refiere a un polipéptido de citocina tal como se define anteriormente en el presente documento en el que dicha citocina posee al menos una, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, todavía incluso más preferiblemente al menos cinco y lo más preferiblemente seis de las siguientes propiedades características:

(i) Puede prevenir la lisis mediada por virus de una célula aviar tal como, pero sin limitarse a una célula de fibroblasto embrionario de pollo o una célula de fibroblasto embrionario de pavo;

(ii) es sensible al tratamiento que comprende temperatura alta, preferiblemente temperaturas de al menos 50°C, más preferiblemente al menos 60°C;

(iii) es sensible a la exposición a pH bajo, preferiblemente valores de pH de entre 1 y 6, más preferiblemente valores de pH de entre 1 y 3, en particular un valor de pH de 2,0;

(iv) puede inducir que los macrófagos secreten productos intermedios de nitrógeno reactivos tales como nitrito, nitrato u óxido nítrico, entre otros;

(v) funciona como una molécula inmunomoduladora en una especie aviar; y (vi) funciona como un agente promotor del crecimiento o potenciador del crecimiento en una especie aviar.

Las referencias en el presente documento a "polipéptido de interferón tipo II" incluyen todas las posibles moléculas de fusión entre dicho polipéptido tal como se define anteriormente en el presente documento y otro polipéptido, en particular una molécula de interferón tipo I tal como IFN- α o IFN- β o, alternativamente, un segundo interferón tipo II o molécula similar a interferón tipo III. En una realización preferida, sin embargo, las referencias contenidas en el presente documento a "polipéptido de interferón tipo II" indican un polipéptido de IFN- γ aviar o una molécula de

fusión que comprende el mismo.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “molécula inmunomoduladora” se refiere a un polipéptido, proteína u otra sustancia que al menos puede alterar la respuesta inmunitaria de un animal frente a un agente promotor de enfermedad tal como un agente infeccioso o un agente que induce cáncer, entre otros. Por consiguiente, la presente invención se refiere particularmente a polipéptidos de interferón tipo II aviar que al menos pueden alterar una respuesta inmunitaria en un ave o alternativamente una molécula de fusión que comprende los mismos que al menos pueden alterar una respuesta inmunitaria en un ave o mamífero frente a un antígeno o agente infeccioso tal como, pero sin limitarse a virus de la bronquitis infecciosa, virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia del pollo, virus de la gripe aviar, *E. coli*, *Salmonella ssp.*, *Eimeria ssp.* o *Mycoplasma ssp.* entre otros, para aliviar los síntomas asociados con los mismos, en particular la reducción del rendimiento de crecimiento.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “agente promotor del crecimiento o potenciador del crecimiento” o expresión similar se refiere a la capacidad de una sustancia para conducir a un aumento de peso en una especie aviar o para prevenir pérdidas de peso normalmente detectables durante o tras la infección patógena de una especie aviar, cuando se administra a la misma, o bien en cualquier forma tal como una vacuna, adyuvante, polipéptido recombinante, polipéptido sintético, composición farmacéutica o bien producto alimenticio terapéutico, entre otros.

20 En una realización preferida, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para, o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de interferón- γ aviar pudiendo hibridarse dicha molécula de ácido nucleico en condiciones de rigurosidad al menos baja con la molécula de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO:1 o una hebra complementaria de la misma, y comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico aislada una secuencia de nucleótidos que es al menos el 40% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1.

25 En una realización particularmente preferida, la molécula de ácido nucleico de la presente invención se deriva de pollos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “se deriva de” indica que un número entero particular o grupo de números enteros se ha originado a partir de la especie especificada, pero no se ha obtenido necesariamente directamente de la fuente especificada.

30 En una realización preferida más particular, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para, o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un IFN- γ de pollo.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención lo más preferiblemente comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente igual o complementaria a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1

35 Para fines de nomenclatura, la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1 se refiere a la secuencia de ADNc de IFN- γ de pollo, denominada a continuación en el presente documento el “gen de ChIFN- γ ”, que se expresa en células T activadas y células NK para producir un polipéptido que puede estimular que los macrófagos produzcan productos intermedios de nitrógeno reactivos tales como óxido nítrico, nitrato o nitrito.

La referencia en el presente documento a un “gen”, incluyendo el “gen de ChIFN- γ ”, debe tomarse en su contexto más amplio e incluye:

40 (i) un gen genómico clásico que consiste en secuencias reguladoras de traducción y/o transcripción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias no traducidas en 5' y 3'); y/o

(ii) ARNm o ADNc que corresponde a las regiones codificantes (es decir, exones) que comprende opcionalmente secuencias no traducidas en 5' o 3' del gen.

45 El término “gen” se usa también para describir moléculas de fusión o sintéticas que codifican para todo o parte de un producto funcional. Los genes de ChIFN- γ sintéticos pueden derivarse de un gen de ChIFN- γ que se produce de manera natural mediante técnicas recombinantes convencionales. Generalmente, un gen de ChIFN- γ puede someterse a mutagénesis para producir sustituciones, deleciones y/o adiciones de nucleótidos individuales o múltiples. Los derivados por inserción de nucleótidos del gen de citocina ChIFN- γ de la presente invención incluyen fusiones terminales en 5' y 3' así como inserciones intrasecuencia de nucleótidos individuales o múltiples. Las variantes de secuencia de nucleótidos por inserción son aquéllas en las que se introducen uno o más nucleótidos en un sitio predeterminado en la secuencia de nucleótidos aunque también es posible la inserción al azar con selección adecuada del producto resultante. Las variantes por deleción se caracterizan por la eliminación de uno o más

5 nucleótidos de la secuencia. Las variantes de nucleótidos por sustitución son aquéllas en las que se ha eliminado al menos un nucleótido en la secuencia y se ha insertado un nucleótido diferente en su lugar. Una sustitución de este tipo puede ser "silenciosa" porque la sustitución no cambia el aminoácido definido por el codón. Alternativamente, se diseñan los sustituyentes para alterar un aminoácido por otro aminoácido que actúa de manera similar, o un aminoácido de carga, polaridad o hidrofobicidad similares.

La presente invención se extiende a la molécula de ácido nucleico aislada cuando se integra en el genoma de una célula como una adición al complemento celular endógeno de los genes de citocina. Opcionalmente, la molécula de ácido nucleico integrada contiene una secuencia promotora derivada del mismo o de otro gen, que regula la expresión de la secuencia del gen de IFN- γ contenida en el mismo.

10 Normalmente el ácido nucleico de la invención es un gen de interferón tipo II derivado de una fuente aviar además de pollos, tal como pero sin limitarse a, cualquier especie de ave de corral, ave doméstica o ave de caza seleccionada de la lista que comprende pavos, gallinas de Bantam, codornices, gallinas de Guinea, patos, gansos, avestruces, emús, palomas, canarios, periquitos, loros y pinzones, entre otros. El ácido nucleico puede ser un gen de interferón tipo II aviar derivado de tejidos embrionarios o células cultivadas de origen aviar.

15 Preferiblemente, el gen de interferón tipo II aviar relacionado tiene utilidad en productos alimenticios terapéuticos o composiciones de vacuna como molécula inmunomoduladora o agente potenciador del crecimiento para el tratamiento de animales tales como, pero sin limitarse a aves, mamíferos o seres humanos.

20 Los expertos en la técnica relevante podrán aislar fácilmente una o más secuencias del gen de interferón tipo II relacionadas sin demasiada experimentación, cuando se les proporciona la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

25 Como consecuencia, la presente invención se extiende a cualquier gen de interferón tipo II aviar y cualquier gen funcional o molécula no funcional pero que son al menos útiles como, por ejemplo, sondas genéticas, o secuencias de cebador en la síntesis química o enzimática de dicho gen, o en la generación de moléculas recombinantes inmunológicamente interactivas, sujetas a la condición de que dicho gen de interferón tipo II aviar está relacionado al menos al 40% con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

La presente invención abarca claramente un clon genómico equivalente de la molécula de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO:1 en la que dicho clon genómico comprende al menos una parte del gen de ChIFN- γ .

30 Por consiguiente, una realización alternativa de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1, o que tiene al menos el 40%, preferiblemente al menos el 55%, todavía más preferiblemente al menos el 65%, aún todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 75-80% e incluso todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 85-95% de similitud de nucleótidos con toda o una parte de la misma.

35 En una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de interferón- γ aviar comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que es al menos el 40% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1

En la realización más preferida de la invención, dicho IFN- γ es ChIFN- γ .

40 En una realización alternativa, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para, o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de interferón- γ aviar y que puede hibridarse en condiciones de rigurosidad al menos baja con la molécula de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1, o con una hebra complementaria de la misma.

Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico puede hibridarse en condiciones de rigurosidad al menos moderada, incluso más preferiblemente en condiciones de rigurosidad al menos de nivel alto.

45 En la realización más preferida de la invención, dicho IFN- γ es ChIFN- γ .

50 Para el fin de definir el nivel de rigurosidad, se define una rigurosidad baja en el presente documento como una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en tampón 6xSSC, SDS al 0,1% (p/v) a 28°C. Una rigurosidad moderada se define en el presente documento como una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en tampón 2xSSC, SDS al 0,1% (p/v) a una temperatura en el intervalo de 45°C a 65°C. Una rigurosidad alta se define en el presente documento como una hibridación y/o un lavado llevado a cabo en tampón 0,1xSSC, SDS al 0,1% (p/v) a una temperatura de al

menos 65°C.

5 Generalmente, la rigurosidad se aumenta reduciendo la concentración de tampón SSC, y/o aumentando la concentración de SDS y/o aumentando la temperatura de la hibridación y/o el lavado. Los expertos en la técnica serán conscientes de que las condiciones para la hibridación y/o el lavado pueden variar dependiendo de la naturaleza de la membrana de hibridación o el tipo de sonda de hibridación usada. Las condiciones para las hibridaciones y los lavados las entiende bien un experto habitual en la técnica. Para fines de clarificación de los parámetros que afectan a la hibridación entre moléculas de ácido nucleico, se encuentra una referencia en las páginas 2.10.8 a 2.10.16. de Ausubel *et al.* (1987).

10 En una realización alternativa adicional, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de interferón- γ aviar en la que:

dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos el 40% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1; y

15 dicha molécula de ácido nucleico puede hibridarse en condiciones de rigurosidad al menos baja con la molécula de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1, o con una hebra complementaria de la misma.

Preferiblemente, dicho es ChIFN γ .

El ácido nucleico de la invención puede usarse en un método para identificar una secuencia genética de interferón tipo II aviar.

20 Normalmente, dicho método comprende poner en contacto ADN genómico, o ARNm o ADNc con una cantidad eficaz para hibridación de un ácido nucleico de la invención y entonces detectar dicha hibridación.

25 La secuencia genética relacionada puede estar en una forma recombinante, en una partícula de virus, partícula de bacteriófago, célula de levadura, célula animal o una célula vegetal. Preferiblemente, la secuencia genética relacionada se origina a partir de una especie aviar. Más preferiblemente, la secuencia genética relacionada se origina a partir de una especie aviar seleccionada de la lista que comprende pollos, pavos, gallinas de Bantam, codornices, gallina de Guinea, patos, gansos, avestruces, emús, palomas, canarios, periquitos, loros y pinzones, entre otros. En una realización particularmente preferida, las secuencias genéticas relacionadas se originan a partir de pollos.

30 Preferiblemente, el ácido nucleico de la invención (es decir, esta última secuencia genética o sonda) comprende una secuencia de nucleótidos o al menos 50 nucleótidos, más preferiblemente al menos 100 nucleótidos e incluso más preferiblemente al menos 500 nucleótidos derivados de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o su complemento.

Preferiblemente, esta última secuencia genética se marca con una molécula indicadora que puede proporcionar una señal identificable (por ejemplo un radioisótopo tal como ^{32}P o ^{35}S o una molécula biotinilada).

35 El ácido nucleico de la invención puede usarse en un método para identificar una secuencia genética de interferón tipo II aviar que comprende poner en contacto dos ácidos nucleicos no complementarios, "moléculas de cebador", de al menos 12 nucleótidos de longitud derivados de la secuencia de nucleótidos de un gen de citocina tipo II aviar con una molécula de molde de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos relacionadas con las secuencias de la molécula de cebador y amplificar copias de moléculas de ácido nucleico específicas de la molécula de molde en una reacción en cadena de la polimerasa.

40 En el método, la primera molécula de cebador se deriva preferiblemente de la hebra sentido de un gen de IFN- γ aviar tal como el gen de ChIFN- γ y en particular de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1 y la segunda molécula de cebador se deriva preferiblemente de la hebra antisentido de un gen de IFN- γ aviar tal como el gen de ChIFN- γ y en particular del complemento de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1. Por consiguiente, ambos cebadores se hibridan con dicha molécula de molde de manera que, en presencia de una enzima ADN polimerasa, un cofactor y sustrato apropiado, se produce la síntesis de ADN en la dirección de 5' a 3' de cada molécula de cebador hacia la posición en el ADN en la que la otra molécula de cebador está hibridada, amplificando de ese modo el ADN intermedio.

50 La molécula de cebador de ácido nucleico puede consistir adicionalmente en una combinación de cualquiera de los nucleótidos adenina, citidina, guanina, timidina o inosina, o análogos funcionales o derivados de los mismos, que pueden incorporarse en una molécula de polinucleótido siempre que pueda hibridarse en condiciones de rigurosidad

al menos baja con la molécula de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO:1.

Las moléculas de cebador de ácido nucleico pueden estar contenidas cada una adicionalmente en un conjunto acuoso que comprende otras moléculas de cebador de ácido nucleico. Más preferiblemente, la molécula de cebador de ácido nucleico está en una forma sustancialmente pura.

- 5 La molécula de molde de ácido nucleico puede estar en una forma recombinante, en una partícula de virus, partícula de bacteriófago, célula de levadura, célula animal o una célula vegetal. Preferiblemente, la secuencia genética relacionada se origina a partir de una célula, tejido u órgano aviar. Más preferiblemente, la secuencia genética relacionada se origina a partir de una célula, tejido u órgano de pollo.

- 10 Otro aspecto de la presente invención proporciona un constructo genético que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención operativamente unida a una secuencia promotora.

En una realización preferida, dicho constructo codifica para IFN- γ .

En una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona un constructo genético que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1.

- 15 Los constructos genéticos de la presente invención son particularmente útiles para la producción del polipéptido de citocina recombinante codificado en los mismos, cuando se introduce en una línea celular o partícula de virus y en condiciones adecuadas para que se produzca la expresión génica. Tales condiciones dependerán de la línea celular y el vector de expresión usados en cada caso y las conocerá bien el experto en la técnica.

- 20 Puede emplearse cualquier número de vectores de expresión dependiendo de si la expresión se requiere en una célula procariota o eucariota o partícula de virus. Además, se sabe bien en la técnica que la secuencia promotora usada en el vector de expresión variará también dependiendo del nivel de expresión requerido y de si se pretende que la expresión sea constitutiva o regulada.

- 25 Para la expresión en células eucariotas, el constructo genético generalmente comprende, además de la molécula de ácido nucleico de la invención, un promotor y opcionalmente otras secuencias reguladoras diseñadas para facilitar la expresión de dicha molécula de ácido nucleico. El promotor puede derivarse de un clon genómico que codifica para una molécula de interferón tipo II aviar, en particular ChIFN- γ o, alternativamente, puede ser un promotor heterólogo de otra fuente. Se conocen bien en la técnica secuencias promotoras adecuadas para la expresión de genes en células eucariotas. En una realización preferida, el promotor puede expresarse en una célula aviar.

- 30 Los ejemplos de células eucariotas que se contempla en el presente documento que son adecuadas para la expresión incluyen células aviares, de mamífero, de levadura, de insecto, vegetales o líneas celulares tales como líneas celulares COS, VERO, HeLa, C127 de ratón, ovario de hámster chino (CHO), WI-38, riñón de cría de hámster (BHK) o MDCK. Tales líneas celulares están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica.

- 35 En relación con esta invención, se ha clonado una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1 en el vector de plásmido pCDNA3, que es adecuado para la expresión en células COS eucariotas, para producir el plásmido pCDNA3/G-IFN aviar. Se han depositado células COS aisladas que contienen el constructo genético pCDNA3/G-IFN aviar el 28 de febrero, 1995 conforme a y en cumplimiento del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes, en el Australian Government Analytical Laboratories (AGAL), 1 Suakin Street, Pymble, New South Wales 2073, Australia, con número de registro de AGAL N95/12388.

- 40 El requisito previo para producir polipéptidos intactos en *E. coli* es el uso de un promotor fuerte con un sitio de unión al ribosoma eficaz. Los promotores típicos adecuados para la expresión en células bacterianas tales como *E. coli* incluyen, pero no se limitan a, el promotor *lacZ*, promotores λ_L o λ_R sensibles a temperatura, promotor T7 o el promotor *tac* inducible por IPTG. Varios otros sistemas de vectores para expresar la molécula de ácido nucleico de la invención en *E. coli* se conocen bien en la técnica y se describen por ejemplo en Ausubel *et al.* (1987) o Sambrook *et al.* (1989).

- 45 Se han descrito numerosos plásmidos con secuencias promotoras adecuadas para la expresión en bacterias y sitios de unión al ribosoma eficaces, tales como por ejemplo, pKC30 (λ_L : Shimatake y Rosenberg, 1981), pKK173-3 (*tac*: Amann y Brosius, 1985), pET-3 (T7: Studier y Moffat, 1986) o la serie pQE de vectores de expresión (Qiagen, CA), entre otros.

- 50 Las células procariotas adecuadas incluyen *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.*, entre otras. Las cepas bacterianas que son adecuadas para el presente fin se conocen en la

técnica (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989).

5 En relación con esta invención, se ha clonado una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1 en un vector de plásmido adecuado para la expresión en una célula bacteriana y se ha transformado en la bacteria *Escherichia coli* para producir la cepa de *E. coli* pQE ChIFN- γ . La cepa de *E. coli* pQE ChIFN- γ se ha depositado el 16 de febrero de 1996 conforme al y en cumplimiento del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes, en el Australian Government Analytical Laboratories (AGAL), 1 Suakin Street, Pymble, New South Wales 2073, Australia, con número de registro de AGAL N96/9464.

10 En una realización alternativa, la presente invención se extiende a un constructo genético que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de citocina aviar, en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión entre interferón γ aviar y o bien un segundo interferón tipo II o bien un interferón tipo I seleccionado de la lista que comprende IFN- α , IFN- β , ChIFN- α o ChIFN- β , en el que dicho interferón γ aviar comprende una secuencia de residuos de aminoácido tal como se expone en SEQ ID NO: 2 o es al menos el 40% idéntica a la misma a lo largo de la longitud de SEQ ID NO: 2.

15 Preferiblemente, dicho IFN- γ es Ch IFN- γ .

20 Con el fin de producir un polipéptido de fusión, la molécula de ácido nucleico que codifica para una primera región codificante que comprende un polipéptido de citocina aviar se clona adyacente a una segunda región codificante, opcionalmente separadas por una molécula de ácido nucleico espaciadora de manera que la primera región codificante y la segunda región codificante están en el mismo marco de lectura abierto, sin codones de parada intermedios entre las dos regiones codificantes. Cuando se traduce, el polipéptido así producido comprende una fusión entre los productos de polipéptido de la primera y segunda regiones codificantes. Un constructo genético que codifica para un polipéptido de fusión comprende además al menos un codón de iniciación y un codón de terminación, que pueden ser reconocidos por la maquinaria de traducción de la célula en la que se pretende su expresión. Los métodos para la producción de un polipéptido de fusión los conocen bien los expertos en la técnica.

25 La invención proporciona también un polipéptido de citocina aviar recombinante que comprende una secuencia de residuos de aminoácido sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o es al menos el 40% idéntica a la misma.

30 Por "citocina aviar recombinante" o la expresión relacionada "molécula recombinante" quiere decirse una molécula de polipéptido glicosilado o no glicosilado, incluyendo un polipéptido de fusión, sin otras moléculas asociadas (por ejemplo lípidos) producido por medios recombinantes tales como la presencia de una molécula de ADN en un vector de expresión en el marco de lectura correcto en relación con un promotor e introduciendo el vector de expresión recombinante resultante en un huésped adecuado y haciendo crecer dicho huésped en condiciones apropiadas para su expresión y, si es necesario, el transporte de la proteína recombinante o su derivado desde dicho huésped y purificando entonces la molécula recombinante.

35 Para fines de nomenclatura, la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2 es polipéptido de IFN- γ de pollo (ChIFN- γ) que se expresa en células NK y células T activadas para producir un polipéptido que puede estimular que los macrófagos produzcan productos intermedios de nitrógeno reactivos tales como óxido nítrico, nitrato o nitrito.

40 Los derivados de un polipéptido de interferón tipo II aviar incluyen sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos individuales o múltiples a la molécula. De manera conveniente, éstas se preparan haciendo en primer lugar sustituciones, deleciones y/o adiciones de nucleótidos individuales o múltiples en la molécula de ácido nucleico que codifica para la citocina aviar. Alternativamente, una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos, los aminoácidos pueden añadirse químicamente mediante técnicas establecidas y en cualquier secuencia requerida para proporcionar el mutante deseado.

45 Los derivados por inserción de aminoácidos del interferón tipo II aviar de la presente invención incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales así como inserciones intrasecuencia de aminoácidos individuales o múltiples. Las variantes de secuencia de aminoácidos por inserción son aquéllas en las que se introducen uno o más residuos de aminoácido en un sitio predeterminado en la proteína aunque también es posible la inserción al azar con selección adecuada del producto resultante. Las variantes por deleción se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes de aminoácidos por sustitución son aquéllas en las que se ha eliminado al menos un residuo en la secuencia y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Sustituciones típicas son aquéllas realizadas según la tabla 1.

50 Cuando se produce un derivado de citocina aviar se produce por sustitución de aminoácidos, los aminoácidos se

5 reemplazan generalmente por otros aminoácidos que tienen propiedades similares, tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, electronegatividad, cadenas laterales voluminosas y similares. Las sustituciones de aminoácidos son normalmente de residuos individuales. Las inserciones de aminoácidos estarán habitualmente en el orden de aproximadamente 1-10 residuos de aminoácido y las deleciones oscilarán entre aproximadamente 1-20 residuos. Preferiblemente, las deleciones o inserciones se realizan en pares adyacentes, es decir una deleción de dos residuos y una inserción correspondiente de dos residuos.

Por conveniencia y a modo de notación abreviada, la referencia en el presente documento a una citocina aviar, en particular un interferón tipo II aviar tal como IFN- γ , ChIFN- γ o un polipéptido similar a interferón aviar incluye la referencia a cualquier derivado del mismo como se contempla anteriormente.

10

TABLA 1

Residuos adecuados para sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn; Glu
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile; Val
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu; Met

15

Las variantes de aminoácidos a las que se hace referencia anteriormente pueden realizarse fácilmente usando técnicas de péptidos sintéticos bien conocidas en la técnica, tales como síntesis de péptidos en fase sólida y similares, o mediante manipulaciones de ADN recombinante. Las técnicas para realizar las mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene secuencias conocidas o parcialmente conocidas se

conocen bien e incluyen, por ejemplo, la mutagénesis con M13. La manipulación de la secuencia de ADN para producir proteínas variantes que se manifiestan como variantes por sustitución, inserción o delección se describen de manera conveniente, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (1987) o Sambrook *et al.* (1989).

5 Otros ejemplos de mutantes sintéticos o recombinantes y derivados del polipéptido de interferón tipo II aviar de la presente invención incluyen sustituciones, delecciones y/o adiciones individuales o múltiples de cualquier molécula asociada con la enzima tal como hidratos de carbono, lípidos y/o proteínas o polipéptidos.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de producción de un interferón tipo II aviar recombinante en una célula que comprende expresar en dicha célula una molécula de ácido nucleico de la invención.

10 En una realización relacionada, la presente invención proporciona un método de producción de un interferón tipo II aviar recombinante en una célula que comprende las etapas de:

(i) introducir en dicha célula un constructo genético de la invención;

(ii) cultivar dicha célula durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicha molécula de ácido nucleico se exprese; y

15 (iii) opcionalmente aislar de dicha célula dicha molécula de citocina recombinante.

En una realización relacionada adicional, la presente invención se extiende a un método de producción de una molécula de citocina aviar recombinante en una célula que comprende introducir en dicha célula un constructo genético que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de citocina aviar, en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión entre un primer interferón tipo II o molécula similar a interferón tipo II y un segundo interferón tipo II o un interferón tipo I seleccionado de la lista que comprende IFN- α , IFN- β , Ch IFN- α o Ch IFN- β , entre otros.

20

Preferiblemente, dicho método comprende además la etapa de introducir dicho constructo genético en dicha célula antes de la etapa de obtener expresión del mismo.

25 Según las realizaciones anteriores descritas en este aspecto de la invención, la citocina recombinante o interferón tipo II es preferiblemente una molécula de polipéptido de IFN- γ o una molécula de fusión que comprenden el mismo. En una realización particularmente preferida, la citocina es el polipéptido de ChIFN- γ expuesto en SEQ ID NO:2 o una molécula de fusión que comprende el mismo.

30 Para la expresión óptima en un tejido particular o en condiciones especificadas, la molécula de ácido nucleico puede colocarse operativamente bajo el control de una secuencia promotora tal como las tratadas anteriormente. Partículas de virus y células adecuadas para este fin se tratan también anteriormente. Las secuencias promotoras y condiciones de cultivo para células o partículas de virus que producen niveles altos de expresión las conocen bien los expertos en la técnica.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una célula aislada que expresa un polipéptido de citocina aviar recombinante o endógena, en la que dicho polipéptido es un interferón tipo II.

35 En una realización preferida, la presente invención proporciona una célula aislada que expresa una citocina aviar, en la que dicha citocina es un interferón tipo II.

Más preferiblemente, dicha citocina es una molécula recombinante, por ejemplo un polipéptido de fusión entre una molécula de interferón tipo II y una segunda molécula de citocina.

40 En la realización más preferida, la molécula de interferón tipo II según este aspecto de la invención es IFN- γ , en particular ChIFN- γ . La célula aislada puede ser una célula eucariota aislada que expresa una forma no recombinante de dicha citocina, interferón tipo II.

45 En relación con esta invención, se ha depositado un clon de células T aislado denominado CC8.1h que expresa el gen de ChIFN- γ el 10 de octubre de 1994 conforme a y en cumplimiento del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes, en el Australian Government Analytical Laboratories (AGAL), 1 Suakin Street, Pymble, New South Wales 2073, Australia, con número de registro de AGAL N94/46035.

Alternativamente, la célula aislada puede ser una célula procariota o eucariota transformada que expresa un interferón tipo II a partir de un constructo genético, tales como los tratados anteriormente, que se ha introducido en la misma. Los medios para introducir constructos genéticos en una célula los conocen bien los expertos en la técnica.

5 Por consiguiente, a modo de ejemplo, se proporciona en la realización más particularmente preferida, una célula bacteriana aislada que expresa ChIFN- γ recombinante, en la que dicha célula se ha depositado en el Australian Government Analytical Laboratory el 16 de febrero de 1996 con número de registro de AGAL N96/9464.

También a modo de ejemplo, la presente invención proporciona una célula eucariota aislada que expresa ChIFN- γ recombinante, en la que dicha célula se ha depositado en el Australian Government Analytical Laboratory el 28 de febrero de 1995 con número de registro de AGAL N95/12388.

10 En una realización adicional, la presente invención se extiende a una célula aislada que comprende un constructo genético tal como se define anteriormente en el presente documento.

Los medios para aislar una célula que expresa una citocina aviar recombinante o endógena tal como un interferón tipo II los conocen bien los expertos en la técnica.

15 El interferón tipo II aviar recombinante contemplado en el presente documento o células que expresan el mismo encontrarán aplicación particular en las industrias ganaderas intensivas tales como la exportación de animales vivos, engordes en corral e industrias de crianza intensiva. En particular, el ganado tal como aves de corral, aves domésticas y aves de caza es altamente susceptible a enfermedades infecciosas, tales como las transmitidas por virus, bacterias o micoplasmas. Los agente infecciosos virales importantes incluyen virus de la bursitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia del pollo o virus de la gripe aviar, entre otros. Los agentes bacterianos importantes incluyen *E. coli*, *Samonella ssp.* o *Eimeria ssp.*, entre otros.

25 Sin restringirse a ninguna teoría o modo de acción, las citocinas aviares tales como los interferones tipo II, en particular ChIFN- γ inducen la activación de macrófagos, tal como se mide mediante el aumento de la expresión de moléculas de clase II en sus superficies y/o el aumento de la secreción de productos intermedios de nitrógeno activos tales como nitratos, aumentando de ese modo la capacidad del sistema inmunitario para destruir patógenos invasores y para potenciar la respuesta inmunitaria a los mismos.

30 Por consiguiente, en un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un polipéptido de citocina de la invención en la fabricación de un medicamento para el mantenimiento, la estimulación o la potenciación de una respuesta inmunitaria en un animal aviar. La respuesta inmunitaria puede provocar el tratamiento o la profilaxis de aves de corral, aves domésticas o aves de caza expuestas o infectadas con un organismo patógeno. El medicamento se administrará generalmente a dicho animal en una cantidad inmunomoduladora eficaz durante un tiempo y en condiciones suficientes para mantener, estimular o potenciar la capacidad de respuesta inmunitaria de dicho animal.

35 Preferiblemente, dicho polipéptido de citocina es una molécula recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad inmunomoduladora eficaz" es una cantidad de citocina suficiente para efectuar inmunomodulación en un animal diana, es decir, para potenciar la capacidad del sistema inmunitario para desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz o para potenciar la inmunocompetencia del animal o inmunogenicidad de un antígeno administrado al mismo.

40 Según la realización anterior, se prefiere particularmente que dicha citocina aviar sea una molécula de interferón tipo II, en particular IFN- γ .

En la realización más particularmente preferida, dicha citocina aviar es ChIFN- γ , tal como la molécula de polipéptido de ChIFN- γ expuesta en SEQ ID NO:2.

45 La expresión "ave de corral, ave doméstica o ave de caza" tal como se usa en el presente documento se extiende a pollos, pavos, gallinas de Bantam, codornices, gallina de Guinea, patos, gansos, avestruces, emús, palomas, canarios, periquitos, loros y pinzones, entre otros, siempre que las citocinas aviares sean eficaces en esos animales. Aves de corral, aves domésticas o aves de caza particularmente preferidas son pollos y especies relacionadas.

50 La presente invención es de uso particular en el tratamiento o profilaxis de aves de corral, aves domésticas o aves de caza frente a la infección por patógenos seleccionados de la lista que comprende virus de la bursitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar, virus de la bronquitis infecciosa,

virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia del pollo, virus de la gripe aviar, *E. coli*, *Salmonella ssp.*, *Eimeria ssp.* o *Mycoplasma ssp.* entre otros.

5 La citocina aviar de la presente invención puede administrarse durante todo el ciclo de vida de un ave para la que se indica el tratamiento o la profilaxis. El estadio de desarrollo del ave durante el que el tratamiento o la profilaxis es más eficaz variará dependiendo de la naturaleza del patógeno frente al que se busca protección, incluyendo su modo de transmisión y periodo de más alta infectividad. Por "periodo de más alta infectividad" quiere decirse el estadio de desarrollo del huésped durante el que es más vulnerable al ataque por un patógeno particular y/o durante el que existe una mayor probabilidad de provocar pérdidas de ganado o reducción de productividad como resultado de la infección con el patógeno. Los parámetros que afectan a los estadios de desarrollo óptimos de animales para la administración de citocinas objeto los conocen los expertos en la técnica.

Por consiguiente, el tratamiento o la profilaxis de la presente invención se extiende a la administración de la citocina aviar objeto en cualquier estadio de desarrollo en el ciclo de vida del ave de corral, ave doméstica o ave de caza para la que se indica el tratamiento o la profilaxis.

15 La citocina de la invención puede administrarse mediante cualquier medio incluyendo por ejemplo mediante inyección o bien *in ovo* o bien tras la eclosión, mediante inyección tal como intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, subcutánea u otros medios de inyección, mediante ingestión como un producto alimenticio medicamentoso o producto alimenticio terapéutico o introduciendo en dicha ave una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para dicha citocina o, alternativamente, un vector que comprende un constructo genético que puede expresar dicha citocina *in vivo* o *in ovo*, por ejemplo un vector bacteriano recombinante vivo.

20 Cuando la citocina de la invención se administra mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para dicha citocina, tal como una molécula de ADN o ARN, o un vector que comprende un constructo genético que puede expresar dicha citocina, la molécula de ácido nucleico o constructo genético debe transcribirse y traducirse para producir la molécula de citocina biológicamente activa tras su administración a un sujeto aviar apropiado.

25 En una realización alternativa, la presente invención proporciona el uso del constructo genético de la invención en la fabricación de un medicamento para el mantenimiento, la estimulación o la potenciación de una respuesta inmunitaria en un animal aviar. Preferiblemente, dicha primera citocina aviar es una molécula de IFN- γ , en particular ChIFN- γ . Según esta realización de la invención, la primera y segunda citocinas aviares interactúan con el sistema inmunitario de un animal para estimular o potenciar adicionalmente la capacidad de respuesta inmunitaria del sistema inmunitario frente al ataque de patógenos.

Otra aplicación importante de las citocinas de la presente invención es como adyuvantes naturales para vacunas, particularmente para vacunas de péptidos sintéticos o de subunidades producidas mediante tecnología de ADN recombinante.

35 El término "adyuvante" tal como se usa en el presente documento significa una sustancia que, cuando se administra a un animal en combinación con una segunda sustancia o antígeno, potencia la producción de moléculas inmunointeractivas, tales como anticuerpos, que reconocen la segunda sustancia o molécula de antígeno. Un adyuvante puede usarse terapéuticamente para producir anticuerpos frente a pequeñas cantidades de antígeno o para prolongar el período de producción de anticuerpos o para aumentar la cantidad de anticuerpo producido. Sin restringirse a ninguna teoría o modo de acción, los adyuvantes funcionan induciendo una afluencia local de células que forman anticuerpos al sitio de administración.

40 Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención proporciona un adyuvante que comprende una molécula de citocina aviar, en el que dicha citocina es un interferón tipo II o una molécula de fusión entre dicha molécula de interferón tipo II y una segunda molécula de citocina y opcionalmente, un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, dicha molécula de interferón tipo II aviar es IFN- γ , en particular ChIFN- γ . En una realización lo más particularmente preferida, dicha molécula de ChIFN- γ comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2 o al menos idéntica en un 40% a la misma.

50 Cuando dicha citocina aviar es una molécula de fusión, dicha segunda citocina puede ser cualquier molécula de citocina que sea funcional en especies aviares, en particular IFN- α , IFN- β , ChIFN- α , ChIFN- γ o una molécula de interferón tipo II o cualquier otra citocina o molécula similar a la citocina.

- 5 Según la presente invención, una citocina aviar tal como un interferón tipo II en particular ChIFN- γ , se usa en vacunas para potenciar la inmunogenicidad de antígenos, particularmente en vacunas de subunidad, conduciendo al título de anticuerpos aumentado en aves individuales, protección aumentada de aves que están inmunizadas contra un antígeno específico (es decir inmunidad de grupo potenciada) y/o persistencia aumentada de anticuerpos protectores en aves inmunizadas. Una ventaja adicional proporcionada por la presente invención es una reducción en la cantidad de antígeno específico requerido para inmunizar eficazmente a los animales, conduciendo de ese modo a costes de producción reducidos.
- 10 El polipéptido de citocina de la invención puede usarse para potenciar y/o estimular una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos en un animal, en un método que comprende administrar a dicho animal una cantidad eficaz para la respuesta inmunitaria de una citocina aviar.
- 15 En una realización relacionada, se ha contemplado una composición de vacuna para el tratamiento profiláctico de una especie aviar que comprende un antígeno y una citocina aviar recombinante tal como se describe en el presente documento. La vacuna puede comprender también uno o más diluyentes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Se requiere también que los diluyentes y/o vehículos sean aceptables para el uso veterinario.
- 20 Según esta realización de la invención, dicho tratamiento profiláctico está pensado para vacunar a dicha ave frente a un patógeno bacteriano o viral seleccionado de la lista que comprende virus de la bursitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la laringotraqueítis infecciosa aviar, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia de pollo, virus de la gripe aviar, *E. coli*, *Salmonella ssp.* o *Eimeria ssp.*, entre otros.
- 25 Según las realizaciones anteriores, se prefiere particularmente que dicha citocina aviar sea una molécula de interferón tipo II, en particular IFN- γ o un polipéptido de fusión entre la molécula de interferón tipo II aviar y una segunda citocina. En una realización lo más particularmente preferida, dicha citocina aviar es ChIFN- γ , tal como la molécula de polipéptido de ChIFN- γ expuesta en SEQ ID NO:2.
- 30 La citocina o vacuna de la invención descrita según estas realizaciones puede administrarse mediante cualquier medio incluyendo por ejemplo, mediante inyección o bien *in ovo* o tras la eclosión mediante inyección tal como intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intraocular, intravenosa, subcutánea u otro medio de inyección, mediante ingestión como un producto alimenticio medicamentoso o producto alimenticio terapéutico.
- 35 Los avances en la tecnología de liberación lenta y el desarrollo de virus y bacterias no patógenas vivas como vectores de administración para estas moléculas asegurarán su rentabilidad cuando se administra a aves de corral, aves domésticas o aves de caza. También pueden usarse en vacunación de ácido nucleico. Por consiguiente, la citocina aviar o vacuna de la presente invención también puede administrarse mediante medios genéticos. Por ejemplo, puede codificarse ChIFN- γ aviar recombinante por un constructo genético presente en un sistema de administración tal como un virus, levadura, bacteria, protozoo, célula de insecto, aviar o de mamífero. La expresión de tal sistema de administración en un animal diana permitirá la administración de la citocina aviar recombinante.
- 40 Según esta realización, se contempla un constructo genético que comprende:
- (i) una primera secuencia de nucleótidos que codifica para un interferón tipo II aviar o una molécula de fusión de citocina entre dicho interferón tipo II y una segunda citocina, colocada operativamente bajo el control de una primera secuencia de promotor;
- (ii) una segunda secuencia de nucleótidos que define un antígeno contra el cual se requiere inmunización, colocada operativamente bajo el control de una segunda secuencia de promotor; y
- (iii) un vehículo de administración que comprende secuencias genéticas que facilitan la replicación de dicho constructo genético en una célula de administración tal como una célula bacteriana, de levadura, de insecto, de animal protozoario o de mamífero.
- 45 Preferiblemente, dicho interferón tipo II es IFN- γ , en particular ChIFN- γ . También se prefiere que dicha segunda citocina se seleccione de la lista que comprende interferones tipo I tales como IFN- α , IFN- β , ChIFN- α , ChIFN- β o, alternativamente, un interferón tipo II o cualquier otra citocina.
- 50 Según esta realización, la célula de administración no será en su uso normal dañina o patogénica para el animal diana. De manera conveniente, se emplean células de administración atenuadas. Vectores de administración particularmente útiles son los vectores bacterianos y virales recombinantes y virus atenuados.
- Por ejemplo, se usa un vector viral atenuado como una vacuna viva. La secuencia genética que codifica para una

citocina aviar tal como ChIFN- γ o un derivado del mismo se clona en la secuencia viral y se usa el virus recombinante para infectar animales diana. El virus recombinante provoca infección y se replica en las células del animal dando como resultado la producción de la citocina recombinante. El virus recombinante infeccioso puede eliminarse posteriormente tras la producción de una cantidad inmunomodulante eficaz de la citocina recombinante. Un protocolo similar se adapta con portadores bacterianos vivos. Alternativamente, puede usarse un vector viral no infeccioso, no replicativo. Un vector viral no replicativo proporciona un medio de introducir una secuencia genética que puede transitoriamente expresar la citocina deseada debido a que el vector viral no replicativo no puede realizar la transmisión de célula a célula.

La presente invención proporciona una oportunidad para potenciar una respuesta inmunitaria en animales y en particular aves de corral, aves domésticas o aves de caza (tal como aquéllas descritas anteriormente) mediante la administración de una citocina aviar, en particular un interferón tipo II tal como ChIFN- γ o un derivado del mismo, o bien directamente o bien mediante la expresión de secuencias genéticas recombinantes. Esto es de particular importancia debido a que la mayoría de vacunas de péptidos sintéticos y de subunidades sólo son débilmente antigénicas. La administración de las citocinas puede ser sola, en combinación con un antígeno o como una molécula de fusión. La administración puede ser mediante un virus atenuado, vector bacteriano o vector viral recombinante o puede ser mediante administración de la citocina mediante, por ejemplo, inyección o ingestión oral (por ejemplo en un producto alimenticio medicado).

La presente invención se extiende a una composición farmacéutica veterinaria para su uso en aves de corral, aves domésticas o aves de caza tal como para potenciar el sistema inmunitario o acelerar su maduración o mejorar su inmunocompetencia o para facilitar la inmunomodulación en dichas aves, comprendiendo dicha composición un interferón tipo II aviar recombinante o una molécula de fusión entre un interferón tipo II y una segunda citocina fusionada a un antígeno o secuencias genéticas que codifican para el mismo y uno o más diluyentes y/o portadores aceptables para uso veterinario.

Preferiblemente, cuando la composición comprende una citocina aviar recombinante tal como se definió anteriormente en el presente documento, la composición se inyecta *in ovo* o tras la eclosión, o se administra mediante aerosol o ingestión. Cuando la composición comprende material genético, se administra como parte de un vector viral, un vector bacteriano o como una molécula de ácido nucleico.

Las condiciones en aves de corral, aves domésticas o aves de caza para las que podría requerirse tratamiento incluyen enfermedades infecciosas inducidas por cualquier agente bacteriano o viral tales como las comentadas anteriormente, cáncer, inmunosupresión, alergia y para potenciar o suprimir sistemas reproductivos. Las condiciones incluirán situaciones en las que los animales están en un estado inmunocomprometido tal como durante o tras estrés, debido a proceso de transporte y sobrepoblación, cambios en el clima.

El ave que va a tratarse y la citocina en la composición pueden ser "homólogos" en el sentido de que ambos son de la misma especie, o pueden ser "heterólogos" cuando la citocina aviar es eficaz en otra especie de ave que no sea de la que se ha derivado. Las composiciones también pueden contener otras moléculas activas tales como moléculas de antibióticos o antígeno. Las combinaciones de moléculas de citocina con moléculas de antígeno pueden aumentar la eficacia de las vacunas.

Por tanto, la presente invención se extiende a una composición farmacéutica veterinaria que comprende una cantidad inmunomodulante eficaz de un interferón tipo II aviar o una molécula de fusión entre un interferón tipo II aviar y una segunda citocina o secuencias genéticas que pueden expresar la misma y uno o más diluyentes y/o portadores aceptables para uso veterinario.

En una realización preferida, dicho interferón tipo II es IFN- γ , en particular ChIFN- γ . Cuando dicha composición farmacéutica comprende una molécula de fusión, dicha fusión es preferiblemente una fusión entre ChIFN- γ y una segunda citocina seleccionada de la lista que comprende interferones tipo I tales como IFN- α , IFN- β , ChIFN- α , ChIFN- β o un interferón tipo II o cualquier otra citocina.

Se contempla que el/los principio(s) activo(s) de la composición farmacéutica exhibe(n) excelente actividad en estimular, potenciar o facilitar de otra manera una respuesta inmunitaria en una especie animal y en particular un ave de corral, ave doméstica o ave de caza cuando se administra en una cantidad que depende del caso particular. La variación depende, por ejemplo, de la citocina y, en algunos casos, el antígeno involucrado en estimular la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, pueden requerirse desde aproximadamente 0,5 μg hasta aproximadamente 20 mg de una citocina particular que puede combinarse con otras citocinas, por kilogramo de peso corporal por día. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas en uno o más de manera diaria, semanal o mensual o en otros intervalos de tiempo adecuados o la dosis puede reducirse de manera proporcional según se indique por las exigencias de la situación. El principio activo puede administrarse mediante inyección o bien *in ovo* o bien tras la eclosión o mediante

ingestión oral de cualquier manera conveniente o puede administrarse mediante una secuencia genética tal como en un vector bacteriano o viral.

Los principios activos también pueden administrarse en dispersiones preparadas en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y/o mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen dispersiones o disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) y polvos estériles y para la preparación extemporánea de dispersión o disoluciones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede provocarse la prevención de la acción de los microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, antibióticos, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los principios activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los diversos otros componentes indicados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan las dispersiones incorporando el/los diverso(s) principio(s) activo(s) esterilizado(s) en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación denominados son técnicas de liofilización y secado a vacío que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de la disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Los diluyentes y/o portadores adecuados para su uso veterinario incluyen cualquier disolvente, medios de dispersión, disoluciones acuosas, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, compuestos isotónicos y agentes retardantes de absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para principios farmacéuticamente activos se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso de los mismos en la composición. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones. Esto último se contempla particularmente en la medida en que la presente invención se extiende a moléculas de citocinas de múltiples componentes o vacunas multivalentes.

Las composiciones veterinarias farmacéuticas de la presente invención pueden comprender además de un interferón tipo II aviar o una molécula de fusión que comprende el mismo, uno o más de otros principios activos tales como antígenos y/o compuestos inmunoestimulantes.

La citocina también puede administrarse mediante un sistema de administración vivo tal como usando un sistema de expresión bacteriano para expresar la proteína de la citocina en las bacterias que pueden incorporarse en flora intestinal. Alternativamente, puede emplearse o incorporarse un sistema de expresión viral en una vacuna recombinante. En este sentido, una forma de expresión viral es la administración de un vector vivo generalmente mediante pulverización, alimento o agua en el que se proporciona una cantidad eficaz infectiva del vector vivo (por ejemplo virus o bacteria) al animal. Otra forma de sistema de expresión viral es un vector de virus no replicativo que puede infectar una célula pero no replicarse en la misma. El vector viral no replicativo proporciona un medio para introducir material genético para su expresión transitoria en una citocina. El modo de administración de tal vector es igual al del vector viral vivo.

La molécula de citocina de la presente invención, en particular ChIFN- γ , también es útil como un agente promotor del crecimiento o potenciador del crecimiento y/o agente promotor de la maduración cuando se administra a una especie aviar tal como una especie de ave de corral, ave doméstica o ave de caza. La presente invención es particularmente útil como un potenciador de rendimiento de crecimiento y, como los inventores han demostrado en los ejemplos descritos en el presente documento, la administración de ChIFN- γ a aves inmaduras conduce a aumentos significativos de peso, además de la prevención de pérdida de peso habitualmente asociada con diversos estados patológicos.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención proporciona uso del constructo genético de la invención en la fabricación de una sustancia que puede estimular el rendimiento de crecimiento de un animal aviar.

Potenciar el rendimiento de crecimiento significa aumentar el peso de una especie aviar o prevenir las pérdidas de peso en la misma normalmente detectables durante o tras una infección patogénica de una especie aviar.

- 5 Preferiblemente, dicha molécula de interferón tipo II es IFN- γ . En una realización preferida particular, dicha molécula de IFN- γ es la molécula de ChIFN- γ expuesta en SEQ ID NO: 2.

Las especies aviares pueden ser aves sanas o enfermas seleccionadas de la lista que comprende pollos, pavos, gallinas de Bantam, codornices, gallinas de Guinea, patos, gansos, avestruces, emús, palomas, canarios, periquitos, loros y pinzones, entre otros.

- 10 Métodos para la administración de la citocina de la invención para el propósito de promover el crecimiento o potenciar el crecimiento de una especie aviar son similares a los métodos comentados anteriormente para la administración de una vacuna, adyuvante o composición farmacéutica veterinaria.

- 15 El interferón tipo II aviar recombinante de la presente invención, en particular ChIFN- γ , también es útil en la producción de moléculas interactivas inmunológicas tales como anticuerpos o derivados funcionales de los mismos incluyendo Fabs o SCABS (anticuerpos de cadena sencilla), anticuerpos conjugados a un marcador fluorescente, radioactivo o enzima, siendo el único requisito que dichas moléculas inmunológicamente interactivas puedan unirse a un interferón tipo II aviar descrito en el presente documento.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención proporciona un anticuerpo que puede unirse a un interferón tipo II aviar o a la citocina aviar recombinante de la invención.

- 20 Preferiblemente, dicho interferón tipo II aviar es IFN- γ .

Más preferiblemente, dicho interferón tipo II aviar es ChIFN- γ .

- 25 En una realización incluso más preferida, dicho anticuerpo se une a un interferón tipo II que comprende al menos 10 residuos de aminoácido, preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácido y más preferiblemente al menos 50 residuos de aminoácido contenidos dentro de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2 o que tiene al menos el 40% de similitud con la misma.

La molécula de anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede usarse para desarrollar ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas para el diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas de aves de corral, aves domésticas o aves de caza.

- 30 Según esta realización, el anticuerpo puede estar en la forma de una preparación de anticuerpo que comprende anticuerpos o derivados de los mismos, inmunointeractiva o bien con un interferón tipo II aviar o bien con una molécula de fusión entre un interferón tipo II aviar y una segunda citocina.

En una realización preferida, dicho interferón tipo II es IFN- γ , en particular ChIFN- γ . Dicha segunda citocina puede ser una molécula de interferón tipo I seleccionada de la lista que comprende IFN- α , IFN- β , ChIFN- α , ChIFN- β o, alternativamente, un interferón tipo II distinto de ChIFN- α .

- 35 Los inmunoensayos son útiles en detectar la presencia de una citocina en un animal diana, particularmente aves, en particular para detectar una respuesta inmunitaria en la que se altera el nivel de dicha citocina aviar, por ejemplo tras una infección con un patógeno. Como consecuencia, tal inmunoensayo es de uso particular en determinar si un ave se ha expuesto a un patógeno o está actualmente infectada con un patógeno o tiene una infección patogénica de grado bajo prolongada. Los inmunoensayos también son útiles para la cuantificación de citocinas, en particular para
40 la selección de acervos genéticos para líneas que expresan altamente citocina-5 con resistencia a enfermedades mejorada de un patógeno. La invención descrita en el presente documento se extiende a todos los usos de este tipo de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requiere dichos inmunoensayos para su funcionamiento.

- 45 Una amplia gama de técnicas de inmunoensayos pueden ser tales como aquéllas descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estos métodos pueden emplearse para detectar un interferón tipo II relacionado con ChIFN- γ . Sólo a modo de ejemplo, se inmoviliza un anticuerpo producido contra ChIFN- γ sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y se pone una muestra biológica de un animal que va a someterse a prueba para detectar la presencia de citocina llevada en contacto con la molécula unida. Tras un

periodo de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario anticuerpo-citocina, se añade entonces un segundo anticuerpo de ChIFN- γ marcado con una molécula indicadora que puede producir una señal detectable y se incuba, permitiendo tiempo suficiente para la formación de un complejo terciario de anticuerpo-citocina-anticuerpo marcado. Se elimina cualquier material no reaccionado mediante lavado, y se determina la presencia del compuesto terciario mediante observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser o bien cualitativos, mediante simple observación de la señal visible o bien pueden cuantificarse mediante comparación con una muestra control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que se añaden simultáneamente tanto muestra como anticuerpo marcado al anticuerpo unido, o un ensayo reverso en el que en primer lugar se combinan el anticuerpo marcado y muestra que va a someterse a prueba, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas se conocen bien por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones menores será fácilmente aparente. Los anticuerpos usados anteriormente pueden ser monoclonales o policlonales.

El sustrato sólido es normalmente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente usados celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en la forma de tubos, perlas, discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para conducir un inmunoensayo. Los procesos de unión se conocen bien en la técnica y generalmente consisten en reticular, unir de manera covalente o adsorber físicamente la molécula al portador insoluble.

Por "molécula indicadora", tal como se usa en la presente memoria, se entiende una molécula que, por su naturaleza química, produce una señal identificable analíticamente que permite la detección de anticuerpo unido a antígeno. La detección puede ser o bien cualitativa o cuantitativa. La molécula indicadora más comúnmente usada en este tipo de ensayo son enzimas, fluoróforos o moléculas que contienen radionúclidos (es decir radioisótopos). En el caso de un inmunoensayo ligado a enzimas, se conjuga una enzima al segundo anticuerpo, generalmente mediante glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, tal como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de diferentes técnicas de conjugación que están disponibles fácilmente para el experto en la técnica. Enzimas comúnmente usadas incluyen peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, β -galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otros. Los sustratos que van a usarse con la enzimas específicas se escogen generalmente para la producción, tras la hidrólisis mediante la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que proporcionan un producto fluorescente.

Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activan mediante iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por emisión de la luz en un color característico detectable visualmente con un microscopio luminoso. Como en el EIA, se permite al anticuerpo marcado con fluorescente unirse al primer complejo anticuerpo-hapteno. Después de eliminar mediante lavado el reactivo no unido, el complejo restante se expone entonces a la luz de la longitud de onda apropiada, la fluorescencia observada indica la presencia del hapteno de interés. Las técnicas de EIA e inmunofluorescencia están ambas bien establecidas en la técnica y se prefieren particularmente para el presente método. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras, tales como moléculas de radioisótopos, quimioluminiscentes o bioluminiscentes. Será fácilmente evidente para el experto cómo variar el procedimiento para adecuarse al propósito requerido.

La molécula inmunológicamente interactiva también es útil en la purificación de la citocina aviar recombinante de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen bien métodos para la purificación por afinidad de proteínas usando anticuerpos.

La presente invención se describe adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitativos.

En las figuras:

La figura 1 es una representación gráfica que muestra la sensibilidad de IFN de pollo a tratamiento de pH bajo y calor. Se usó sobrenadante de CEF cultivados durante 24 h con virus de Semliki Forest como una fuente de IFN- β . Se cultivaron poblaciones de células de bazo enteras (células de bazo no separadas), no adherentes (células de bazo libres de células adherentes a plástico) y adherentes (células de bazo libres de células no adherentes), durante 24 h con concanavalina A (ConA). Se calentaron los sobrenadantes hasta 60°C durante 1 h, se expusieron a pH 2 durante 8 h o se mantuvieron a 4°C (control) y luego se sometieron a ensayo para determinar la actividad del IFN usando el ensayo de CEF tal como se describe.

La figura 2 es una representación gráfica que muestra sensibilidad de actividad del IFN al calor. Se calentaron sobrenadantes de células de bazo activadas por ConA durante hasta 1 h tal como se indica y luego se sometió a prueba para determinar actividad en el ensayo CEF.

La figura 3 es una representación gráfica que muestra la capacidad de los sobrenadantes de la línea de células T CC8.1 (número de registro de AGAL N94/46035) de proteger a los CEF de la lisis mediada por el virus y su capacidad para inducir a las células HD11 para secretar nitrito.

5 La figura 4 es una representación gráfica que muestra la sensibilidad de la actividad de ChIFN- γ al calor. Se calentaron sobrenadantes de las células de bazo activadas por ConA (CS) y CC8.1h (número de registro de AGAL N94/46035) hasta 60°C durante diversos periodos de tiempo. Se midió la actividad residual del IFN (resistente al calor) usando el ensayo CEF.

10 La figura 5 es una representación gráfica que muestra la sensibilidad de la actividad de ChIFN- γ al calor, pH 2,0 y 2-mercaptoetanol (2-ME). Se calentaron sobrenadantes de CC8.1h (número de registro de AGAL N94/46035) hasta 60°C durante 1 h, se expusieron a pH 2,0 durante 8 h o se expusieron al 0,5% de 2-ME o las combinaciones de estas condiciones indicadas. Se midió la actividad residual usando el ensayo CEF.

15 La figura 6 es una representación gráfica que muestra la inducción de secreción de nitrito por macrófagos HD11 inducida por las células T que expresan ChIFN- γ . Se midieron sobrenadantes de CEF inducidos por SFV o CC8.1h (número de registro de AGAL 94/46035) inactivados por el calor o nativos para determinar su capacidad para inducir la secreción de nitrito.

La figura 7 es una representación gráfica que muestra la sensibilidad al calor de la actividad inductora de nitrito (ChIFN- γ). Se calentaron sobrenadantes de células de bazo activadas con ConA y CC8.1h (número de registro de AGAL N94/46035) hasta 60°C y se midió la actividad residual de ChIFN- γ usando el ensayo de nitrito tal como se describe en los ejemplos.

20 La figura 8 proporciona representaciones gráficas que muestran la actividad biológica de sobrenadantes de células COS transfectadas. Se transfectaron las células COS con conjuntos de aproximadamente 100 clones de la biblioteca de expresión de ADNc de CC8.1h. Se midió ChIFN- γ en el ensayo CEF (figura 8A) o el ensayo de nitrito (figura 8B) tal como se describe en los ejemplos.

25 Se calentó el sobrenadante de células COS que expresan el gen de ChIFN- γ a 60°C durante 30 min. (148 calentamiento) o no se calentaron (148). Se usó el sobrenadante de CC8.1h como un control positivo y se usó el sobrenadante de células COS transfectadas con un conjunto que carece del gen de ChIFN- γ (58) como un control negativo.

30 La figura 9 es una representación gráfica que muestra la actividad biológica de sobrenadantes de células COS transfectadas con clones únicos de la biblioteca de CC8.1h. Se subcombinaron secuencialmente conjuntos de plásmidos que contienen 100 clones en conjuntos de 10 y luego en clones únicos. Se transfectaron los clones 148.1.7 y 148.1.9 en células COS y se midió la actividad de ChIFN- γ en el sobrenadante 3 días después. Se muestra el efecto de calentar el ChIFN- γ recombinante hasta 60°C durante 30 min.

35 La figura 10 es una representación gráfica que muestra producción de ChIFN- γ recombinante. Se transfectaron células COS con #148 (conjunto de 100 clones), #148.1 (un conjunto de 10 clones derivados de 148) y #148.1.9 (un clon único derivado de 148.1). Se usa el sobrenadante de CC8.1h (número de registro de AGAL N94/46035) como un control positivo. Se muestra el efecto de calentar los sobrenadantes hasta 60°C durante 30 min.

La figura 11 es una representación gráfica que muestra la sensibilidad al calor de ChIFN- γ . Se calentó el sobrenadante de CC8.1h (número de registro de AGAL N94/46035) o clon 148.1.9 hasta 60°C durante diversos periodos de tiempo y se midió la actividad residual de ChIFN- γ en el ensayo de nitrito.

40 La figura 12 es una representación esquemática que muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de ChIFN- γ con la secuencia de aminoácidos 164 prevista del polipéptido de ChIFN- γ mostrado. Se subrayan dos sitios potenciales de glicosilación ligada a N. El sitio de escisión previsto para la proteína madura se indica por la flecha en HIS 1.

45 La figura 13 es una representación esquemática que muestra homología de secuencia de aminoácidos entre el polipéptido de ChIFN- γ (aviar) y diversas proteínas de IFN- γ de mamífero. Los aminoácidos conservados en todas las especies se resaltan con asteriscos y las sustituciones conservativas con puntos.

La figura 14 es una representación esquemática que muestra homología de secuencia de aminoácidos entre polipéptidos de IFN- γ humano y aviar.

La figura 15 es una representación esquemática que muestra una comparación de las secuencias de proteína de ChIFN- α (Sekellick *et al.*, 1994) y ChIFN- γ .

La figura 16 es una representación gráfica que muestra la actividad biológica entre especies de ChIFN- γ , IFN- α bovino e IFN γ bovino. SE sometieron a ensayo IFN bovinos y de pollo recombinantes para determinar su capacidad para proteger a los fibroblastos bovinos y de pollo de la lisis mediada por el virus.

5 La figura 17 proporciona representaciones gráficas de perfiles FACS que muestran la expresión de antígeno de clase II mediante células HD11. Se cultivaron las células en medios solo (figura 17A), LPS (figura 17B), ChIFN- γ nativo (sobrenadante de CC8.1h; figura 17C) y ChIFN- γ recombinante (figura 17D) y luego se midió la expresión en la superficie celular de moléculas de clase II.

10 La figura 18 proporciona representaciones esquemáticas de geles de poliacrilamida que muestran la expresión de ChIFN- γ recombinante en *E. coli* y su posterior purificación. En la figura 18A: S, convencional; Mr, marcadores; carril 1, sobrenadante de sonicación en bruto; carril 2, fracción soluble; carril 3, flujo de columna de Ni; carril 4 y 5, lavados de columna; carril 6, ChIFN- γ recombinante eluido. En la figura 18B: S, convencional; Mr, marcadores; carriles 1-4, ChIFN- γ recombinante purificado diluido en serie 2 veces (carril 1), 4 veces (carril 2), 8 veces (carril 3) o 16 veces (carril 4).

15 La figura 19 proporciona representaciones gráficas que muestran actividad biológica de ChIFN- γ recombinante en células de pollo (CEF) y de pavo (TEF). En la figura 19A se muestra la capacidad de ChIFN- γ recombinante purificado (ED: dializado para retirar el imidazol; E: no dializado), para inducir secreción de nitrito por macrófagos de pollo HD11. En la figura 19B; se muestra la capacidad de ChIFN- γ recombinante purificado (ED: dializado; E: no dializado) y medios condicionados de célula de bazo de pollo (CM) para proteger los CEF de la lisis mediada por el virus. En la figura 19C, se muestra la capacidad de ChIFN- γ recombinante purificado (ED: dializado; E: no dializado) y ChIFN- α recombinante para proteger a los TEF de la lisis mediada por el virus.

La figura 20 es una representación gráfica que muestra la estabilidad del ChIFN- γ recombinante después del almacenamiento a temperatura ambiente [6,2D (TA)] o a 4°C (6,2D) según se mide usando el ensayo de nitrito.

25 La figura 21 es una representación esquemática de una inmunotransferencia tipo Western que muestra la unión de sueros de conejo anti-ChIFN- γ a ChIFN- γ recombinante. Se sometió a electroforesis el ChIFN- γ recombinante en un gel de acrilamida, se transfirió a nitrocelulosa que entonces se cortó en bandas. Se incubaron las bandas individuales en sueros; (76 P/B, suero de conejo normal; ITA, suero producido contra un antígeno irrelevante; 76-79 sueros de 4 conejos inmunizados con ChIFN- γ recombinante).

30 La figura 22 proporciona representaciones gráficas que muestran la capacidad de los antisueros de conejo anti-ChIFN- γ recombinante para bloquear la función de ChIFN- γ tanto recombinante (r) como nativo (n) según se mide o bien usando el ensayo de nitrito (figuras 22A, 22B) o bien usando el ensayo de CEF (figura 22C).

La figura 23 proporciona representaciones gráficas que muestran la capacidad de antisueros de ratón anti-ChIFN- γ recombinante (figura 23A) e IgG de conejo purificada anti-ChIFN- γ recombinante (figura 23B) para bloquear la función del ChIFN- γ nativo en el ensayo de nitrito.

35 La figura 24 proporciona representaciones gráficas que muestran la capacidad de ChIFN- γ y ChIFN- α para crear sinergia. En la figura 24A, se determina la actividad del IFN usando el ensayo de CEF. En las figuras 24B y 24C, se mide la actividad de IFN usando el ensayo de nitrito. Se diluyó en serie ChIFN- γ recombinante en presencia de cantidades limitantes de ChIFN- α recombinante o ChIFN- β natural.

40 La figura 25 es una representación gráfica que muestra el efecto del tratamiento con ChIFN- γ recombinante *in vivo* sobre la respuesta de anticuerpos frente a SRBC. Se inyectaron en grupos de aves 200 μ l (grupos 1 y 2) o 20 μ l (grupos 3 y 4) de SRBC y se reinmunizaron tras 3 semanas. Se trataron los grupos 1 y 3 con ChIFN- γ recombinante (en el día anterior, en el día, y en el día después de la inmunización primaria) y no se trataron los grupos 2 y 4. Se determinaron los títulos HA para Ig total y para IgG (títulos de Ig resistente a 2-mercaptoetanol) semanalmente durante 6 semanas. A, títulos HA de Ig total 3 semanas después de la inmunización primaria; B, títulos HA de Ig total 3 semanas después de la inmunización secundaria; C, títulos HA de Ig total (existen diferencias significativas entre el grupo 1 y 2 y entre el grupo 3 y 4: *p<0,02, **p<0,05, ***p<0,005, ****p<0,002); D, título HA de IgG.

La figura 26 es una representación gráfica que muestra el efecto del tratamiento con ChIFN- γ recombinante *in vivo* sobre la ganancia de peso. Se inyectaron a las aves ChIFN- γ recombinante o diluyente y se monitorizó su peso corporal.

50 La figura 27 proporciona representaciones gráficas que muestran el efecto del tratamiento con ChIFN- γ recombinante *in vivo* sobre la ganancia de peso. Se inyectaron a las aves ChIFN- γ recombinante o diluyente y se determinó su peso corporal en los días 6 (figura 27A) y 12 (figura 27B). Se muestra la ganancia de peso entre los

días 6 y 7 en la figura 27C y entre los días 7 y 10 se muestra en la figura 27D.

5 La figura 28 proporciona representaciones gráficas que muestran el efecto del tratamiento con ChIFN- γ recombinante *in vivo* sobre la ganancia de peso durante la infección con *E. acervulina*. Se inyectaron a las aves ChIFN- γ recombinante o diluyente, se les infectó con ovocitos de *E. acervulina* y se determinó su peso corporal en los días 8 (figura 28A) y 11 (figura 28B). Se muestran los cambios en el peso entre los días 4 y 5 en la figura 28C y entre los días 6 y 8 se muestran en la figura 28D.

La figura 29 es una representación gráfica que muestra el efecto del tratamiento con ChIFN- γ recombinante *in vivo* sobre la ganancia de peso en aves no infectadas y aquéllas infectadas con coccidiosis.

10 La figura 30 es una representación gráfica que muestra el efecto del tratamiento con ChIFN- γ recombinante *in vivo* sobre la razón de bursa con respecto al peso corporal 7 días después de la infección con IBDV.

15 La figura 31 es una representación gráfica que muestra el efecto del tratamiento con ChIFN- γ recombinante *in vitro* sobre la capacidad para proteger a los CEF de la infección con IBDV. Se prepararon CEF tal como se describe para el ensayo de interferón de CEF. Se añadieron ChIFN- γ recombinante e IBDV a los cultivos juntos. Se midió la supervivencia celular 3 días después en una escala de 0 a 4, en la que 0 representa el nivel de supervivencia celular observado en presencia de IBDV y ausencia de IFN (<5% supervivencia celular) y 4 representa el nivel de supervivencia celular observado en la ausencia de IBDV (> 90 % supervivencia celular).

EJEMPLO 1

Pollos

20 Se criaron pollos Hybrid White Leghorn (HWL) libres de patógenos específicos (SPF) producidos por la unidad de aves de corral CSIRO SPF (Maribyrnong, Victoria) en jaulas de plástico flexibles aislantes y se alimentaron con piensos fumigados y agua acidificada.

EJEMPLO 2

Cultivos celulares

25 Se retiraron los bazos de manera aséptica de los pollos y se centrifugaron suspensiones de células individuales durante 5 min. a 200 g. Se lavaron las células dos veces en solución salina equilibrada de Hank (Flow Laboratories) y se resuspendieron en medio de crecimiento que consiste en medio DME (Flow) que contiene penicilina, estreptomycin, glutamina 2 mM y se tamponaron (pH 7,2) con HEPES y bicarbonato de sodio. Se incubaron las células a 41°C en CO₂ al 5% en aire. Se preparó medio condicionado cultivando células de bazo (1×10^7 /ml) en condiciones libres de suero en presencia de concanavalina A (ConA, 5 ug/ml, Sigma). Se recogieron los sobrenadantes tras 24 h, se centrifugaron para eliminar los residuos de células y se almacenaron a 4°C. Se
30 obtuvieron células de bazo adherentes incubando poblaciones de células de bazo completas en placas Petri de plástico en medios de crecimiento a 41°C. Tras 4-8 h, se retiraron las células no adherentes y se lavaron las placas una vez.

EJEMPLO 3

35 Generación de líneas de células T

Se generaron líneas de células T transformadas con REV a partir de bazo tal como se indicó anteriormente (Lowenthal *et al.* 1995a, 1995b). Se cultivaron las células en medio de Hahns que contiene un 1% de suero de pollo y un 5% de FBS durante varios días y sus sobrenadantes se sometieron a ensayo para determinar la actividad del interferón. Se tiñeron las líneas celulares en crecimiento activo con anticuerpos monoclonales anti-células T (Acm) CD3, CD4, CD8 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se obtuvieron los clones de células cultivando células
40 individuales en pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos. Se sometieron a prueba los clones en crecimiento activo para determinar la producción de IFN y se tiñeron con Acm frente a células T y se analizaron tal como se mencionó anteriormente. Las células de bazo activadas con ConA no transformadas no crecieron durante más de 7 días y no pudieron clonarse a partir de células individuales.

45 EJEMPLO 4

Ensayo de interferón en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)

Se midió el IFN mediante la capacidad de proteger CEF y fibroblastos embrionarios de pavo (TEF) de la lisis mediada por virus, tal como se describe por Prowse y Pallister (1989), Lowenthal *et al.* (1995a) y Lowenthal *et al.* (1995b). Se sembraron fibroblastos secundarios en placas de microtitulación de 96 pocillos (5×10^4 /pocillo) y se hicieron crecer en presencia de 10% de FBS a 41°C. Tras 24 h, se reemplazó el medio de cultivo con 100 μ l de medio de crecimiento libre de suero y se realizaron diluciones en serie dos veces de los sobrenadantes de prueba por duplicado. Los pocillos control contenían células cultivadas en medio solo o cultivadas en presencia de un sobrenadante de referencia de actividad de IFN conocida. Tras la incubación durante la noche a 37°C, se reemplazó el medio de cultivo con 100 μ l de medio que contenía el virus del bosque de Semliki o el virus de la estomatitis vesicular (10^3 dosis infectiva de cultivo tisular/ml) y se incubaron las células a 37°C. Tras 24 h, se midió la viabilidad celular mediante la captación de colorante rojo neutro y se cuantificó la absorbancia a 540 nm usando un lector de ELISA.

EJEMPLO 5

Tratamiento de IFN

Se calentaron los sobrenadantes a 60°C en tubos Eppendorf durante diversos periodos de tiempo y se colocaron en hielo inmediatamente. Se expusieron los sobrenadantes a tratamiento de pH bajo tal como sigue: se añadió una cantidad suficiente de HCl 2 M para alcanzar un pH de 2,0. Tras 8 h a 4°C, se ajustó el pH a pH 7,0 usando NaOH 5 M. Se midió la sensibilidad de IFN a agentes reductores añadiendo 2-mercaptoetanol (2-ME) al 0,5% (V/V) a los sobrenadantes. Entonces, se almacenaron todos los sobrenadantes a 4°C.

EJEMPLO 6

Ensayo de nitrito

Se cuantificó la producción de óxido nítrico por macrófagos de pollo HD11 (Beug *et al.*, 1979) mediante la acumulación de nitrito en el medio de cultivo (Sung *et al.*, 1991) y se usó como una medida de la actividad de IFN- γ . Se realizaron diluciones en serie dos veces de los sobrenadantes de prueba en pocillos por duplicado de placas de 96 pocillos en un volumen de 100 μ l de medio de crecimiento que contenía un 5% de FBS. Se añadieron células HD11 a cada pocillo (10^5 en 100 μ l) y se incubaron las placas a 37°C. Tras 24 h, se añadieron 50 μ l del sobrenadante de cultivo a 100 μ l de reactivo de Griess (mezcla 1:1 de sulfanilamida al 1% y naftil-etilendiamina al 0,1% en H₃PO₄ al 2,5%) y se leyó la absorbancia a 540 nm. Se determinó el nivel de nitrito usando nitrito de sodio como patrón.

EJEMPLO 7

Producción de biblioteca de ADNc y transfección de células COS

Se clonó de manera direccional ARN PoliA+ del clon de células T CC8.1h (número de registro de AGAL N94/46035) en el vector de expresión eucariota pcDNA1 (Clontech, Palo Alto, CA). Se transfectaron conjuntos de 100 clones en células COS mediante el método DEAE-dextrano tal como sigue: se mezcló 1 μ g de ADN con 10 μ l de DEAE-dextrano (10 mg/ml, Sigma) y se añadió a 1×10^6 células en 0,5 ml de medios que contenían un 1% de FBS. Se incubaron las células en tubos Eppendorf a 37°C. Tras 30 min., se añadieron 0,5 ml de DMSO al 25% (v/v) en DME y se mezcló. Tras 5 min., se lavaron las células en los medios y se resuspendieron en 5 ml de DME con un 2% de FBS y se cultivaron durante 3 días a 37°C. Se sometieron a prueba los sobrenadantes para determinar la actividad de IFN tal como se describe en el ejemplo 4 y el ejemplo 6. Se transformaron entonces células *E. coli* con conjuntos de plásmidos positivos y se obtuvieron nuevas preparaciones de plásmido a partir de conjuntos de 10 colonias individuales. Se repitió la transfección de células COS y la selección de sobrenadante y se identificaron los conjuntos positivos. Se repitió el proceso hasta aislar los clones positivos individuales. Se subclonó el inserto en Bluescript IKS y se determinó la secuencia de nucleótidos de ambas hebras usando un secuenciador de genes automatizado.

EJEMPLO 8

Expresión de ChIFN- γ en *E. coli*

Se clonó la región codificante madura de ChIFN- γ en el vector de expresión pQE (constructo QIAexpress tipo IV, Qiagen, CA) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de oligonucleótidos usada para realizar la PCR de la región madura del gen es tal como sigue:

sentido 5' ACTAGATCTCATACTGCAAGTCTAAAT 3'

antisentido 5' ACTAAGCTTTTAGCAATTGCATCTCCTCTG 3'

Todos los procedimientos usados para la expresión de ChIFN- γ recombinante usando columnas de Ni y purificación fueron según instrucciones del fabricante.

EJEMPLO 9

5 Preparación de anticuerpos frente a ChIFN- γ

Se produjeron antisueros de conejo frente a la proteína ChIFN- γ recombinante purificada. Se inmunizaron los conejos tres veces con 400 μ g de proteína y se recolectaron los sueros 10 días tras la inyección final. Se confirmó la reactividad específica de los sueros a ChIFN- γ usando sueros inmunitarios y pre-inmunitarios en inmunotransferencias de tipo Western y en ensayos que miden la capacidad para inhibir la liberación de nitrato por las células HD11.

Se produjeron anticuerpos monoclonales (Acm) inmunizando ratones 4 veces con 10 μ g de ChIFN- γ recombinante y se realizó la selección usando inmunotransferencias del tipo Western.

EJEMPLO 10

Expresión de moléculas de clase II

Se cultivaron células HD11 a 41°C en presencia de ChIFN- γ nativo y recombinante durante 48 h y se analizaron luego para determinar la expresión en la superficie de células de la clase II. Se lavaron las células dos veces y se incubaron durante 20 min. con anticuerpo monoclonal anti-clase II (MUI 78) seguido por incubación con Ig de oveja anti-ratón conjugada con FITC (Fab 2). Entonces, se lavaron tres veces y se fijaron resuspendiendo en PBS que contenía un 1% de paraformaldehído. Se analizaron las suspensiones de células usando un dispositivo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) con un total de 10^4 células analizadas para cada muestra.

EJEMPLO 11

ChIFN- γ como adyuvante

Se inyectó por vía intramuscular a cuatro grupos (n = 10) de pollos SPF de 3 semanas de edad o bien 0,2 o bien 0,02 ml de glóbulos rojos de oveja (SRBC). También se inyectó por vía intraperitoneal a un grupo en cada dosis 500 unidades de ChIFN- γ recombinante el día antes y el día de la inmunización. Se extrajo sangre de las aves semanalmente y se determinaron títulos de hemoaglutinación de los sueros.

EJEMPLO 12

Efecto del ChIFN- γ recombinante en la infección con el virus de la bursitis infecciosa *in vivo*

Se inyectó por vía intraperitoneal a un grupo (n = 10) de pollos SPF de 3 semanas de edad 500 unidades de ChIFN- γ recombinante en 2 días consecutivos y se inyectó a otro grupo de aves control (n = 10) diluyente solo. Se infectaron por vía intraocular ambos grupos de aves con el virus de la bursitis infecciosa (IBDV). Se sacrificaron las aves 7 días después y se determinaron los pesos corporales completos y de la bursa.

EJEMPLO 13

Producción de IFN

Se cultivaron células de bazo a 41°C en presencia de una variedad de mitógenos y se sometieron a prueba los sobrenadantes tras 24 h para determinar la presencia de actividad de IFN usando el ensayo de CEF. Los resultados se resumen en la tabla 2. Los experimentos preliminares mostraron que hacer crecer en cultivo las células a 41°C daba como resultado aproximadamente niveles superiores en 5 veces de interferón en comparación con a 37°C. La concentración de células óptima fue 5×10^6 leucocitos/ml. Experimentos cinéticos revelaron que se detectó primero IFN 4 h tras la estimulación y que se alcanzaron niveles máximos a las 24 h (datos no mostrados). El IFN recombinante ($-\alpha$, $-\beta$ o $-\gamma$) de las especies humana, murina, bovina, aviar y porcina fueron todas inactivas en el ensayo de CEF en concentraciones de hasta 10^4 U/ml (Digby y Lowenthal, 1995).

EJEMPLO 14

Caracterización de los tipos de IFN

Se usaron los sobrenadantes recogidos de CEF infectados con el virus del bosque de Semliki como una fuente de IFN- β (Sekellick y Marcus, 1986) y se trataron tal como se describe en el ejemplo 5.

5 En concordancia con resultados publicados previamente (von Bulow *et al.*, 1984; Thacore *et al.*, 1985) el interferón producido por CEF es resistente al calentamiento a 60°C y al tratamiento a pH 2,0 (figura 1). Las poblaciones de células de bazo o bien se enriquecieron en células adherentes (en gran parte monocitos), se enriquecieron en células no adherentes o bien se dejaron como poblaciones de bazo completas. Se indujo la producción de IFN haciendo crecer en cultivo las células durante 24 h en presencia de ConA o LPS. Aproximadamente el 95% de la actividad de IFN producido por las células adherentes era resistente al calentamiento a 60°C durante 1 h y a la
10 exposición a pH 2,0 (figura 1), lo que concuerda con la actividad de IFN- α/β . Por el contrario, sólo el 25% de la actividad de IFN producido por células de bazo no adherentes activadas por ConA fue resistente al calor o al tratamiento a pH 2,0. Estos resultados indican que esta población enriquecida en células T producía IFN- γ de manera predominante, pero que una cantidad significativa de IFN- α/β está presente también. Las poblaciones de bazo completas produjeron una mezcla de IFN lábil y resistente.

15 Se calentaron sobrenadantes de poblaciones de células de bazo completas durante diversos periodos de tiempo tal como se describe en el ejemplo 5 y se midió la pérdida de actividad de IFN posterior. Los experimentos cinéticos confirmaron que los sobrenadantes de poblaciones de células de bazo completas inducidas con ConA (CS) contenían una mezcla de IFN resistente al calor y sensible al calor. Aproximadamente el 60% de la actividad de IFN se perdió en el plazo de 1-2 min. de calentamiento hasta 60°C, mientras la fracción resistente perdió actividad
20 mucho más lentamente con una semivida de >2 h (figura 2). La exposición a temperaturas superiores aumentó la velocidad de pérdida de actividad para el IFN resistente pero no para el sensible.

EJEMPLO 15

Producción de líneas de células T de pollo

25 En la tabla 3 se muestra el fenotipo de algunas líneas de células T de pollo transformadas con REV representativas. Se midieron los sobrenadantes de estas líneas celulares para determinar la presencia de IFN- γ . Se encontró que la línea de células CC8.1 y sus clones producían altos niveles de actividad de IFN (tabla 3). Se analizaron los clones 7-8 días tras la clonación y eran claramente positivos para los marcadores de superficie CD3 y CD4. Los clones mantenidos de manera continua en cultivo durante 6 meses continuaron secretando altos niveles de IFN- γ . A este tipo de IFN se le denomina IFN- γ de pollo (ChIFN- γ)

30 La producción de ChIFN- γ es constitutiva debido a la exposición de estas líneas celulares a diversos estímulos (ConA, PHA, Acm frente a CD3, Acm frente a TCR o combinaciones de estos) aumentó los niveles de ChIFN- γ en menos de 2 veces (tabla 2).

35 Se obtuvieron varios clones de la línea de células CC8.1 y se midieron para determinar su producción de ChIFN- γ usando el ensayo de CEF descrito en el ejemplo 4 o el ensayo de nitrito descrito en el ejemplo 6. Existió una variación considerable en la cantidad de ChIFN- γ producida por los clones individuales, sin embargo, se mantuvo constante la razón del título de IFN tal como se midió en el ensayo de CEF con respecto a la actividad inductora de nitrito (figura 3). Cuando se calentó el ChIFN- γ presente en el sobrenadante de un clon de células T de pollo (CC8.1h) hasta 60°C se demostró que era lábil (figura 4).

EJEMPLO 16

40 Caracterización de CHIFN- γ

Con el fin de caracterizar adicionalmente el ChIFN- γ producido por las células T de pollo, se trataron los sobrenadantes de CC8.1h de diversas maneras incluyendo exposición a pH 2 y 2-ME tal como se describe en el ejemplo 5. La mayoría (~80%) de la actividad de ChIFN- γ era sensible a o bien el calor o bien al tratamiento a pH 2 cuando se midió en el ensayo de CEF tal como se describe en el ejemplo 4 (figura 5). La combinación de calor y
45 tratamiento a pH 2 no dio como resultado una pérdida de actividad adicional. La mayoría de la actividad de ChIFN- γ también fue resistente a la exposición a 2-ME y este IFN resistente a 2-ME es lábil al calor. Las propiedades del ChIFN- γ son altamente compatibles con el perfil fisicoquímico indicado para el IFN- γ de mamífero.

50 En mamíferos, el IFN- γ puede distinguirse del IFN- α/β por su capacidad para estimular la producción de nitrito por los macrófagos. Con el fin de confirmar que esto también es cierto para ChIFN- γ , se sometieron a prueba los sobrenadantes de células T para determinar su capacidad para inducir a los macrófagos HD11 a producir nitrito. El

sobrenadante de CC8.1h contiene aproximadamente 2400 U/ml de actividad de IFN cuando se mide mediante el ensayo de CEF (ejemplo 4) y 640 U/ml de IFN medido mediante el ensayo de nitrito (ejemplo 6). Cuando se calentó durante 30 min. a 65°C, se redujo el título de IFN de este sobrenadante hasta 10 U/ml (figura 6), indicando que el ChIFN- γ lábil al calor era responsable de la actividad inductora de nitrito. Por otro lado, los sobrenadantes con 4000 U/ml de IFN- β (medido mediante el ensayo de CEF del ejemplo 4) contiene sólo niveles bajos de actividad inductora de nitrito que no es lábil al calor (figura 6). Además, se encontró que la actividad inductora de nitrito producida por estas células T era lábil al calor, con una pérdida de actividad de aproximadamente un ~90% en el plazo de 5 min. de calentamiento hasta 60°C (figura 7). Estos resultados indican que el IFN- β aviar, como su homólogo mamífero, es muy ineficaz para inducir la secreción de nitrito en comparación con el IFN- γ .

La tabla 4 resume la producción de IFN por células T CEF y CC8.1h. Compara los títulos de IFN de CEF y los títulos inductores de nitrito para los sobrenadantes de ambos tipos de células. La razón de CEF con respecto a títulos de nitrito para ChIFN- γ derivado de células T es 5 en comparación con 480 para el IFN- β derivado de CEF. Este resultado concuerda con el encontrado en mamíferos en los que el IFN- γ es superior al IFN- β en su capacidad para inducir la secreción de nitrito.

EJEMPLO 17

Identificación del gen de ChIFN- γ .

Se generó una biblioteca de expresión de ADNc a partir de la línea de células T de pollo CC8.1h tal como se describe en el ejemplo 7. Se transfectaron conjuntos de 100 clones de ADNc en células COS y se sometieron a prueba los sobrenadantes para determinar la bioactividad de IFN de 2 a 4 días después. Se encontró que varios sobrenadantes estaban activos tanto en el ensayo de CEF (figura 8A) como en el de nitrito (figura 8B). La actividad de IFN fue sensible al calor y al tratamiento a pH 2, lo que indica la presencia de un gen de IFN- γ funcional en el conjunto de plásmidos. Se transformaron de manera individual los conjuntos positivos en *E. coli* y se generaron preparaciones de plásmido a partir de los conjuntos de 10 clones. Varias de estos conjuntos de plásmido eran positivos para el gen de IFN- γ y se repitió el procedimiento hasta aislar clones positivos individuales (por ejemplo 148.1.7 y 148.1.9) (figura 9).

EJEMPLO 18

Caracterización de ChIFN- γ recombinante.

Las células COS transformadas con preparaciones de plásmido a partir de clones positivos individuales produjeron niveles muy altos de ChIFN- γ recombinante (figura 10). El ChIFN- γ recombinante mostró el mismo grado de sensibilidad al calor (figura 11) y sensibilidad a pH 2 (datos no mostrados) que los mostrados por el ChIFN- γ natural.

Se determinaron las secuencias de nucleótidos de varios clones de ADNc tal como se describe en el ejemplo 7 y se encontró que eran idénticas. En la figura 12 y en las SEQ ID Nos: 1 y 2 se muestra el nucleótido de ChIFN- γ y las secuencias de aminoácidos derivadas. El ADNc de ChIFN- γ codifica para una proteína prevista de 164 aminoácidos con un péptido señal de 19 aminoácidos. La proteína madura prevista es de 145 aminoácidos de longitud con una masa molecular de 16,8 kD. Se prevén dos posibles sitios de N-glicosilación, el sitio más probable es en la posición 42-44, siendo el otro en la posición 23-25. Como otras proteínas de IFN- γ , ChIFN- γ contiene pocos residuos de cisteína. La proteína madura tiene sólo dos cisteínas que están ubicadas en el extremo C terminal (figura 12).

EJEMPLO 19

Comparación con IFN- γ de mamífero.

La comparación de la secuencia de aminoácido prevista de ChIFN- γ con varias secuencias de la proteína IFN- γ de mamífero reveló que aunque los tamaños son similares, el nivel de homología global es relativamente bajo (figura 13). Cuando se compara con una única especie de mamífero, la proteína ChIFN- γ muestra un grado superior de identidad de aminoácidos (es idéntica en un 32% al IFN- γ humano) y son evidentes varias secuencias cortas altamente conservadas (figura 14). El ChIFN- γ comparte un bajo grado de identidad (15%) con el ChIFN- α tal como se muestra en la figura 15. Además, el ChIFN- γ recombinante no protegió a los fibroblastos bovinos de la lisis mediada por el virus y de igual manera los IFN- α y - γ bovino no protegieron a los CEF (figura 16).

EJEMPLO 20

Expresión de moléculas de clase II.

Las células HD11 hechas crecer en cultivo en presencia de ChIFN- γ nativo o recombinante durante 48 h tal como se describe en el ejemplo 10 mostraron niveles potenciados de expresión en la superficie celular de moléculas de clase II con respecto a las células hechas crecer en cultivo en medios sólo (aumento en la expresión del 88% y el 52%, respectivamente). Al contrario, la presencia de otro estimulador de macrófago, LPS, indujo sólo un 8% de aumento en la expresión de clase II (figura 17).

EJEMPLO 21

Expresión de ChIFN- γ recombinante en *E coli* y función biológica.

Se expresó ChIFN- γ recombinante (ChIFN- γ r) que porta una cola de poli-HIS en *E coli* usando el sistema de expresión pQE y se purificó usando una columna de afinidad de Ni (figura 18A). Se produjeron dos formas de ChIFN- γ recombinante (Mr 16 y 18 kDa).

Se determinó la actividad de ChIFN- γ recombinante usando el ensayo de CEF (ejemplo 4), ensayo de nitrito (ejemplo 6) o un ensayo de protección de fibroblastos embrionarios de pavo (TEF). El ChIFN- γ recombinante estaba activo en el ensayo de nitrito (figura 19A), en el ensayo de CEF (figura 19B) y en un ensayo de protección de TEF de pavo (figura 19C).

Se controló también la estabilidad de ChIFN- γ recombinante en diversos intervalos de tiempo. Los datos proporcionados en la figura 20 indican que el ChIFN- γ recombinante es estable cuando se almacena a 4°C o a temperatura ambiente. Los inventores han demostrado adicionalmente que el ChIFN- γ recombinante puede almacenarse durante varios meses.

Se produjeron antisueros frente a ChIFN- γ recombinante en 4 conejos tal como se describe en el ejemplo 9. Los sueros de cada conejo reconocieron el ChIFN- γ recombinante tal como se muestra mediante inmunotransferencias tipo Western (figura 21). Algunos de estos sueros de conejo también inhiben la función biológica del ChIFN- γ nativo y recombinante *in vitro* pero no bloquean la función del ChIFN- β (figura 22).

Se inmunizaron también ratones con ChIFN- γ recombinante tal como se describe en el ejemplo 9 y se encontró que sus sueros inhiben la capacidad de ChIFN- γ para inducir la secreción de nitrito por las células HD11 (figura 23A).

Además, los anticuerpos anti-ChIFN- γ recombinante de conejo purificados por proteína G también inhiben la función del ChIFN- γ recombinante (figura 23B).

EJEMPLO 22

Sinergia entre los ChIFN tipo I y tipo II

El ChIFN- γ muestra sinergia con ChIFN- α y ChIFN- β tanto en el ensayo de CEF como en el de nitrito. Se hicieron crecer en cultivo CEF en presencia de ChIFN- γ que se había diluido en serie en una cantidad limitante de ChIFN- α recombinante. La combinación de los dos IFN fue hasta 5 veces más eficaz que cualquier tipo de IFN solo (figura 24A). Se demostró un nivel similar de sinergia en el ensayo de nitrito (figura 24B). Se pudo sinergizar también ChIFN- β con ChIFN- γ (figura 24C).

EJEMPLO 23

ChIFN- γ como adyuvante

Se inyectó SRBC a pollos (con o sin ChIFN- γ recombinante) y se determinaron los títulos de hemaglutinación (HA) semanalmente de los sueros tal como se describe en el ejemplo 11. Los resultados se muestran en la figura 25. El tratamiento con ChIFN- γ recombinante dio como resultado un título de HA medio superior, una respuesta de anticuerpos prolongada y una eficacia aumentada la dosis baja de antígeno. Esto indica que el ChIFN- γ recombinante es un adyuvante eficaz.

EJEMPLO 24

Efecto del ChIFN- γ en la ganancia de peso

Se inyectó por vía intraperitoneal a un grupo (n = 10) de pollos SPF de un día de edad 500 unidades de ChIFN- γ recombinante en 2 días consecutivos y se inyectó diluyente solo a otro grupo de aves control. Se pesaron las aves

durante un periodo de 12 días. Las aves a las que se inyectó ChIFN- γ recombinante mostraron ganancia de peso potenciada (figuras 26 y 27). El aumento en el peso corporal fue de desde el 5,8 hasta el 9,0% (tabla 5). Estos datos indican que el ChIFN- γ recombinante es eficaz en potenciar el rendimiento del crecimiento.

EJEMPLO 25

5 Efecto del ChIFN- γ en la ganancia de peso durante la infección con *E. acervulina*

Se inyectó por vía intraperitoneal a un grupo (n = 10) de pollos SPF de un día de edad 500 unidades de ChIFN- γ recombinante en 2 días consecutivos (día 0 y día 1) y se inyectó diluyente solo a otro grupo de aves control. Se infectaron todas las aves con 5×10^5 ooquistes en el día 1 y luego se pesaron durante un periodo de 12 días. Las aves a las que se inyectó ChIFN- γ recombinante mostraron ganancia de peso potenciada (figuras 28A y B). La infección con coccidiosis normalmente da como resultado pérdida de peso entre el día 4 y 6 de la infección. El tratamiento con ChIFN- γ redujo la pérdida de peso (figura 28C) y potenció la tasa de ganancia de peso tras la recuperación natural de la infección (figura 28D). El tratamiento con ChIFN- γ dio como resultado un aumento del 7,3 al 12,5% en el peso (tablas 6 y 7 y figura 29). Esto indica que ChIFN- γ recombinante fue eficaz en reducir el efecto de la coccidiosis en el rendimiento del crecimiento.

15 EJEMPLO 26

Efecto del ChIFN- γ recombinante en la infección con el virus de la bursitis infecciosa

Se inyectó a los pollos SPF o bien ChIFN- γ recombinante o bien diluyente en 2 días consecutivos y luego se les inyectó IBDV. Siete días después se determinaron los pesos corporales completos y de su bursa tal como se describe en el ejemplo 12. Las aves a las que se inyectó ChIFN- γ recombinante mostraron una razón potenciada de peso corporal: peso de bursa desde una media de 1,36 hasta 1,51 (figura 30), lo que indica que el ChIFN- γ recombinante fue eficaz en reducir el crecimiento del virus *in vivo*.

También se midió el efecto del ChIFN- γ recombinante para proteger a los CEF de la infección con IBDV *in vitro*. Se prepararon los CEF tal como se describe para el ensayo de interferón de CEF y se añadieron ChIFN- γ recombinante e IBDV a los cultivos juntos. Se midió la supervivencia celular 3 días después en una escala de 0 a 4, donde 0 representa el nivel de supervivencia celular observado en presencia del IBDV y ausencia de IFN (< 5% de supervivencia celular) y 4 representa el nivel de supervivencia celular observado en ausencia del IBDV (> 90% de supervivencia celular). Tal como se muestra en la figura 31, el ChIFN- γ recombinante es eficaz en proteger los CEF de la infección con IBDV *in vitro*.

En conclusión, se ha demostrado que ChIFN- γ recombinante es eficaz en la prevención de la infección por IBDV tanto *in vivo* como *in vitro*.

EJEMPLO 27

Discusión

Estudios previos en pollos han identificado sólo el IFN tipo I y ponen en duda si las células T de pollo pueden producir moléculas de interferón tipo II.

Los inventores han demostrado en el presente documento que las células T de pollo producen la molécula de interferón tipo II, IFN- γ . Los inventores tratan adicionalmente la naturaleza del IFN derivado de células T generando directamente líneas de células T de pollo novedosas que producen niveles altos de ChIFN- γ . Tales líneas de células T no se habían indicado previamente. La presencia del IFN tipo II en especies de aves estaba apoyada en el presente documento por el sorprendente descubrimiento de que los sobrenadantes de estas células T pueden inducir niveles altos de producción de nitrito por los macrófagos, una propiedad del IFN- γ pero no del IFN- α/β en mamíferos (Fast *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993).

En mamíferos, el IFN- α de diferentes especies comparten un alto grado de homología que les permite que se produzca reactividad cruzada funcional entre la mayoría de especies. De manera similar, el IFN- β de una especie reaccionará a menudo con células de otra especie. Los IFN- α y - β también comparten un grado significativo de homología y es muy probable que sus genes se originen a partir de un gen único (Weissmann y Weber, 1986). Por el contrario, el IFN- γ producido por las células T de pollo no puede reaccionar de manera cruzada funcionalmente con células de mamífero. Existe también sólo homología limitada entre las moléculas de IFN- γ aviar (es decir ChIFN- γ) y de IFN- γ de mamífero (véase a continuación).

Se ha clonado un homólogo de pollo del gen de IFN tipo I de mamífero a partir de células de embrión de pollo primarias inducidas por un virus envejecidas *in vitro*. Se demostró que el ChIFN- α carece de actividad inductora de nitrito. Además, los anticuerpos producidos frente a esta proteína no inhibieron la actividad inductora de nitrito de los sobrenadantes de cultivos de células de bazo de pollo inducidas con ConA.

- 5 Se usó un clon de células T de pollo novedoso (CC8.1h) para clonar el gen para ChIFN- γ . ChIFN- γ no está relacionado con ChIFN- α . ChIFN- γ indujo niveles altos de producción de nitrito por macrófagos, una propiedad de IFN- γ pero no de IFN- α/β en mamíferos. Por el contrario, Schultz *et al.* (1995) indicaron recientemente que ChIFN- α recombinante no pudo inducir la secreción de óxido nítrico de monocitos de pollo.

- 10 El gen de ChIFN- γ codifica para una proteína madura prevista de 145 aminoácidos con una masa molecular de 16,8 kD. La proteína ChIFN- γ es sólo idéntica en un 35% y un 32% a las moléculas de IFN- γ equina y humana, respectivamente. Un motivo de Lys-Arg-Lys-Arg C-terminal puede representar el punto de sensibilidad a pH 2 observado para ChIFN- γ . Además, la proteína ChIFN- γ comparte sólo el 15% de identidad con el ChIFN- α recientemente notificado, que es similar al nivel de homología encontrado cuando se comparan los IFN tipo I y II de mamífero. Además, el ChIFN- γ tiene un tamaño más pequeño que el ChIFN- α y contiene sólo dos residuos de cisteína en lugar de siete.

- 20 En mamíferos, las proteínas de IFN- α están altamente conservadas a nivel de aminoácidos, lo que permite que se produzca la reactividad cruzada funcional entre varias especies. De manera similar, el IFN- β de una especie reaccionará habitualmente con células de otra especie. Los IFN- α y - β también comparten un grado significativo de homología entre sí y es muy probable que sus genes se originen a partir de un gen ancestral único. Por el contrario, el nivel de homología entre proteínas de IFN- γ de mamífero diferentes es relativamente bajo y como consecuencia, la actividad funcional sólo cruza rara vez la barrera entre especies. El grado de homología entre el polipéptido de ChIFN- γ y los polipéptidos de IFN- γ de mamífero es sólo del 32-35%. El ChIFN- γ no funciona en células de especies de mamífero. Sin embargo, los inventores han demostrado en el presente documento que ChIFN- γ sí reacciona con células de otras especies de aves, en particular con células de pavo.

- 25 Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas a las descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos denominados o indicados en esta memoria descriptiva, de manera individual o colectiva, y cualquiera y todas las combinaciones o cualquiera de dos o más de dichas etapas o características.

- 30 **Tabla 2: Producción de IFN por clones de células T y células de bazo de pollo**

Estímulo	Título de interferón (U/ml en ensayo de CEF)					
	Ninguno	ConA	PHA	CD3	TCR2	TCR3
Bazo ^a	<5	340	360	220	270	60
CC4.1 ^b	<5	<5	-	<5	-	-
CC4.3 ^c	220	160	-	240	180	-
CC8.1 ^b	480	640	640	560	480	640
CC8.1h ^d	2400	4800	-	3200	3200	2400
CC8.1x ^d	1800	-	-	-	-	-

^a Las células de bazo se cultivaron durante 24 h tal como se ha descrito con o sin estímulo

^b Línea de células T transformadas con REV (CD3⁺, CD4⁺)

^c Línea de células T transformadas con REV (CD3⁺, CD8⁺)

^d Línea clonada (de CC8.1)59

Tabla 3: Fenotipo de las líneas de células T de pollo transformadas con REV

Línea celular	CD3 ^a	CD4 ^a	CD8 ^a	TCR ^b	IFN ^c
CC4.1	97	48	25	2	<5
CC4.2	97	23	54	2	120
CC4.3	94	14	58	2	80
CC7.1	93	22	37	3	60
CC7.2	98	29	45	2	120
CC7.3	98	21	39	2,1	80
CC8.1	97	81	4	2,3	160
CC8.1x ^d	95	nd	nd	nd	320
CC8.1h ^e	0	0	0	nd	320
CC8.1x ^e	0	0	0	nd	280
bazo ^f	60	18	45	2	<5

^a Porcentaje de células positivas para el marcador de superficie^b. Fenotipo predominante de receptor de células T (TCR1,2,3)

^c Título de IFN del sobrenadante (ensayo de nitrito, U/ml)

^d Clonada a partir de CC8.1 y analizada 7 días tras la clonación

^e Clonada a partir de CC8.1 y analizada 4 semanas tras la clonación

^f Leucocitos de bazo de un pollo de 6 semanas de edad

Tabla 4: Relación entre los títulos de IFN medidos mediante el ensayo de CEF frente al ensayo de nitrito

	CEF ^a	Nitrito ^b	CEF:Nitrito ^c
CC8.1h	3200 ^d	640	5
CEF	4800	10	480

^a Título de IFN medido mediante el ensayo de CEF

^b Título de IFN medido mediante el ensayo de nitrito

^c Razón del título de CEF con respecto al título inductor de nitrito

^d IFN (U/ml)

Tabla 5: Efecto del ChIFN- γ recombinante en la ganancia de peso en pollos de engorde

Día	Peso corporal (g) ^a		% de aumento
	ChIFN- γ ^b recombinante	Control ^c	
3	154,0 \pm 18	143,5 \pm 24	7,3
4	204,9 \pm 23	198,2 \pm 35	9,0
5	235,4 \pm 26	217,0 \pm 40	8,5
6	262,3 \pm 28	244,3 \pm 47	7,4
7	290,1 \pm 30	269,5 \pm 49	7,6
10	390,8 \pm 39	360,1 \pm 62	8,6
12	475,6 \pm 43	449,5 \pm 75	5,8

^a Peso medio de los pollos (n=10) \pm desviación estándar

^b Aves a las que se inyectó por vía interperitoneal 500 U de ChIFN- γ recombinante en los días 0 y 1

^c Aves a las que se inyectó por vía intraperitoneal diluyente en los días 0 y 1

Tabla 6: Efecto del ChIFN- γ recombinante en la ganancia de peso en pollos de engorde tras la infección con *E. acervulina*

5

Día	Peso corporal (g) ^a		% de aumento
	ChIFN- γ ^b recombinante ^b	control ^c	
4	198,7 \pm 26	185,1 \pm 30	7,3
5	195,2 \pm 26	176,9 \pm 29	10,2
6	202,2 \pm 23	185,4 \pm 31	9,1
8	248,4 \pm 35	220,9 \pm 42	12,5
11	353,6 \pm 52	315,6 \pm 56	12,0

^a Peso medio de los pollos (n=10) \pm desviación estándar

^b Aves a las que se inyectó por vía intraperitoneal 500 U de CHIFN- γ recombinante en los días 0 y 1 e infectadas con 5×10^5 ooquistes en el día 1

^c Aves a las que se inyectó por vía intraperitoneal diluyente en los días 0 y 1 e infectadas con 5×10^5 ooquistes en el día 1

Tabla 7: Efecto del ChIFN- γ recombinante en la ganancia de peso de pollos de engorde tras la infección con *E. acervulina*

Día	Peso corporal (g)		Aumento (g) ^d
	ChIFN- γ ^b recombinante ^b	Control ^c	
1-4	52,0 ^a	52,1	-0,1
4-5	-3,5	-8,3	4,8
5-6	7,0	8,6	-1,6
6-8	46,2	35,5	10,7
8-11	105,2	94,7	10,5
1-11	206,9	182,6	24,3

^a Ganancia de peso media de los pollos (n=10) \pm desviación estándar entre los días indicados

^b Aves a las que se inyectó por vía intraperitoneal 500 U de ChIFN- γ recombinante en los días 0 y 1 e infectadas con 5×10^5 de ooquistes en el día 1

^c Aves a las que se inyectó por vía intraperitoneal diluyente en los días 0 y 1 e infectadas con 5×10^5 de ooquistes en el día 1

^d Aumento en el peso corporal debido a ChIFN- γ recombinante

BIBLIOGRAFÍA

- 5 1. Amann y Brosius (1985). *Gene* 40, 183
2. Ausubel, F.M. *et al.* (1987) In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (ISBN 047140338).
3. Beug, H. *et al.* (1979). *Cell* 18, 375-390.
4. Digby, M.R. y Lowenthal, J.W. (1995). *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 939-945.
5. Dijkmans, R. *et al.* (1990). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 26, 319-332.
- 10 6. Fast, D.J. *et al.* (1993). *J. Interferon Res.* 13, 271-277.
7. Huang, S. *et al.* (1993). *Science* 259, 1742-1745.
8. Lillehoj, H.S. *et al.* (1992). *Poult. Sci. Rev.* 4, 67-85.
9. Lowenthal, J.W. *et al.* (1993). *Immunol. Cell Biol.* 72, 115-122.
- 15 10. Lowenthal, J.W. *et al.* (1995a). In: *Advances in Aviar Immunology Research*. (Eds. Davison T.F., Bumstead N. y Kaiser P.) Carfax, Oxford. Págs. 179-186.
11. Lowenthal, J.W. *et al.* (1995b). *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 933-938.
12. Prowse, S.J. y Pallister, J. (1989). *Aviar Pathol.* 18, 619-630.
13. Pusztai, R. *et al.* (1986). *Acta Virol.*, 30, 131-136.

14. Sambrook, J. *et al.* (1989). In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
15. Schultz, U. *et al.* (1995). Eur. J. Immunol. 25, 847-851.
16. Sekellick, M.J. y Marcus, P.I. (1986). Methods Enzymol. 119, 115-125.
17. Sekellick, M.J. *et al.* (1994). J. Interferon Res. 14, 71-79.
- 5 18. Shimatake y Rosenberg (1981) Nature 292, 128.
19. Studier y Moffat (1986) J. Mol. Biol. 189, 113.
20. Sung, Y.-J. *et al.* (1991). J Leukocyte Biol. 50, 49-56.
21. Thacore, H.R *et al.* (1985). Interferon Res. 5, 279-288.
22. Von Bulow, V. *et al.* (1984). Aviar Pathol. 13. 621-637.
- 10 23. Weiler, H. y Von Bulow, V. (1987). Aviar Pathol. 16, 439-452.
24. Weissmann, C., y Weber, H. (1986). Prog. Nucleic Acid Res. 33, 251-300.
25. Lillehoj *et al.* (1993a). Colloques De L'Inra (Aviar Immunology en Progress). 62, 105-111.
26. Lillehoj *et al.* (1993b). Colloques De L'Inra (Aviar Immunology en Progress). 62, 131-136.

LISTA DE SECUENCIAS

15 (1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION

(B) CALLE: Limestone Avenue

(C) CIUDAD: Campbell

20 (D) ESTADO: Australian Capital Territory

(E) PAÍS: Australia

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 2601

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: CITOCINAS AVIARES NOVEDOSAS Y SECUENCIAS GENÉTICAS QUE CODIFICAN PARA LAS MISMAS

25 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

30 (D) SOFTWARE: PatentIn Release n.º 1.0, Versión n.º 1.30 (EPO)

(v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

NÚMERO DE SOLICITUD: EP 96903831.4

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1079 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10 (A) ORGANISMO: Pollo (*Gallus sp.*)

(G) TIPO DE CÉLULA: Célula T1

(H) LÍNEA CELULAR: CC8.1h

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: CC8.1h

15 (B) CLON: ChIFN-gamma

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 134..625

(ix) CARACTERÍSTICA:

20 (A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide

(B) UBICACIÓN: 191..625

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: 5'UTR

(B) UBICACIÓN: 1..133

25 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: 3'UTR

(B) UBICACIÓN: 626..1079

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

GGATCCACTA GTAACGGCCG CCAGTGTGGT GGAATTCAGA AGACATAACT ATTAGAAGCT	60
GAAGCTCACT GAGCTTATAT CTGACATCTC CCAGAAGCTA TCTGAGCATT TGAAGTGGC	120
CATCACCAAG AAG ATG ACT TGC CAG ACT TAC AAC TTG TTT GTT CTG TCT	169
Met Thr Cys Gln Thr Tyr Asn Leu Phe Val Leu Ser	
-19 -15 -10	
GTC ATC ATG ATT TAT TAT GGA CAT ACT GCA AGT AGT CTA AAT CTT GTT	217
Val Ile Met Ile Tyr Tyr Gly His Thr Ala Ser Ser Leu Asn Leu Val	
-5 1 5	
CAA CTT CAA GAT GAT ATA GAC AAA CTG AAA GCT GAC TTT AAC TCA AGT	265
Gln Leu Gln Asp Asp Ile Asp Lys Leu Lys Ala Asp Phe Asn Ser Ser	
10 15 20 25	
CAT TCA GAT GTA GCT GAC GGT GGA CCT ATT ATT GTA GAG AAA CTG AAG	313
His Ser Asp Val Ala Asp Gly Gly Pro Ile Ile Val Glu Lys Leu Lys	
30 35 40	
AAC TGG ACA GAG AGA AAT GAG AAA AGG ATC ATA CTG AGC CAG ATT GTT	361
Asn Trp Thr Glu Arg Asn Glu Lys Arg Ile Ile Leu Ser Gln Ile Val	
45 50 55	
TCG ATG TAC TTG GAA ATG CTT GAA AAC ACT GAC AAG TCA AAG CCG CAC	409
Ser Met Tyr Leu Glu Met Leu Glu Asn Thr Asp Lys Ser Lys Pro His	
60 65 70	

ATC AAA CAC ATA TCT GAG GAG CTC TAT ACT CTG AAA AAC AAC CTT CCT Ile Lys His Ile Ser Glu Glu Leu Tyr Thr Leu Lys Asn Asn Leu Pro 75 80 85	457
GAT GGC GTG AAG AAG GTG AAA GAT ATC ATG GAC CTG GCC AAG CTC CCG Asp Gly Val Lys Lys Val Lys Asp Ile Met Asp Leu Ala Lys Leu Pro 90 95 100 105	505
ATG AAC GAC TTG AGA ATC CAG CGC AAA GCC GCG AAT GAA CTC TTC AGC Met Asn Asp Leu Arg Ile Gln Arg Lys Ala Ala Asn Glu Leu Phe Ser 110 115 120	553
ATC TTA CAG AAG CTG GTG GAT CCT CCG AGT TTC AAA AGG AAA AGG AGC Ile Leu Gln Lys Leu Val Asp Pro Pro Ser Phe Lys Arg Lys Arg Ser 125 130 135	601
CAG TCT CAG AGG AGA TGC AAT TGC TAATGGCATC TTATGACCTC CTGTGCTCAA Gln Ser Gln Arg Arg Cys Asn Cys 140 145	655
CTATTTTAAA TTTTACAATG CACAATTTTT ATGTTGTGAT TTTTAACTG AGTTTATATA	715
CATTTATTTA TTAATATTTA AGTATTTTAA ATAATTATTT ATATTA AAAA AAAACCAGGC	775
AAACAATGAA AGTATTTATA CCTCCTACTG CTGTGTAAGA AACGGATTGT GGTCTTAAAA	835
TACTGTCTAT CTGTTGTGTG TGGGTTGACT GAAAATACCG AATGAGGTGG ATGTTTACCA	895
GTTTCTGTGT GGGAAATACT GAATTGGAGG TGGATCTGTA CTCAAGAAAA CCCACTCATC	955
CCGGTCAGTC TAGTATTTCT AAATCCAAAT CAAGGAGTGG CTTGTTTAAA GGGAAAAAAT	1015
GTGAGCACTC TCTGACTGGG TCTTAGAGAT TTTACTGATG GTTTGGCATG ACTAAGAATT	1075
TAGG	1079

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 164 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

Met Thr Cys Gln Thr Tyr Asn Leu Phe Val Leu Ser Val Ile Met Ile
 -19 -15 -10 -5

Tyr Tyr Gly His Thr Ala Ser Ser Leu Asn Leu Val Gln Leu Gln Asp
 1 5 10

Asp Ile Asp Lys Leu Lys Ala Asp Phe Asn Ser Ser His Ser Asp Val
 15 20 25

Ala Asp Gly Gly Pro Ile Ile Val Glu Lys Leu Lys Asn Trp Thr Glu
 30 35 40 45

Arg Asn Glu Lys Arg Ile Ile Leu Ser Gln Ile Val Ser Met Tyr Leu
 50 55 60

Glu Met Leu Glu Asn Thr Asp Lys Ser Lys Pro His Ile Lys His Ile
 65 70 75

Ser Glu Glu Leu Tyr Thr Leu Lys Asn Asn Leu Pro Asp Gly Val Lys
 80 85 90

Lys Val Lys Asp Ile Met Asp Leu Ala Lys Leu Pro Met Asn Asp Leu
 95 100 105

Arg Ile Gln Arg Lys Ala Ala Asn Glu Leu Phe Ser Ile Leu Gln Lys
 110 115 120 125

Leu Val Asp Pro Pro Ser Phe Lys Arg Lys Arg Ser Gln Ser Gln Arg
 130 135 140

Arg Cys Asn Cys
 145

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende:
 - (i) una secuencia que codifica para un interferón- γ aviar que comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1, o al menos el 40% idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1; o
 - (ii) una secuencia que es complementaria a la secuencia de (i).
2. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, en la que la identidad en porcentaje objeto es al menos el 55% idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1.
3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2, en la que la identidad en porcentaje objeto es al menos el 65% idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1.
4. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de interferón- γ aviar, pudiendo hibridarse dicha molécula de ácido nucleico en condiciones de rigurosidad al menos baja con la molécula de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1 o una hebra complementaria de la misma; y comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico aislada una secuencia de nucleótidos que es al menos el 40% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1.
5. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 4, que comprende además una secuencia de nucleótidos que es al menos el 55% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1.
6. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 4, que comprende además una secuencia de nucleótidos que es al menos el 65% idéntica a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 1.
7. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 4 ó 5 ó 6, en la que dicho IFN- γ es una molécula de interferón- γ de pollo.
8. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en longitud aislados de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.
9. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos aproximadamente 100 nucleótidos contiguos en longitud derivados de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.
10. Constructo genético que incluye la molécula de ácido nucleico aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 operativamente unida a una secuencia promotora.
11. Constructo genético según la reivindicación 10, adecuado para su expresión en una célula procariota incluyendo pero sin limitarse a bacterias.
12. Constructo genético según la reivindicación 11, denominado pQE interferón- γ de pollo y depositado con el número de registro de AGAL N96/9464.
13. Constructo genético según la reivindicación 10, adecuado para su expresión en una célula eucariota.
14. Constructo genético según la reivindicación 13, denominado pcDNA3/G-IFN aviar y depositada en AGAL como número de registro N95/12388.
15. Constructo genético que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para o es complementaria a una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de citocina aviar en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión entre:
 - (i) interferón- γ aviar y un segundo interferón tipo II; o
 - (ii) interferón- γ aviar y un interferón tipo I seleccionados de la lista que comprende interferón- α , interferón- β , interferón- α de pollo o interferón- β de pollo

en el que dicho interferón- γ aviar comprende una secuencia de residuos de aminoácido tal como se expone en SEQ ID NO: 2 o es al menos el 40% idéntica a la misma a lo largo de la longitud de SEQ ID NO: 2.

16. Constructo genético según la reivindicación 15, en el que dicho interferón- γ aviar es una molécula de interferón- γ de pollo.
- 5 17. Polipéptido de interferón- γ aviar recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o es al menos el 40% idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 2.
18. Polipéptido de citocina aviar recombinante según la reivindicación 16, en el que dicho interferón- γ aviar es interferón- γ de pollo.
- 10 19. Método de producción de una citocina aviar recombinante en una célula que comprende expresar en dicha célula en cultivo una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
20. Método de producción de un interferón- γ aviar recombinante en una célula en cultivo que comprende las etapas de:
- (i) introducir en dicha célula un constructo genético según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16; y
- 15 (ii) cultivar dicha célula durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicha molécula de ácido nucleico se exprese.
21. Método según la reivindicación 20, que comprende además la etapa de aislar dicho interferón- γ aviar.
22. Célula aislada que expresa un interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18.
23. Célula aislada según la reivindicación 22, en la que dicho interferón- γ aviar es interferón- γ de pollo.
- 20 24. Célula aislada según la reivindicación 23, en la que dicho interferón- γ de pollo comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, o es al menos el 40% idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 2.
25. Célula aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, siendo dicha célula una célula eucariota.
26. Célula aislada según la reivindicación 25, en la que dicha célula eucariota es una célula aviar.
- 25 27. Célula aislada según la reivindicación 26, en la que dicha célula aviar es una célula T.
28. Célula aislada según la reivindicación 27, en la que dicha célula T es la línea celular CC8.1h depositada como número de registro de AGAL N94/46035.
29. Célula aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en la que el interferón- γ aviar es una molécula recombinante y la célula eucariota es una célula de mamífero, levadura, insecto o vegetal o una línea celular seleccionada de la lista que comprende células COS, VERO, HeLa, C127 de ratón, de ovario de hámster chino (CHO), WI-38, de riñón de cría de hámster (BHK) o MDCK.
- 30 30. Célula aislada según la reivindicación 29, siendo dicha célula la línea celular COS que contiene el plásmido pCDNA3/G-IFN aviar depositado como número de registro de AGAL N95/12388.
31. Célula aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, siendo dicha célula una célula procariota y siendo la citocina una molécula recombinante.
- 35 32. Célula aislada según la reivindicación 31, siendo la célula una bacteria.
33. Cepa de *Escherichia coli* pQE ChIFN- γ depositada como número de registro de AGAL N96/9464.
34. Célula aislada que contiene la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
35. Célula aislada que contiene el constructo genético según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16.

36. Uso del polipéptido de interferón- γ aviar recombinante según la reivindicación 17 ó 18 en la fabricación de un medicamento para el mantenimiento, la estimulación o la potenciación de una respuesta inmunitaria en un animal aviar.
- 5 37. Uso de la molécula de ácido nucleico aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la fabricación de un medicamento para el mantenimiento, la estimulación o la potenciación de una respuesta inmunitaria en un animal aviar.
38. Uso del constructo genético según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16 en la fabricación de un medicamento para el mantenimiento, la estimulación o la potenciación de una respuesta inmunitaria en un animal aviar.
- 10 39. Uso de un interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18 o un polipéptido de fusión entre un interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18 y un segundo interferón tipo II seleccionado de la lista que comprende interferón- α , interferón- β , interferón- α de pollo e interferón- β de pollo en la fabricación de un medicamento para el mantenimiento, la estimulación o la potenciación de una respuesta inmunitaria en un animal aviar.
- 15 40. Uso de a polipéptido de interferón- γ aviar recombinante según la reivindicación 17 ó 18, una molécula de ácido nucleico aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un constructo genético según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16 o un polipéptido de fusión entre un interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18 y un segundo interferón tipo II seleccionado de interferón- α , interferón- β , interferón- α de pollo e interferón- β de pollo en la fabricación de un medicamento para el mantenimiento, la estimulación o la potenciación de una respuesta inmunitaria en un animal aviar, en el que el animal aviar es susceptible de infección o está infectado por un agente infeccioso viral seleccionado de la lista que comprende virus de la bronquitis infecciosa, virus de la laringotraqueítis infecciosa aviar, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia del pollo y virus de la gripe aviar o un procariota seleccionado de *E. coli*, *Salmonella ssp.*, *Eimeria ssp.* o *Mycoplasma ssp.*
- 20 41. Uso según la reivindicación 40, en el que dicho medicamento está en una forma adecuada para su administración al animal aviar mediante ingestión o mediante inyección *in ovo*, inyección tras la eclosión, inyección intraperitoneal, inyección intradérmica, inyección intramuscular, inyección intraocular, inyección intravenosa o inyección subcutánea.
- 25 42. Adyuvante que comprende una molécula de citocina aviar, en el que dicha citocina es un interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18 o una molécula de fusión entre dicha molécula de interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18 y una segunda molécula de citocina y, opcionalmente, un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 43. Adyuvante según la reivindicación 42, en el que el interferón- γ es interferón- γ de pollo.
- 35 44. Adyuvante según la reivindicación 42 ó 43, en el que si la citocina es una molécula de fusión la segunda molécula de citocina es un interferón tipo I incluyendo interferón- α , interferón- β , interferón- α de pollo o interferón- β de pollo o cualquier molécula de interferón tipo II.
- 45 45. Adyuvante que comprende al menos la citocina aviar recombinante según la reivindicación 17 ó 18 en combinación con un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
46. Composición de vacuna que comprende el adyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45 en combinación con un antígeno tal como un organismo patógeno infeccioso vivo, un organismo patógeno muerto, una vacuna recombinante o una vacuna de subunidades recombinante derivada de la misma y, opcionalmente, uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables, aceptables para uso veterinario.
47. Composición de vacuna según la reivindicación 46, en la que el antígeno se deriva de un patógeno viral o bacteriano u otro seleccionado de la lista que comprende virus de la bursitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la laringotraqueítis infecciosa aviar, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia del pollo, virus de la gripe aviar, *E. coli*, *Salmonella ssp.* o *Eimeria ssp.*
48. Uso del polipéptido de interferon- γ aviar recombinante según la reivindicación 17 ó 18 en la fabricación de una sustancia que puede estimular el rendimiento de crecimiento de un animal aviar.
49. Uso de la molécula de ácido nucleico aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la

fabricación de una sustancia que puede estimular el rendimiento de crecimiento de un animal aviar.

50. Uso del constructo genético según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16 en la fabricación de una sustancia que puede estimular el rendimiento de crecimiento de un animal aviar.
- 5 51. Uso de un interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18 o un polipéptido de fusión entre un interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18 y o bien un segundo interferón tipo II o bien un interferón tipo I seleccionados de la lista que comprende interferón- α , interferón- β , interferón- α de pollo e interferón- β de pollo en la fabricación de una sustancia que puede estimular el rendimiento de crecimiento de un animal aviar.
52. Molécula de anticuerpo que puede unirse a un interferón- γ aviar o al interferón- γ aviar recombinante según la reivindicación 17 ó 18.
- 10 53. Producto alimenticio terapéutico o medicamentoso que comprende el polipéptido de interferón- γ aviar recombinante según la reivindicación 17 ó 18 en una forma adecuada para su ingestión por una especie de ave de corral, ave doméstica o ave de caza.
54. Uso del anticuerpo según la reivindicación 52 para someter a ensayo la cantidad de interferón- γ aviar en una muestra biológica derivada de una especie de ave.
- 15 55. Uso según la reivindicación 54, en el que el ensayo se usa para la selección de los acervos genéticos de aves que expresan o que puede inducirse que expresen altos niveles de un interferón- γ aviar.
56. Uso según la reivindicación 55, en el que el ensayo se usa para la selección de un acervo genético seleccionado de aves que presentan adicionalmente una resistencia a enfermedades mejorada.
- 20 57. Uso según la reivindicación 56, en el que la resistencia a enfermedades es un patógeno viral, bacteriano u otro seleccionado de la lista que comprende virus de la bursitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia del pollo, virus de la gripe aviar, *E. coli*, *Salmonella ssp.* o *Eimeria ssp.*
58. Uso según la reivindicación 54, en el que el ensayo es para determinar la magnitud de una respuesta inmunitaria en un ave.
- 25 59. Uso del anticuerpo según la reivindicación 52 en el aislamiento o la purificación de un interferón- γ aviar.
60. Ensayo de diagnóstico para medir el nivel de un interferón- γ aviar según la reivindicación 17 ó 18 en un ave que comprende las etapas de poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicha ave con el anticuerpo según la reivindicación 52 durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de un complejo anticuerpo-citocina y luego detectar dicha formación de complejo.
- 30 61. Uso del ensayo de diagnóstico según la reivindicación 60 para seleccionar acervos genéticos de aves que expresan altos niveles de una citocina aviar.
62. Uso del ensayo de diagnóstico según la reivindicación 60, para determinar la presencia de o para cuantificar la magnitud de una respuesta inmunitaria en una especie de ave.
- 35 63. Uso según la reivindicación 62, en el que la respuesta inmunitaria es frente a un patógeno viral, bacteriano u otro seleccionado de la lista que comprende virus de la bursitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia del pollo, virus de la gripe aviar, *E. coli*, *Salmonella ssp.* o *Eimeria ssp.*
- 40 64. Uso del ensayo de diagnóstico según la reivindicación 60 para medir el nivel de inmunidad mediada por células tras la vacunación de un ave con un antígeno.

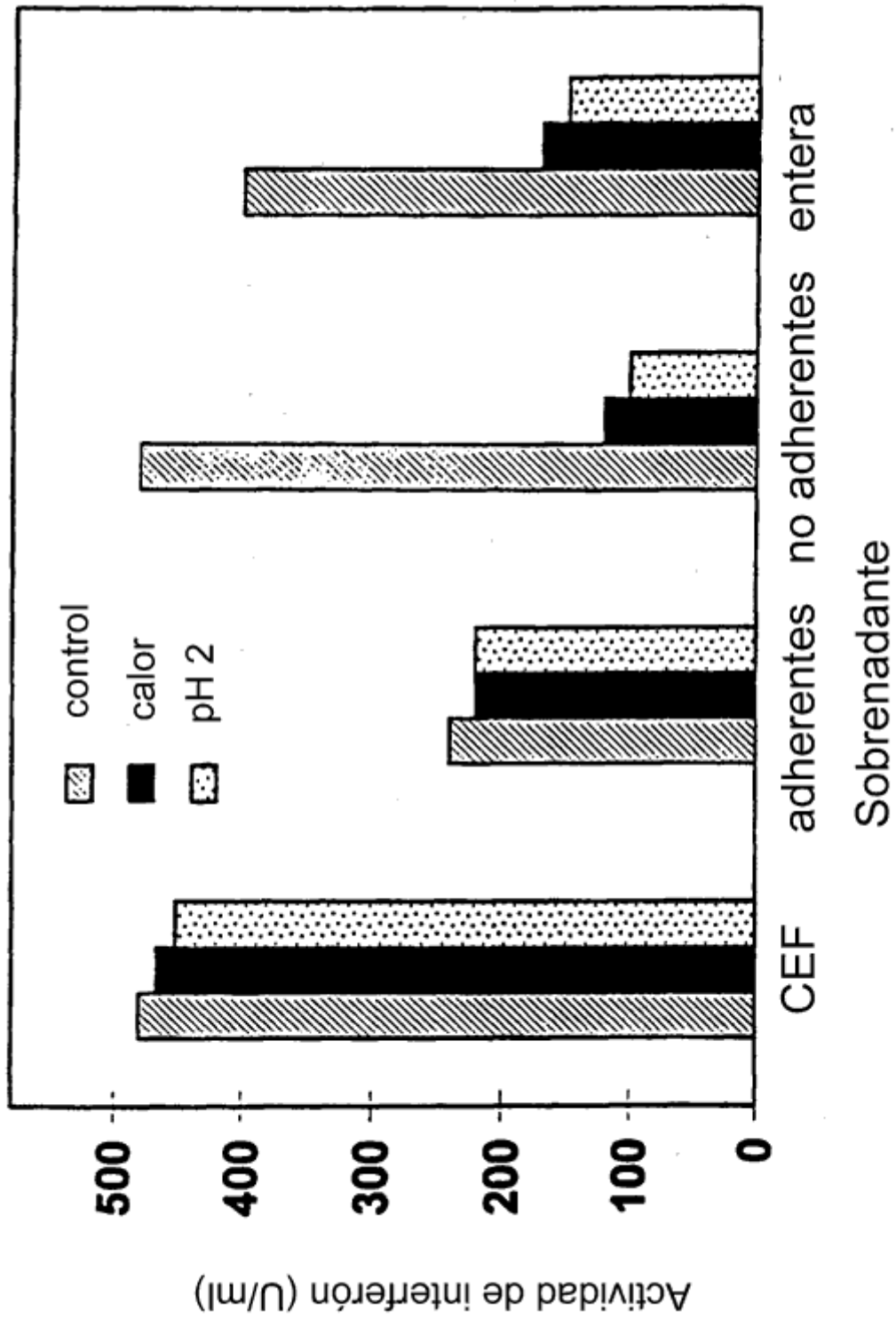


Figura 1

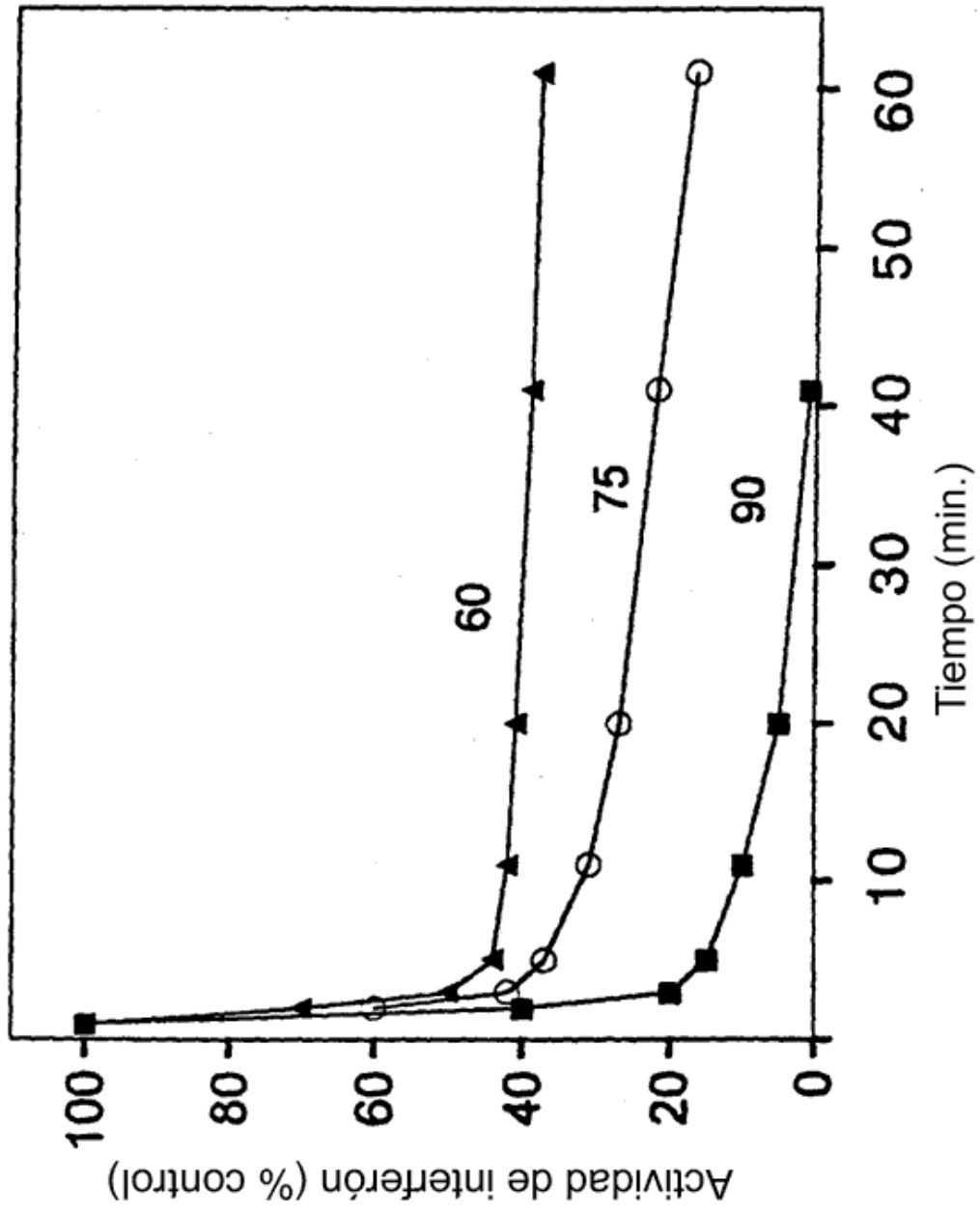


Figura 2

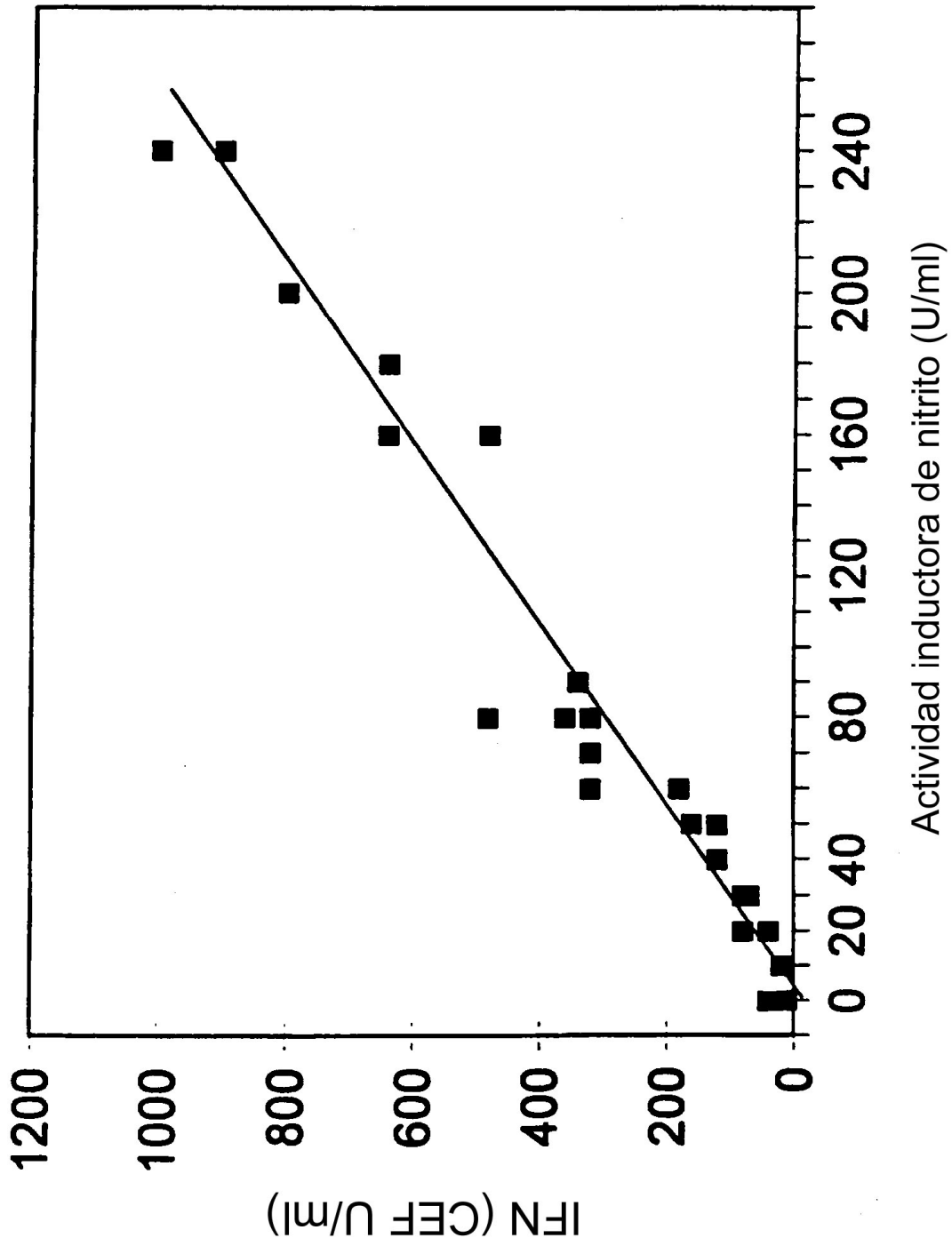


Figura 3

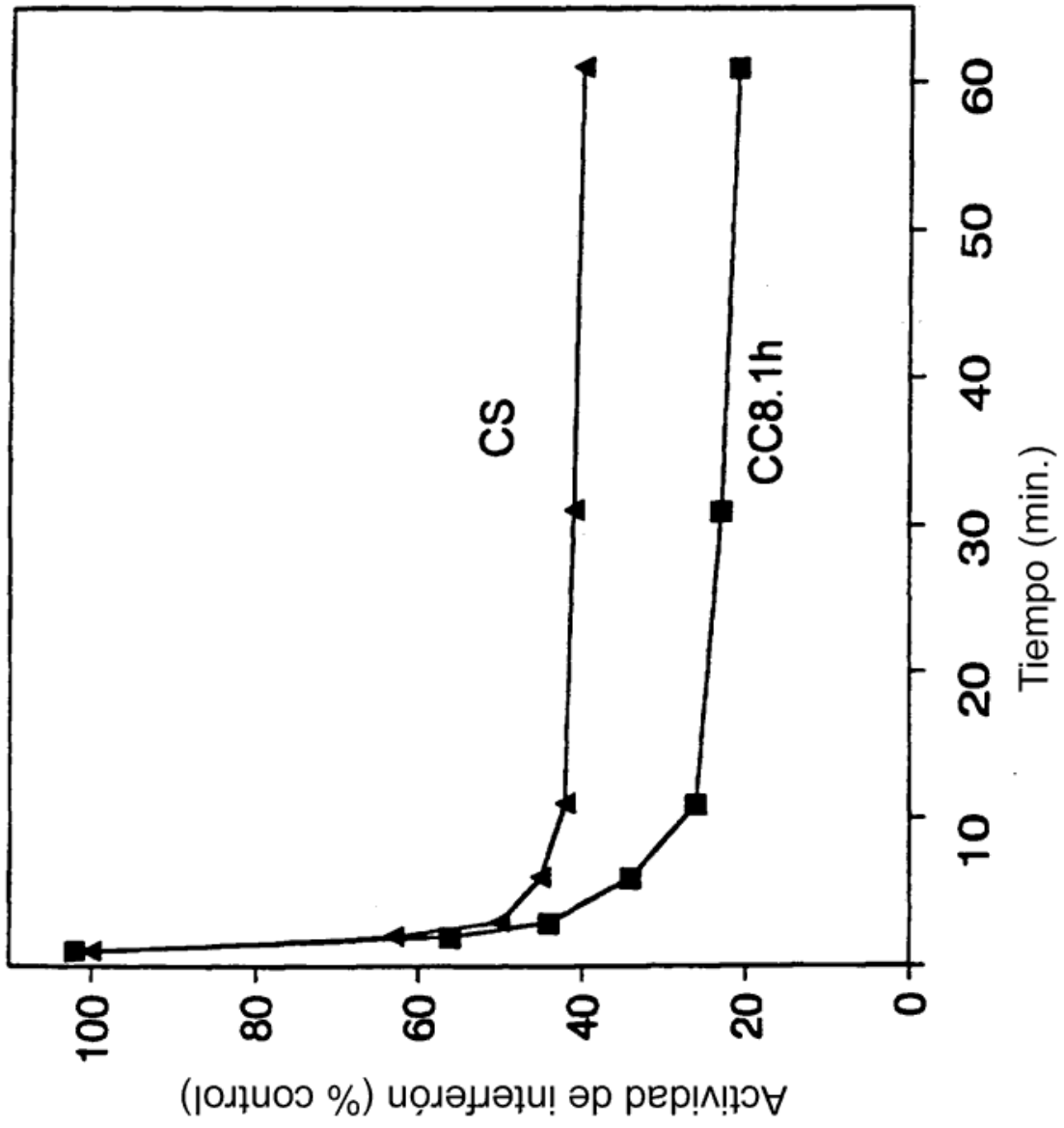
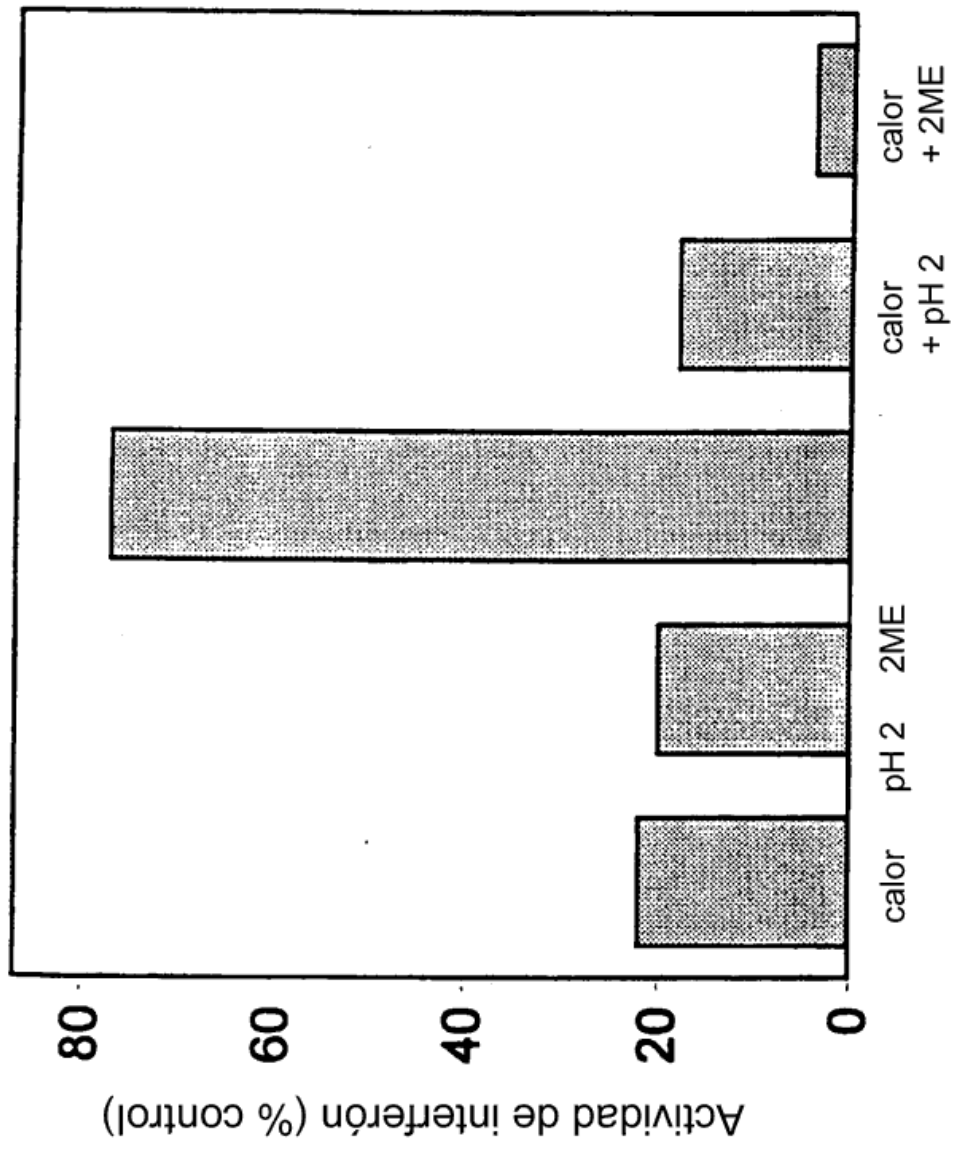


Figura 4



Tratamiento

Figura 5

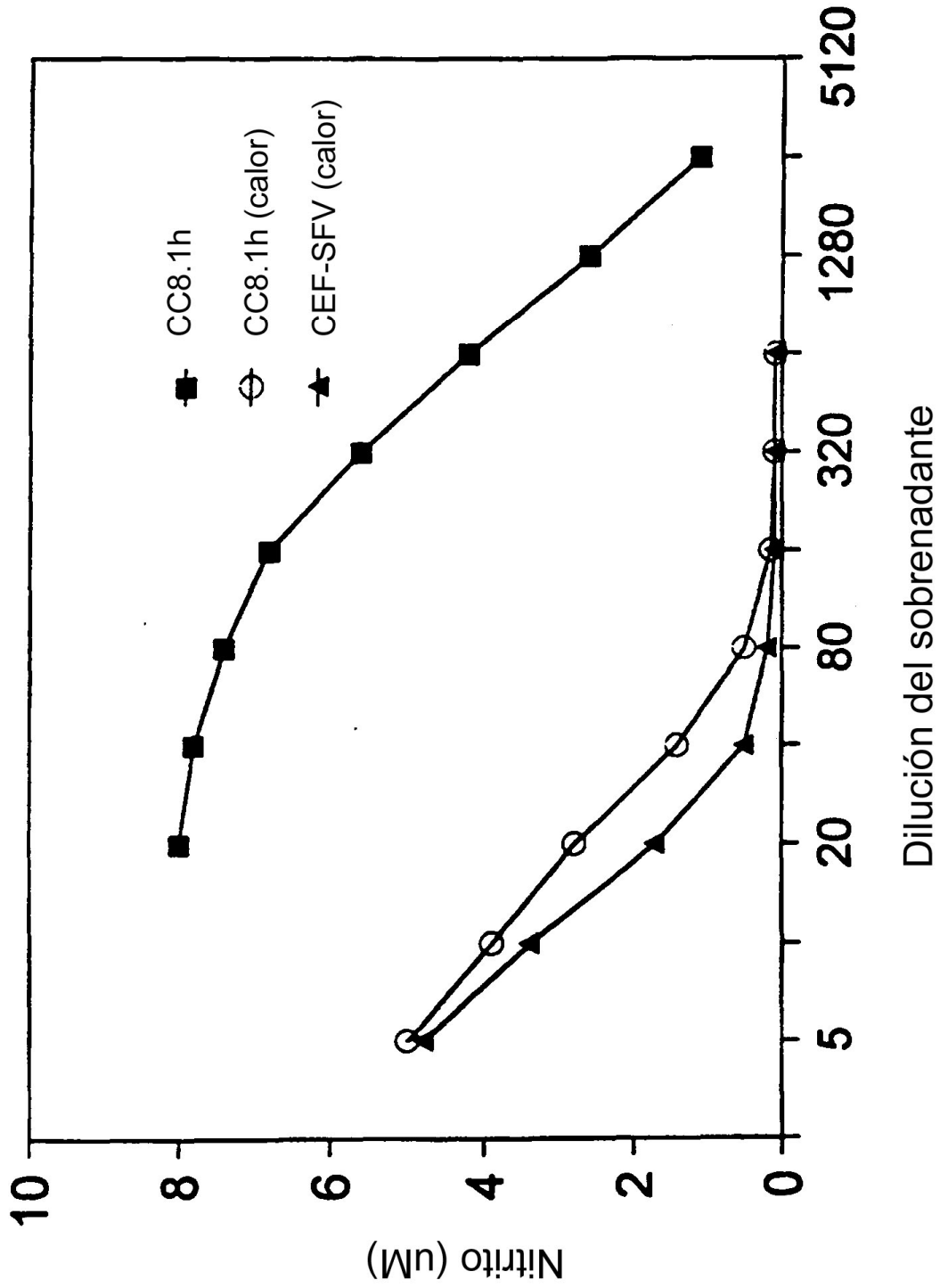


Figura 6

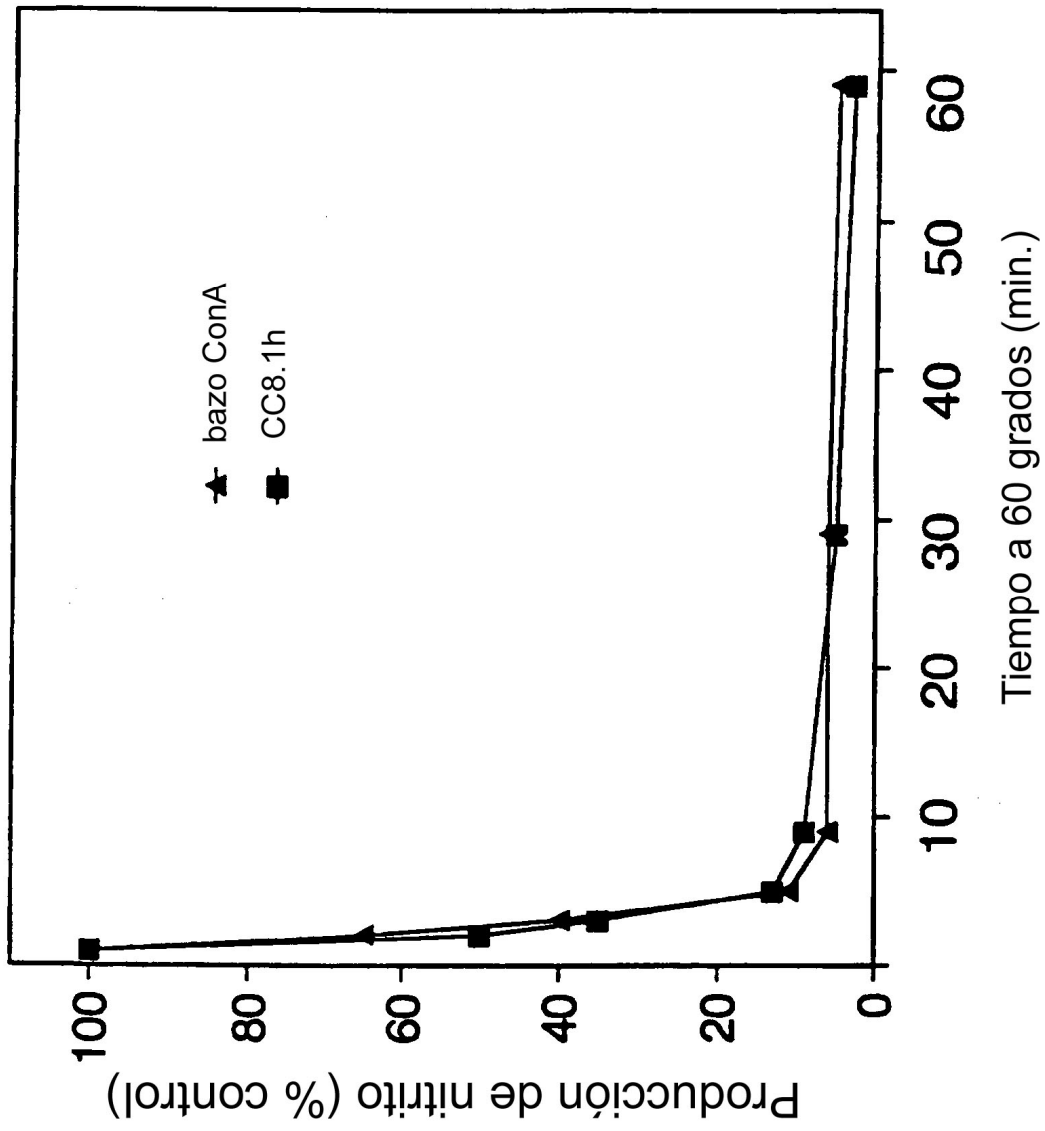


Figura 7

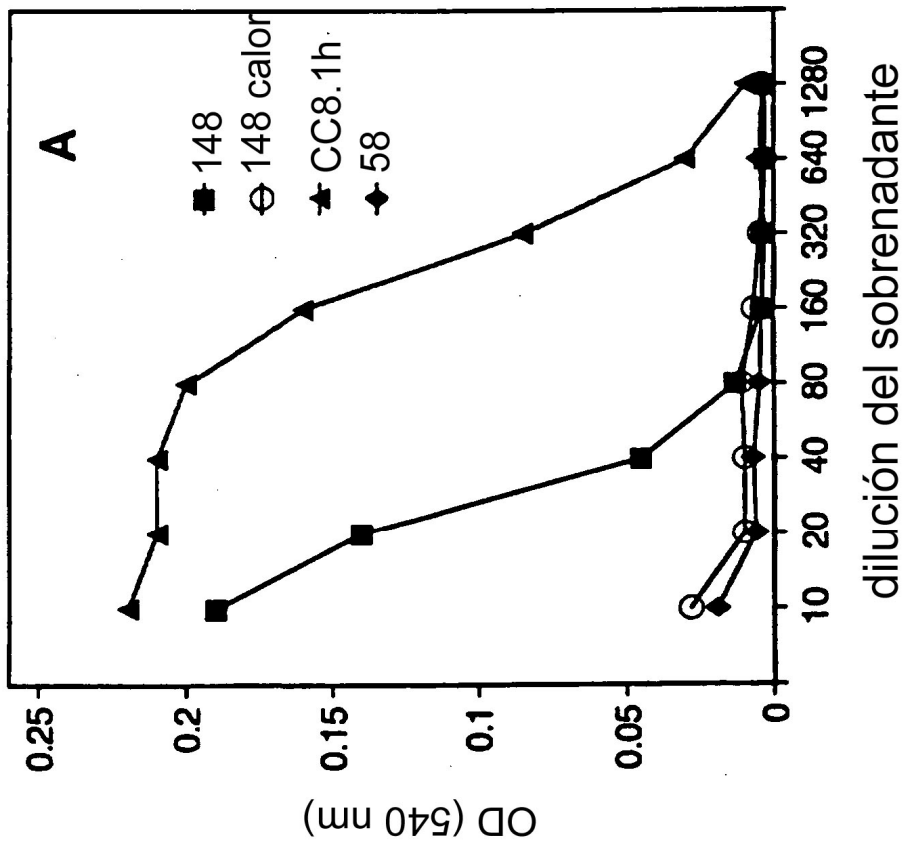
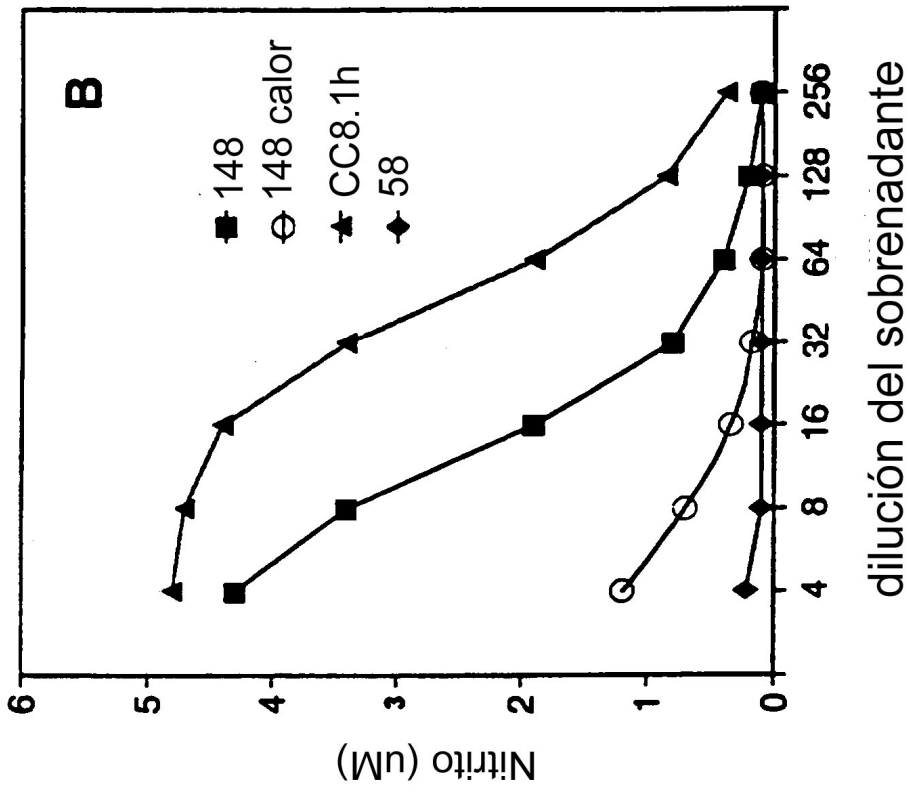


Figura 8

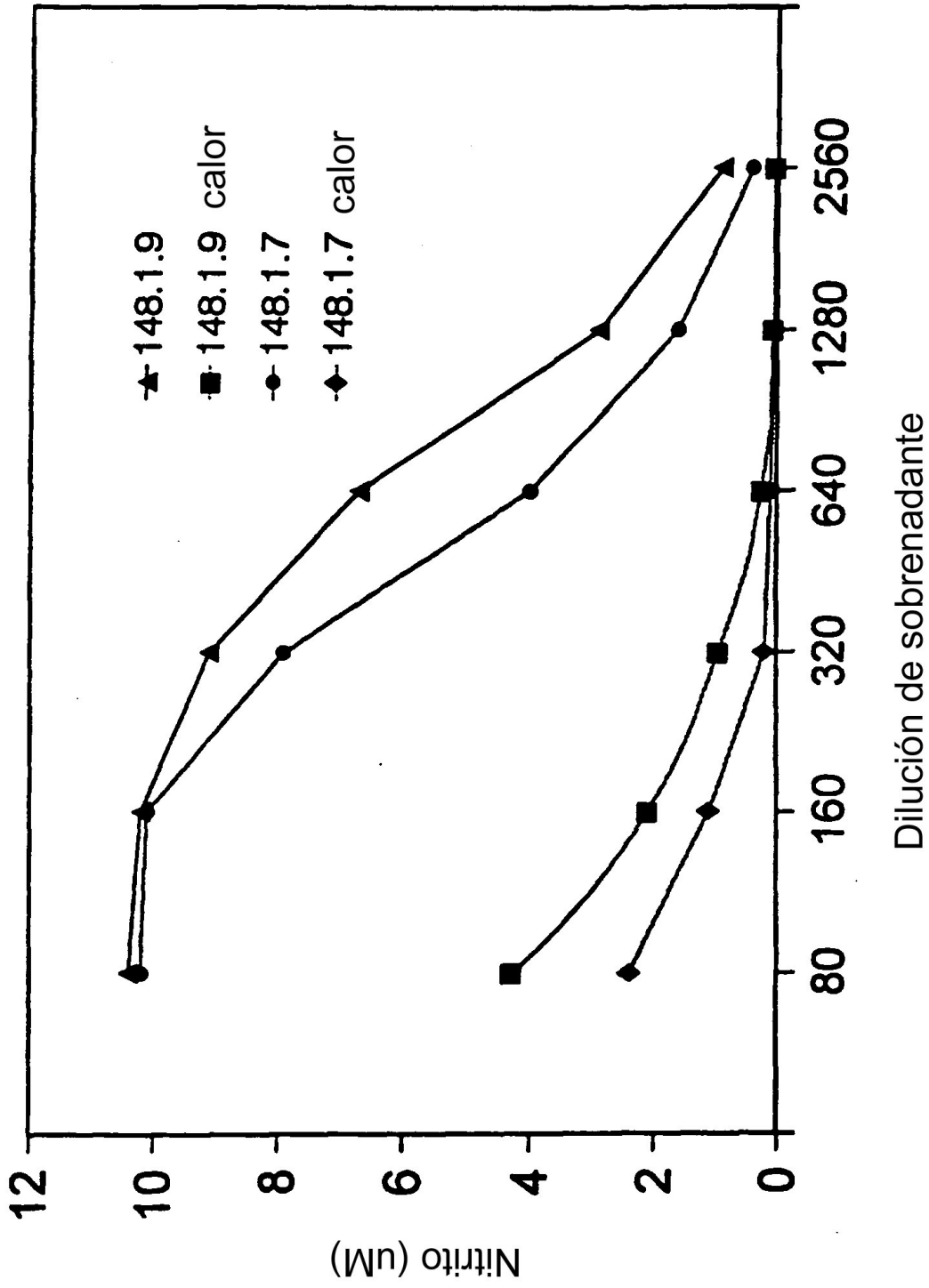
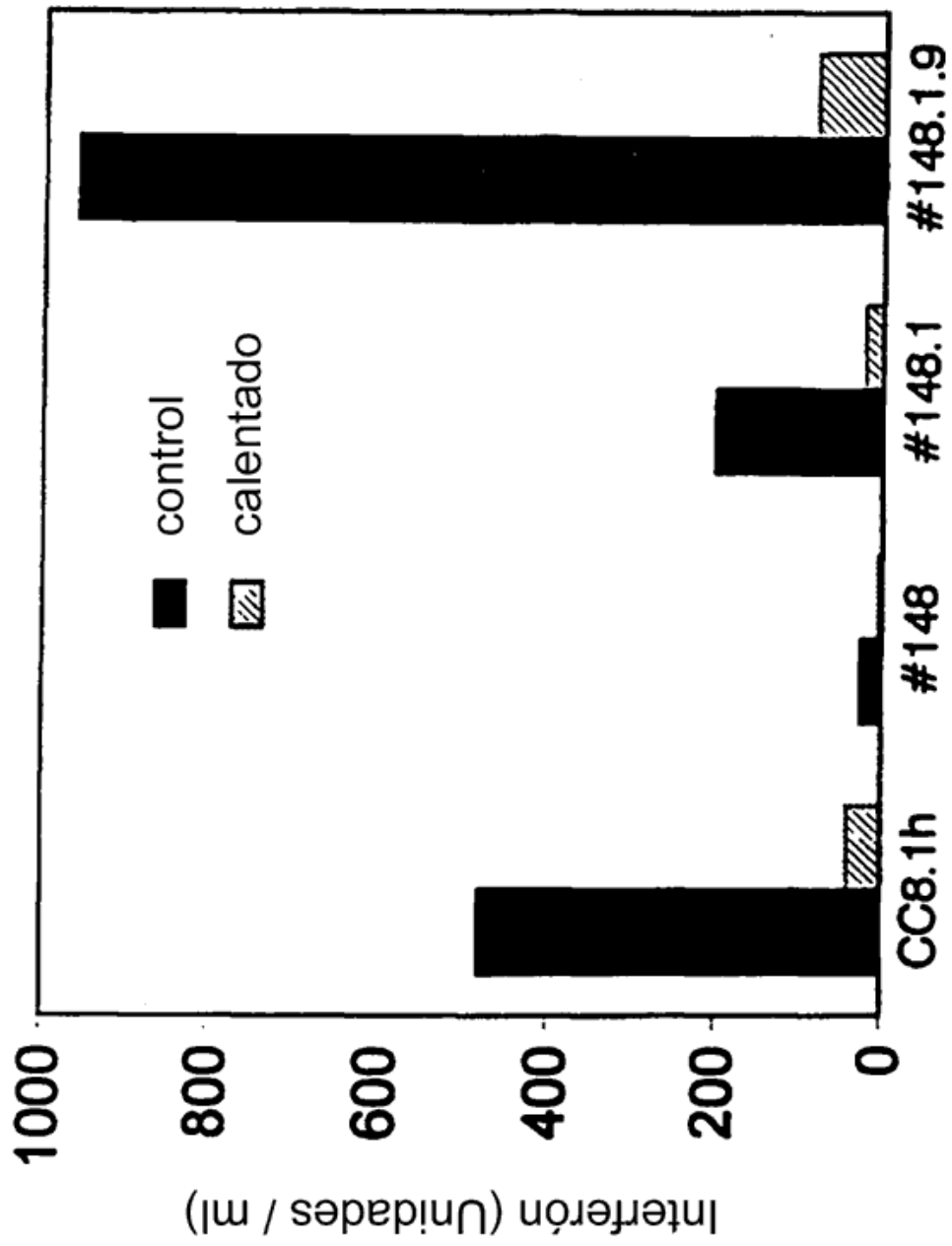


Figura 9



Sobrenadante

Figura 10

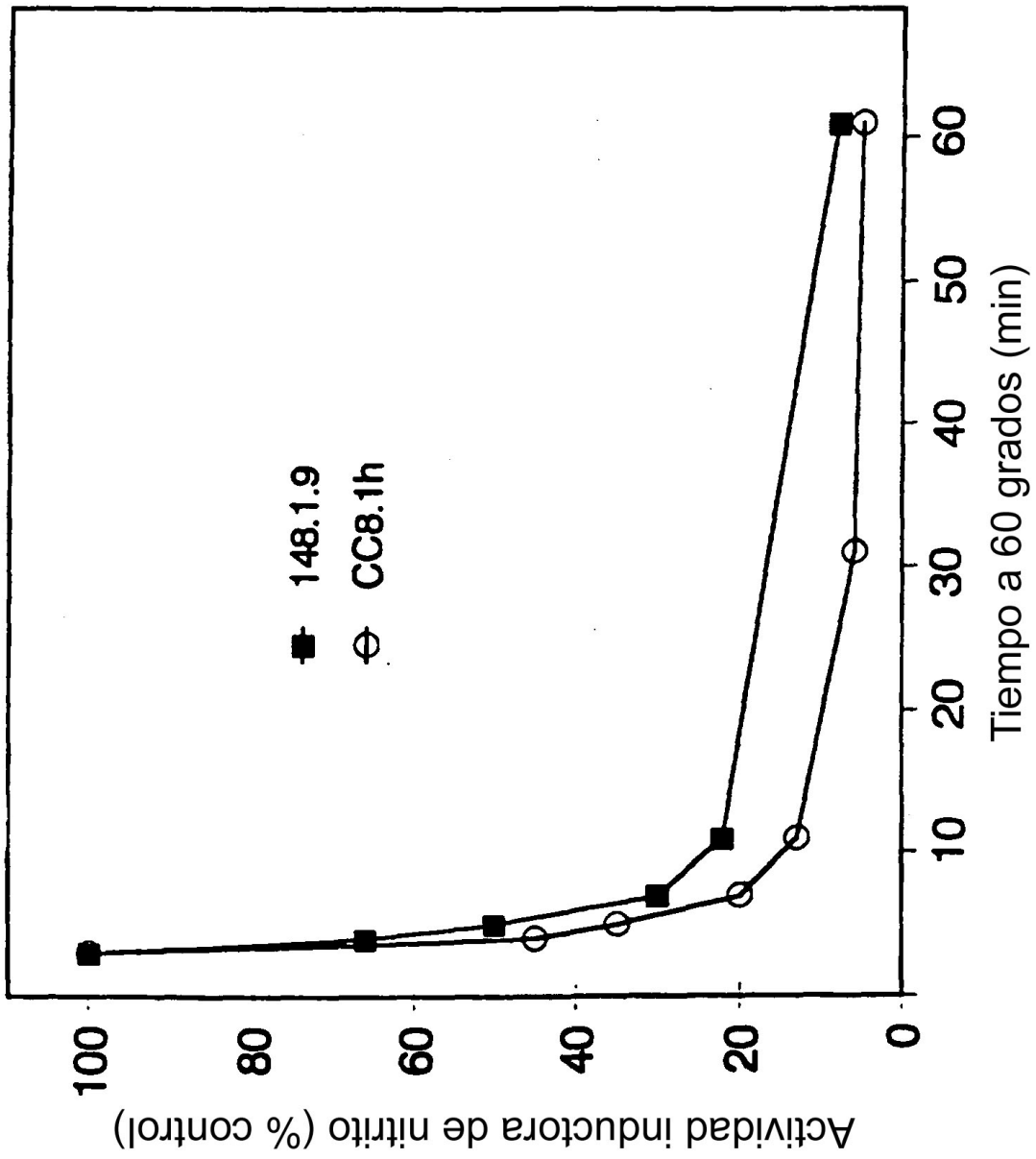


Figura 11

Figura 12	Figura 12 (cont.)
-----------	-------------------

Figura 12

5' --- -97 AGAAGACATAACTATTA
 GAAGCTGAAGCTCACTGAGCTTATATCTGACATCTCCAGAGCTATCTGAGCATTTGAACTGAGCCATCACCCAAGAAG

Met Thr Cys Gln Thr Tyr Asn Leu Phe Val Leu Ser Val Ile Met Ile Tyr Tyr Gly
 ATG ACT TGC CAG ACT TAC AAC TTG TTT GTT CTG TCT GTC ATC ATG ATT TAT TAT GGA

1 His Thr Ala Ser Ser Leu Asn Leu Val Gln Leu Gln Asp Asp Ile Asp Lys Leu Lys Ala
 CAT ACT GCA AGT AGT CTA AAT CTT GTT CAA CTT CAA GAT GAT ATA GAC AAA CTG AAA GCT 20

21 Asp Phe Asn Ser Ser His Ser Asp Val Ala Asp Gly Gly Pro Ile Ile Val Glu Lys Leu
 GAC TTT AAC TCA AGT CAT TCA GAT GTA GAT GCT GAC GGT GGA CCT ATT ATT GTA GAG AAA CTG 40

41 Lys Asn Trp Thr Glu Arg Asn Glu Lys Arg Ile Ile Leu Ser Gln Ile Val Ser Met Tyr
 AAG AAC TGG ACA GAG AGA AAT GAG AAA AGG ATC ATA CTG AGC CAG ATT GTT TCG ATG TAC 60

61 Leu Glu Met Leu Glu Asn Thr Asp Lys Ser Lys Pro His Ile Lys His Ile Ser Glu Glu
 TTG GAA ATG CTT GAA AAC ACT GAC AAG TCA AAG CCG CAC ATC AAA CAC ATA TCT GAG GAG 80

81 Leu Tyr Thr Thr Leu Lys Asn Asn Leu Pro Asp Gly Val Lys Val Lys Asp Ile Met Asp
 CTC TAT ACT CTG AAA AAC AAC CTT CCT GAT GGC GTG AAG AAG GTG AAA GAT ATC ATG GAC 100

Figura 12

```

101      110
Leu Ala Lys Leu Pro Met Asn Asp Leu Arg Ile Gln Arg Lys Ala Ala Asn Glu Leu Phe
CTG GCC AAG CTC CCG ATG AAC GAC TTG AGA ATC CAG CAG CGC AAA GCC GCG AAT GAA CTC TTC
120

121      130
Ser Ile Leu Gln Lys Leu Val Asp Pro Pro Ser Phe Lys Arg Lys Arg Ser Gln Ser Gln
AGC ATC TTA CAG AAG CTG GTG GAT CCT CCG AGT TTC AAA AGG AAA AGG AGC CAG TCT CAG
140

141      145
Arg Arg Cys Asn Cys      ***
AGG AGA TGC AAT TGC 492 TAATGGCACTCTTATGACCTCCCTGTGCTCAACTATTTTAAATTTTACAATGCACAA

TTTTTATGTTGTGATTTTTTAACTGAGTTTATATACATTTATTATTAATTTAAGTATTTTAAATAATTATTATAT
TAAATAAAACCAGGCAACAATGAAAGTATTTATACCTCCTACTGCTGTGTAAGAAACGGATTGTGGCTTTAAATAAC
TGTCTATCTGTTGTGGGTTGACTGAAAATACCGAATGAGGTGGATGTTTACCAGTTTCTGTGTGGAAATACTGA
ATTGGAGGTGGATCTGTACTCAAGAAAACCCACTCATCCCGGTGAGTCTAGTATTTCTAAATCCAATCAAGGAGTGGC
TTGTTTAAAGGGAAAATAATGTGAGCACTCTCTGACTGGGCTTTAGAGATTTTACTGATGGTTTGGCATGACTAAGAATT
TAGG 943 ---3'

```

Figura 12 (CONT)

Figura 13	Figura 13 (Cont.)
-----------	-------------------

Figura 13

aviar	IMDLAKLPMNDLRIQRKAANELFSILQKLVDPSPF-KRKRSSQ---RRCNC
bovino	FKKLIQIPVDDLQIQRKAINELIKVMNDLSPKSNLKRKRSSQNLEFRGRRAST
primate no humano	FERLTNYSVNDLVQRKAIHELIOVMAELSPAPKIGKRRRSQTLEFRGRRASQ
primate no humano	FKKLIQISVDDMQIQRKAINELIKVMNDLSPKSNLIRKRRSQNLEFRGRRASM
canino	FLKLIQIPVNDLQVQRKAINELIKVMNDLSPRSNLRKRKRSSQNLEFRGRRASK
humano	FEKLTNYSVTDLVQRKAIHELIOVMAELSPAAKTGKRKRSSQMLFQGRRASQ
murino	FMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLKRKRRC-----
porcino	FEKLIKIPVDNLQIQRKAISELIKVMNDLSPRSNLRKRKRSSQTMFQGQRASK
rata	FMSIAKFEVNNPQIQHKAVNELIRVIHQLSPESSLRKRRC-----
ovino	EKRLIQIPVDDLQIQRKAINELIKVMNDLSPKSNLKRKRSSQNLEFRGRRASM
equino	FQKLIQIPVNDLKVQRKAISELIKVMNDLSPKANLKRKRSSQNLEFRGRRALQ
 * . . . * * * * *

Figura 13 (CONT)

Humano	MKYTSYILAFQLCIVLGS LG----CYCQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGIL
Aviar	MTCQTYNL-FVLSVIMIIYYGHTASSLNLVQLQDDIDK LKADFNSSHSDVADGGPIIVEKL * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Humano	KNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNV--KFFNSNKKKRDD
Aviar	KNWTERNEKRIILSQIVSMYLEMLEN---T DKSKPHIKHISEELYTLKNNLPDGVKKVKD * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Humano	FEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRRRASQ
Aviar	IMDLAKLPMNDLRIQRKAANELEFSILQKLVDP PSF-KRKRSSQ---RRCNC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Figura 14

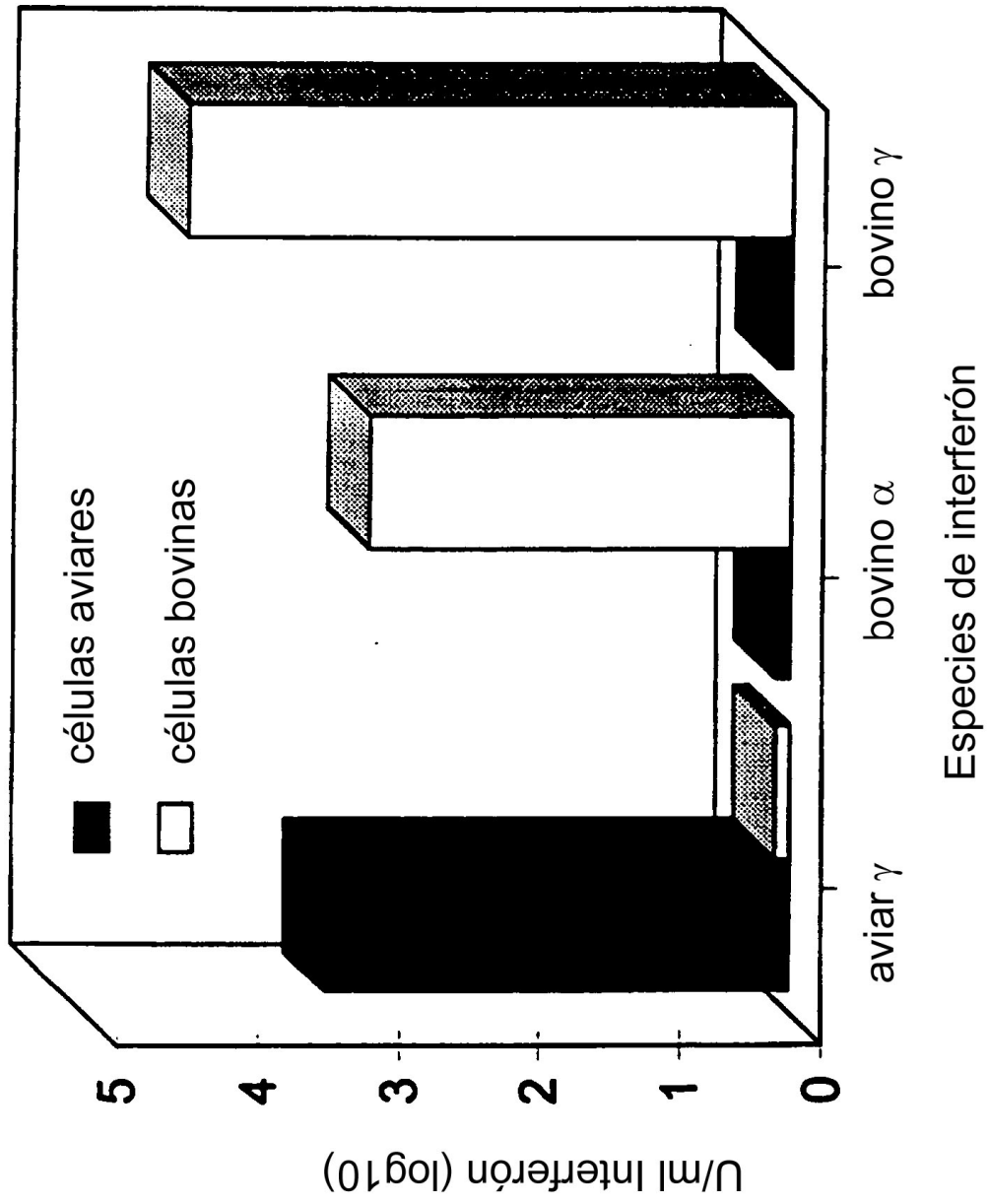
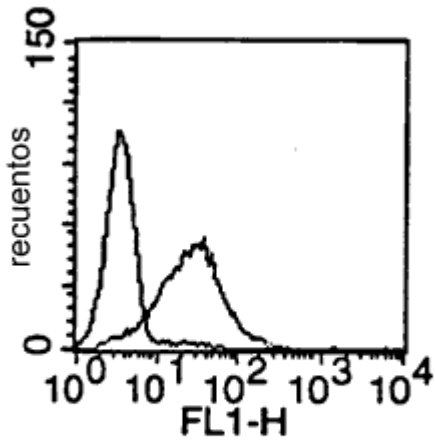
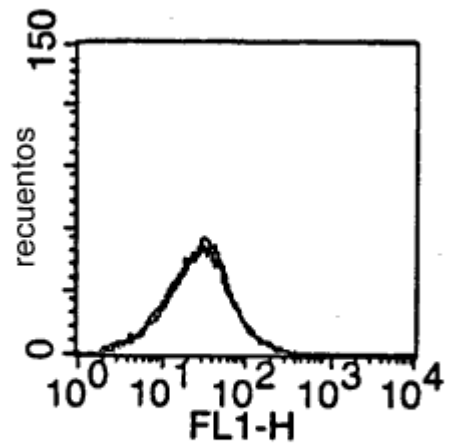


Figura 16

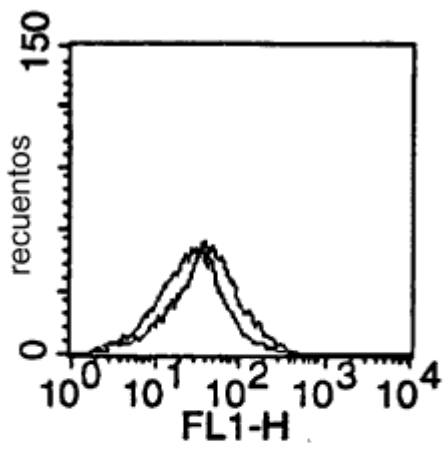
A. Medio



B. LPS



C. IFN Nativo



D. IFN recombinante

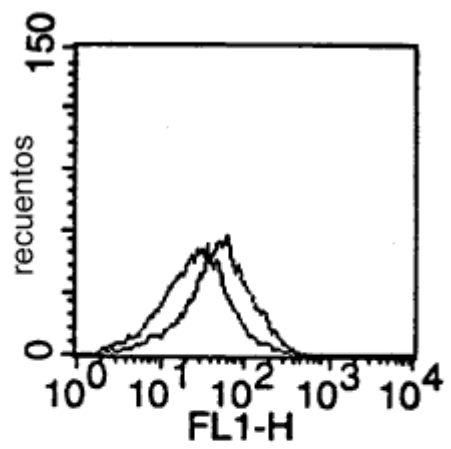
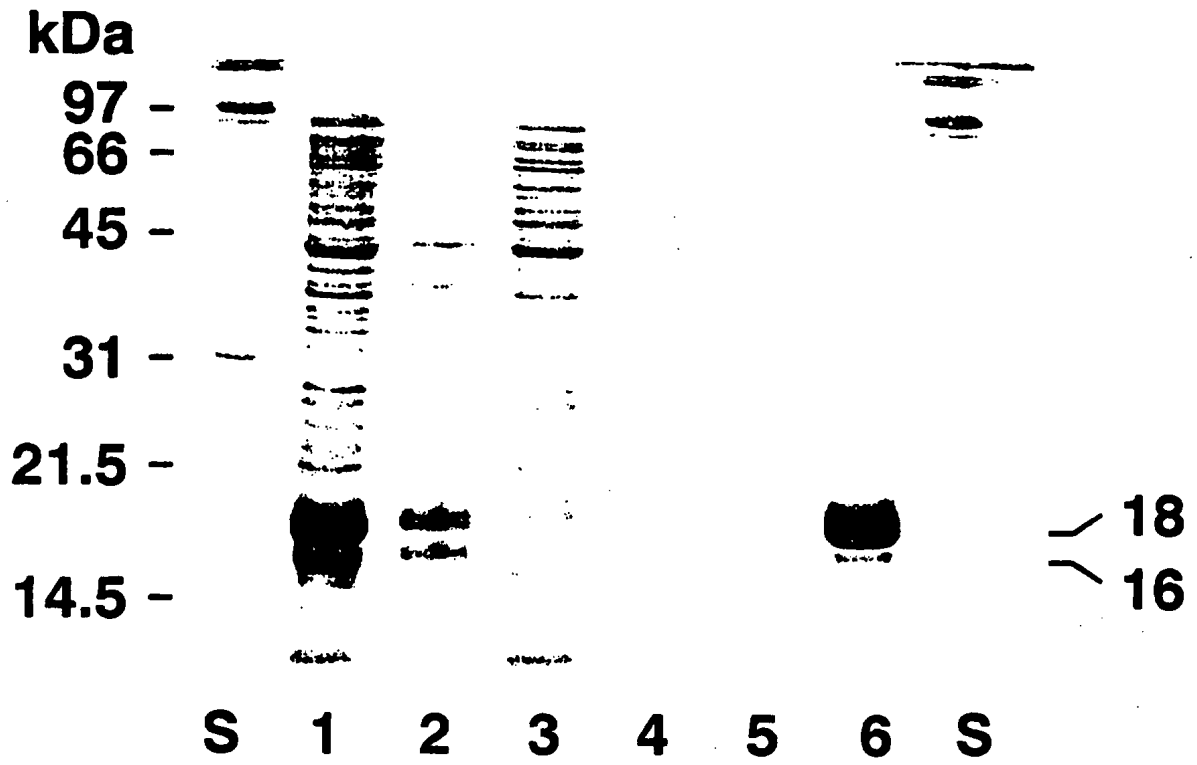
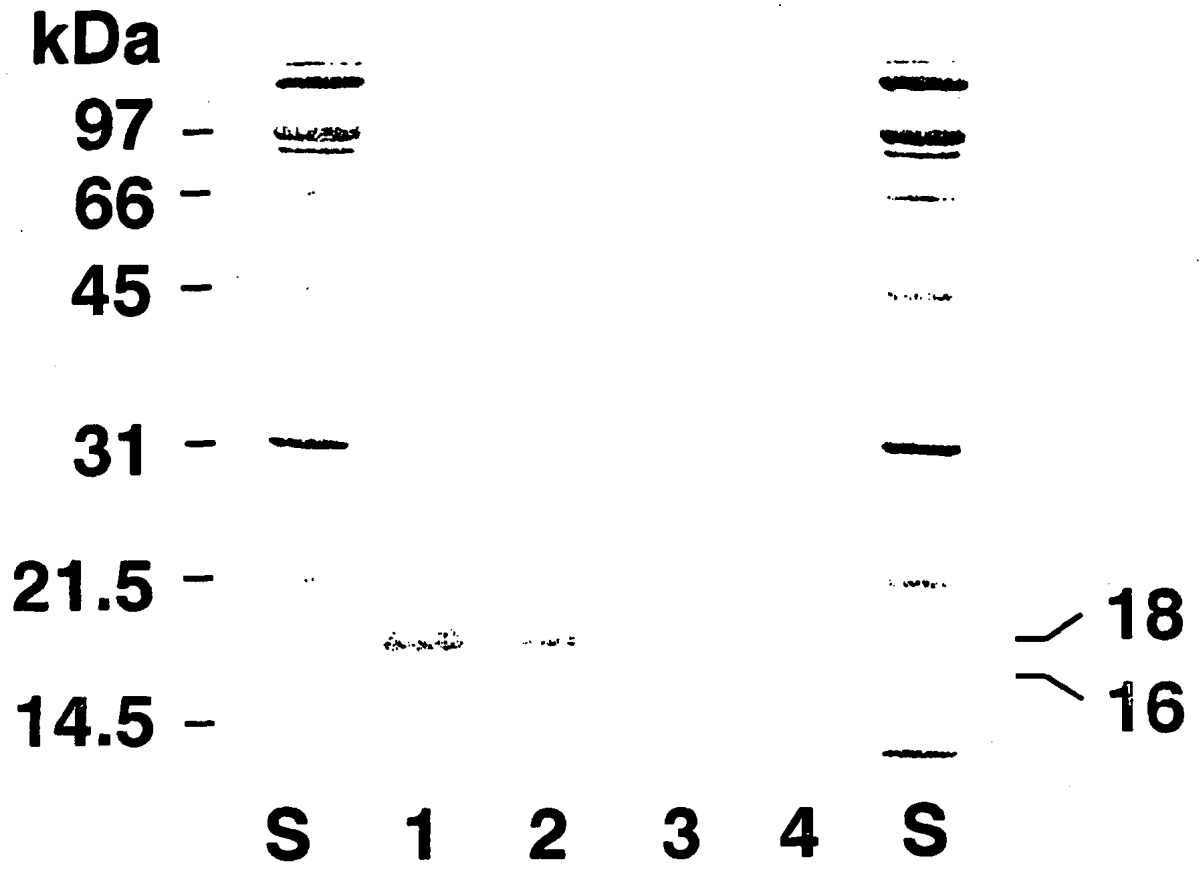


Figura 17





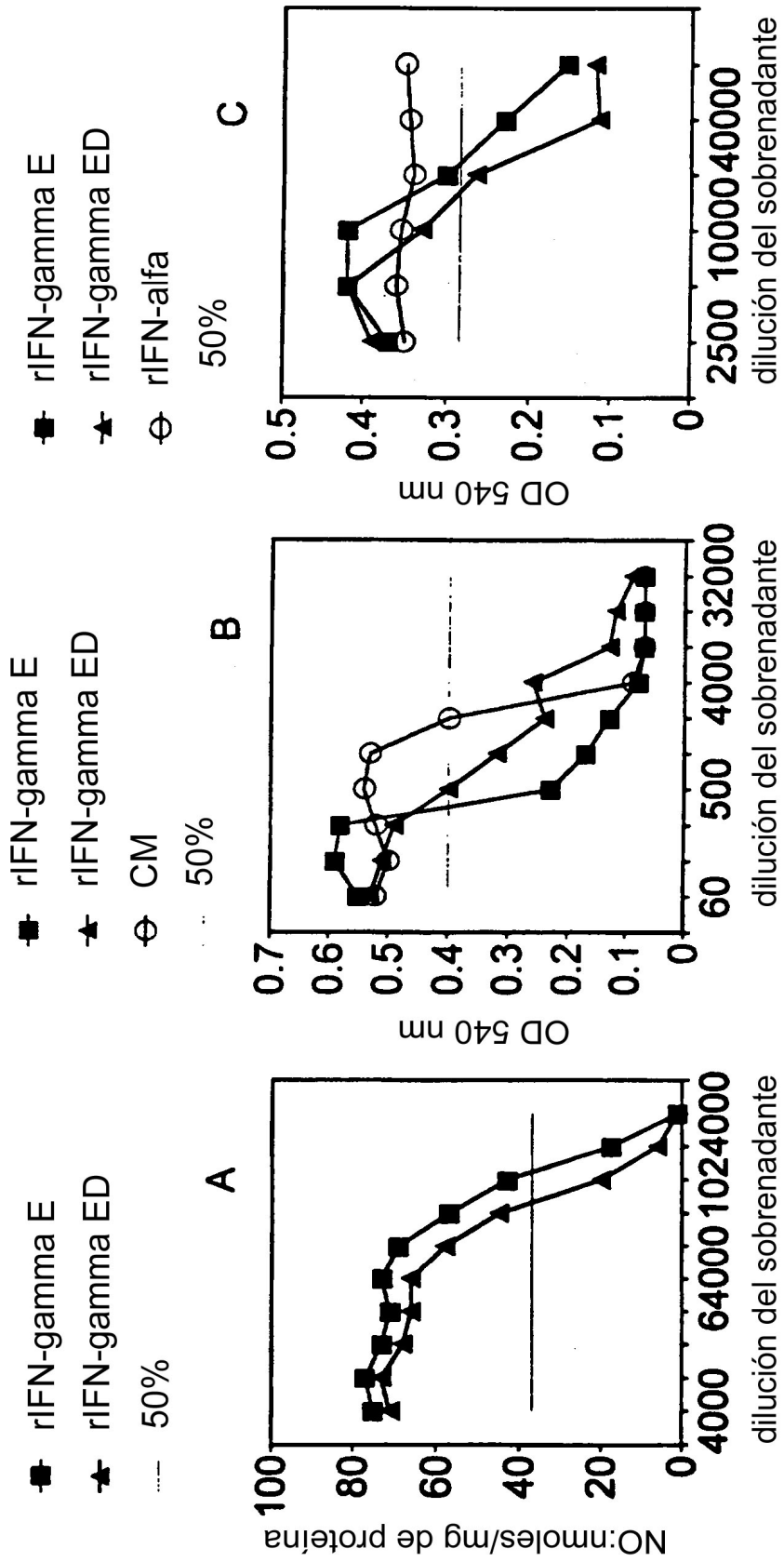


Figura 19

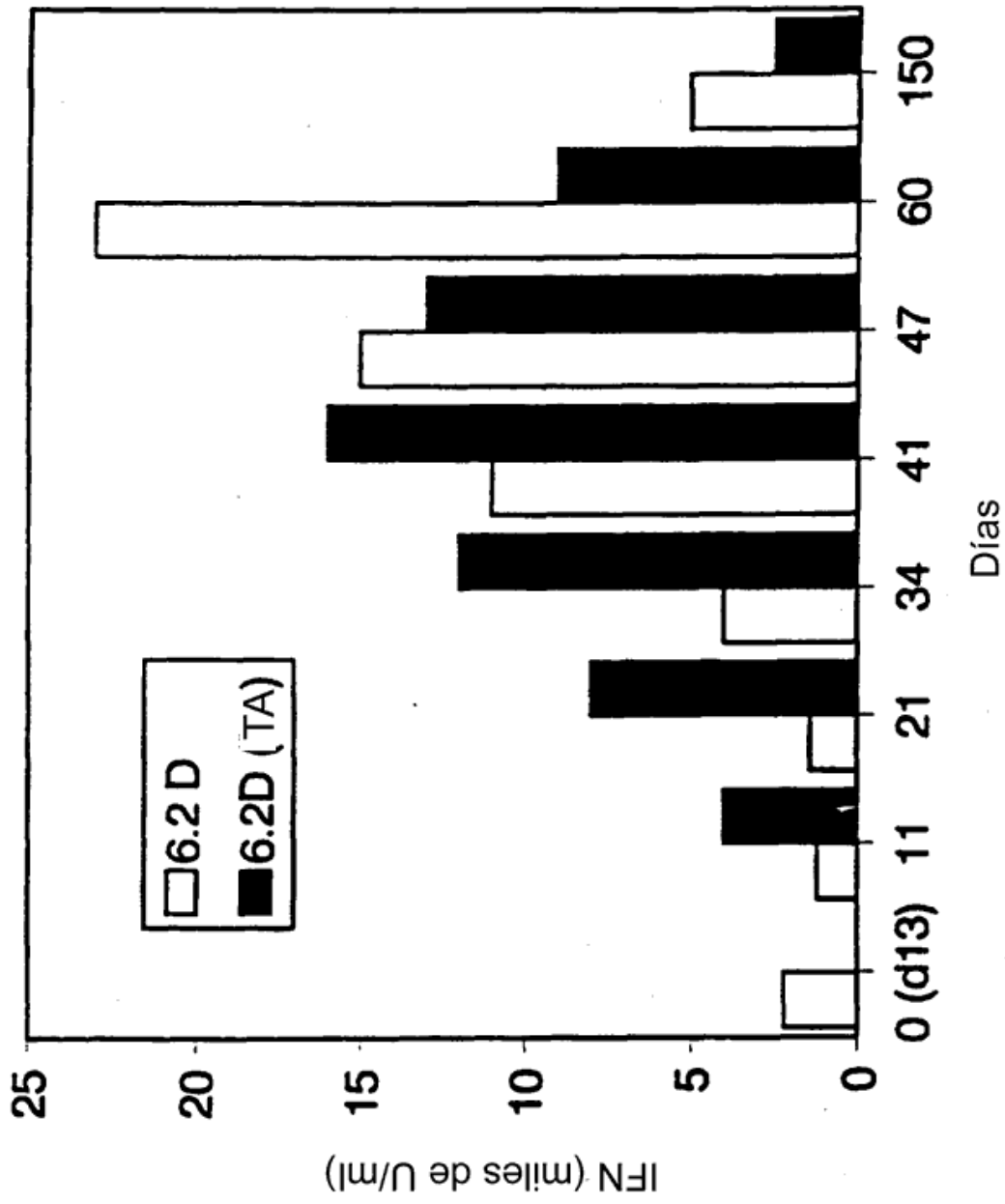


Figura 20

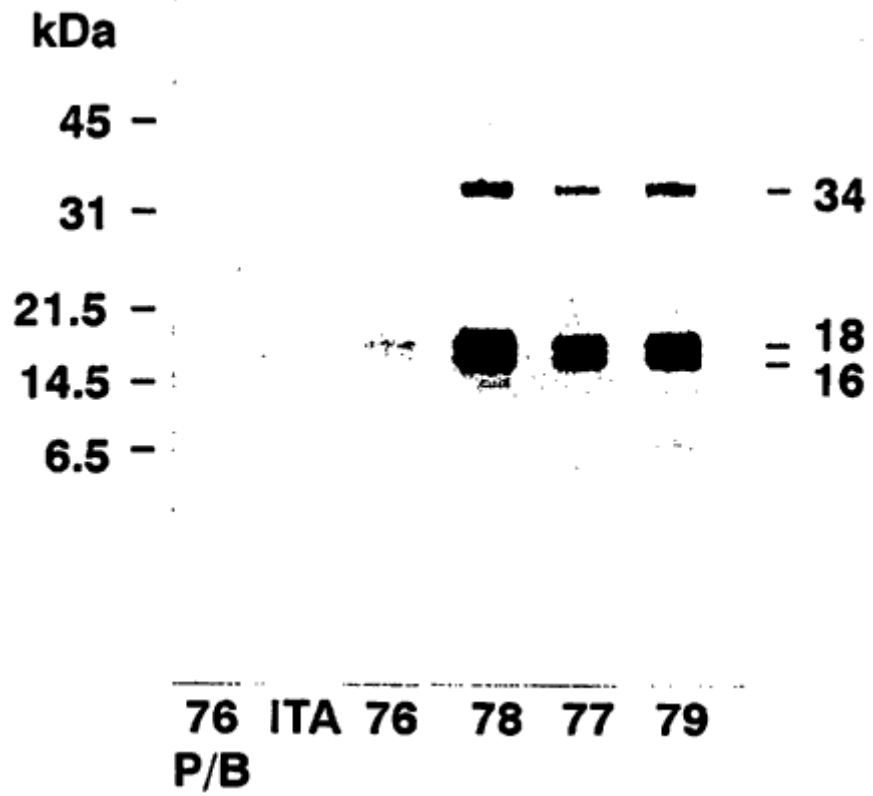


Figura 21

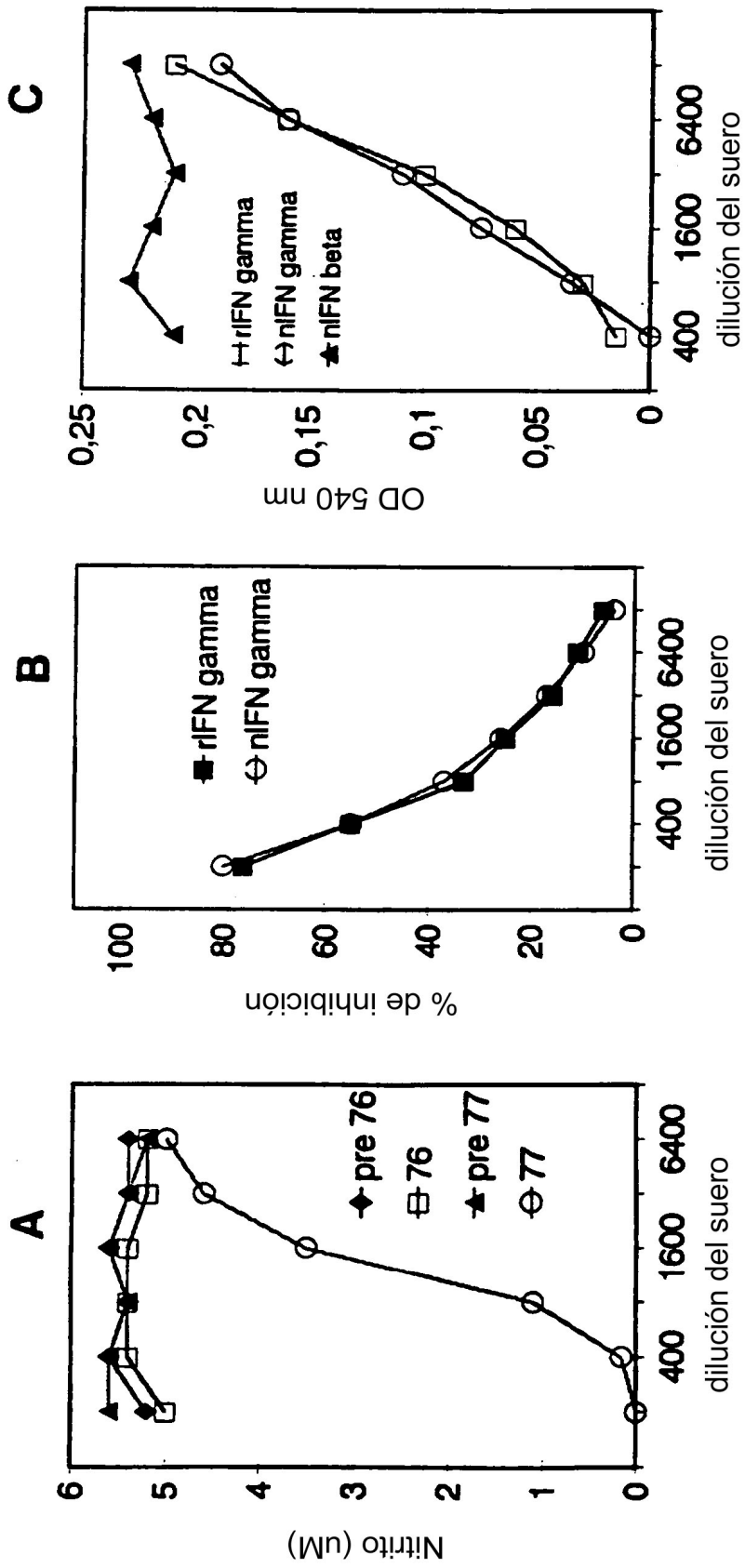


Figura 22

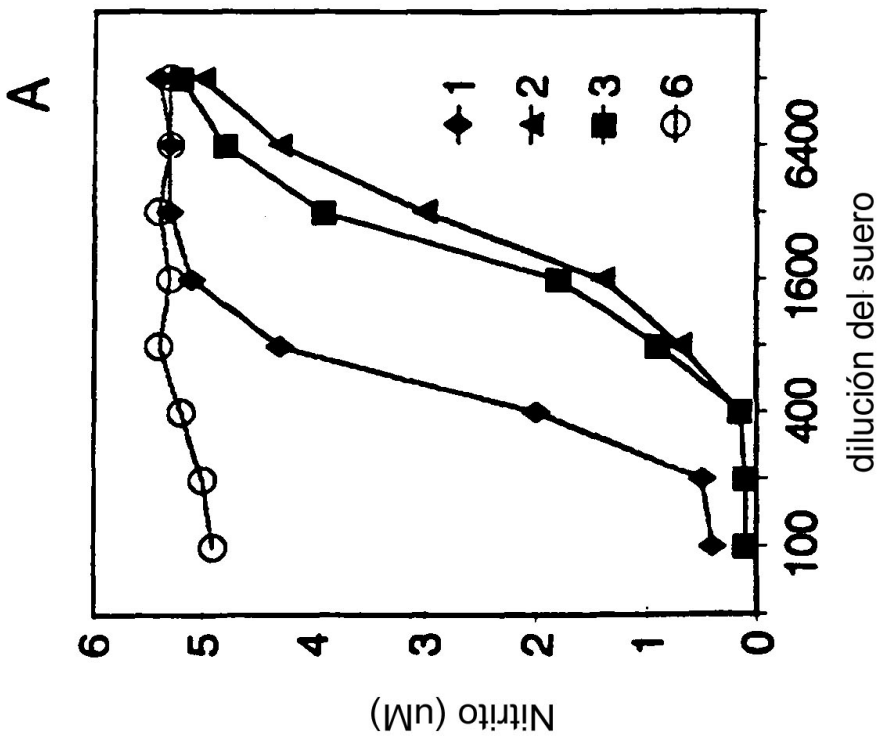
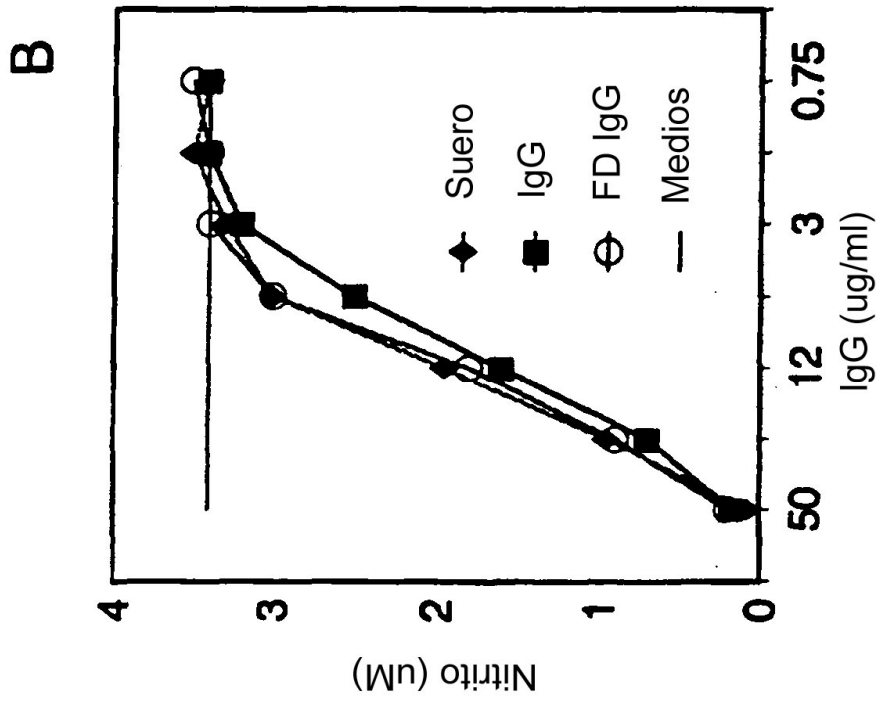
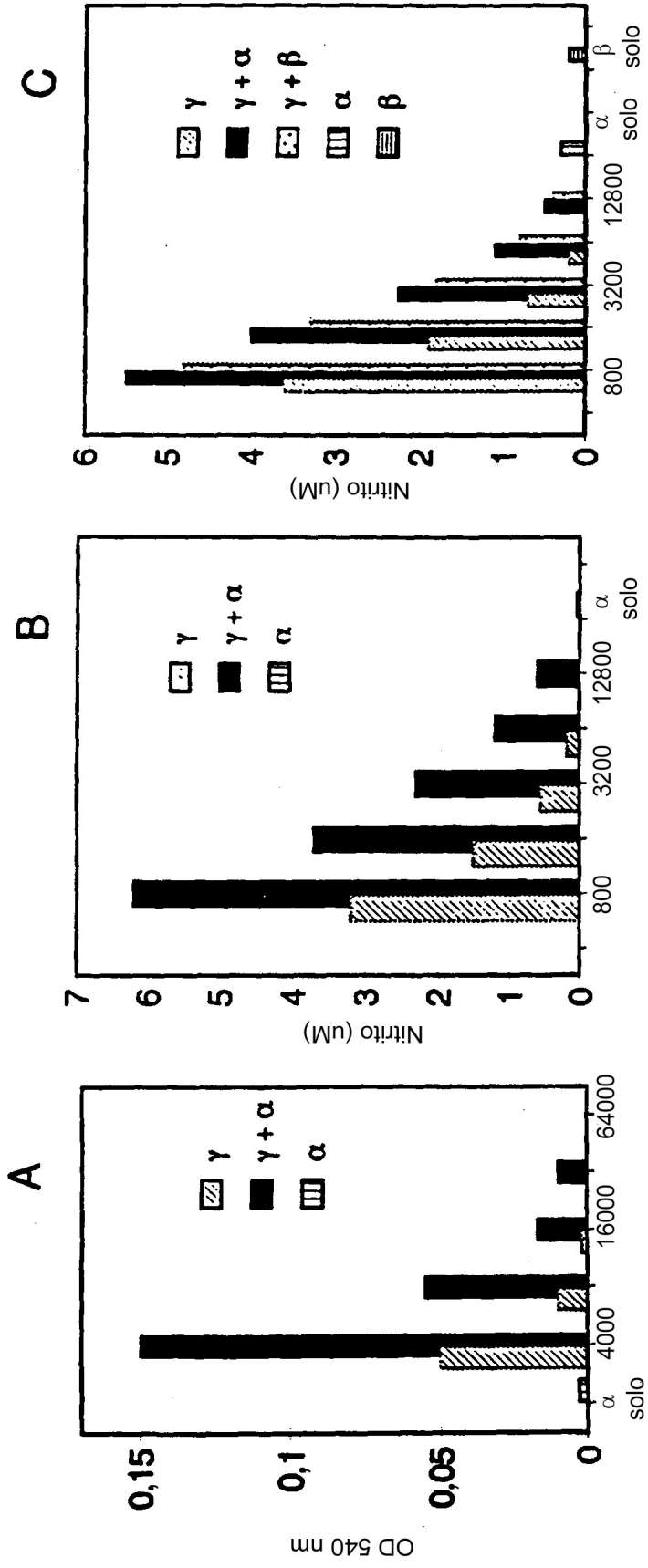
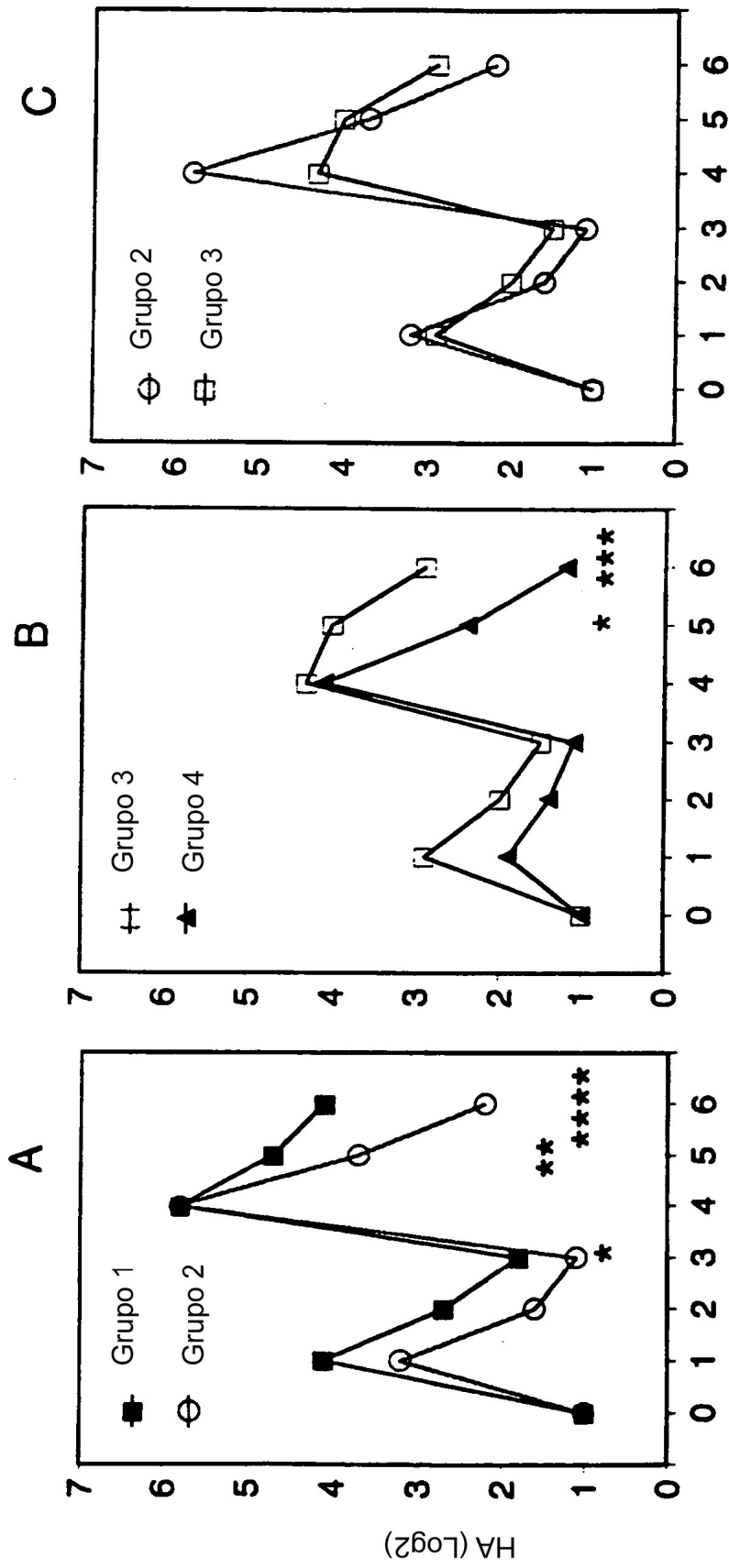


Figura 23



Dilución

Figura 24



Semanas tras la inmunización

Figura 25C

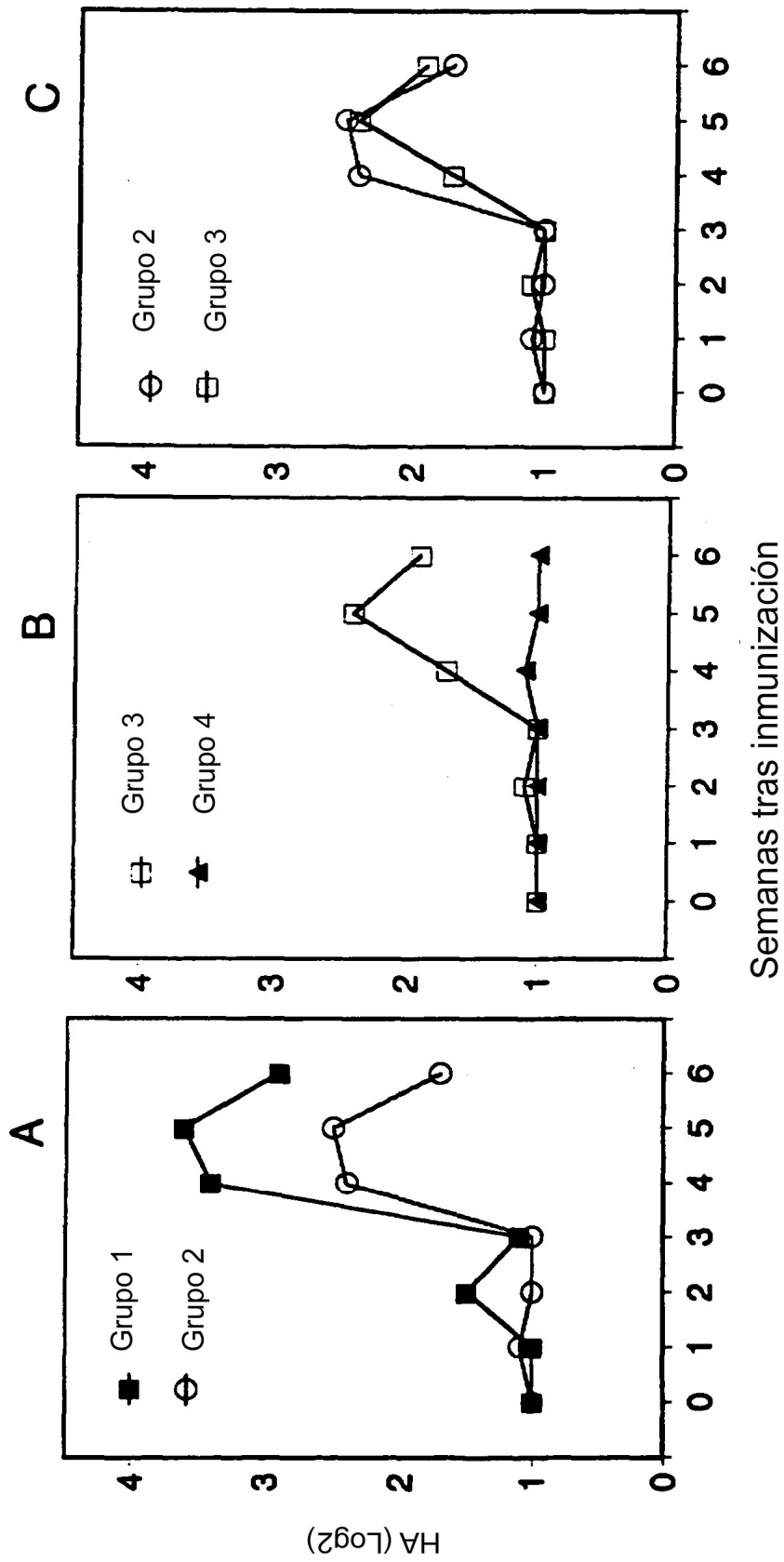


Figura 25D

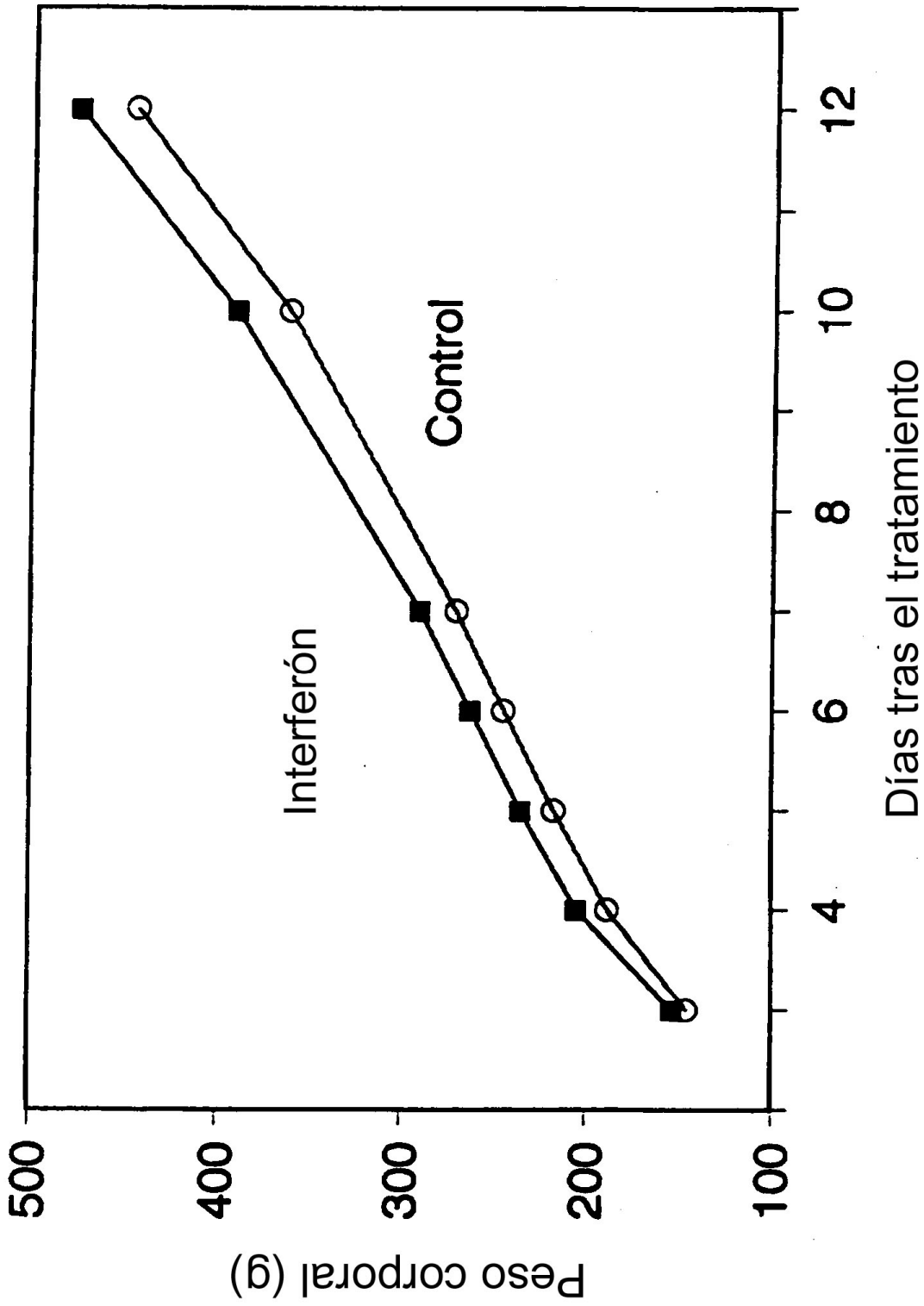


Figura 26

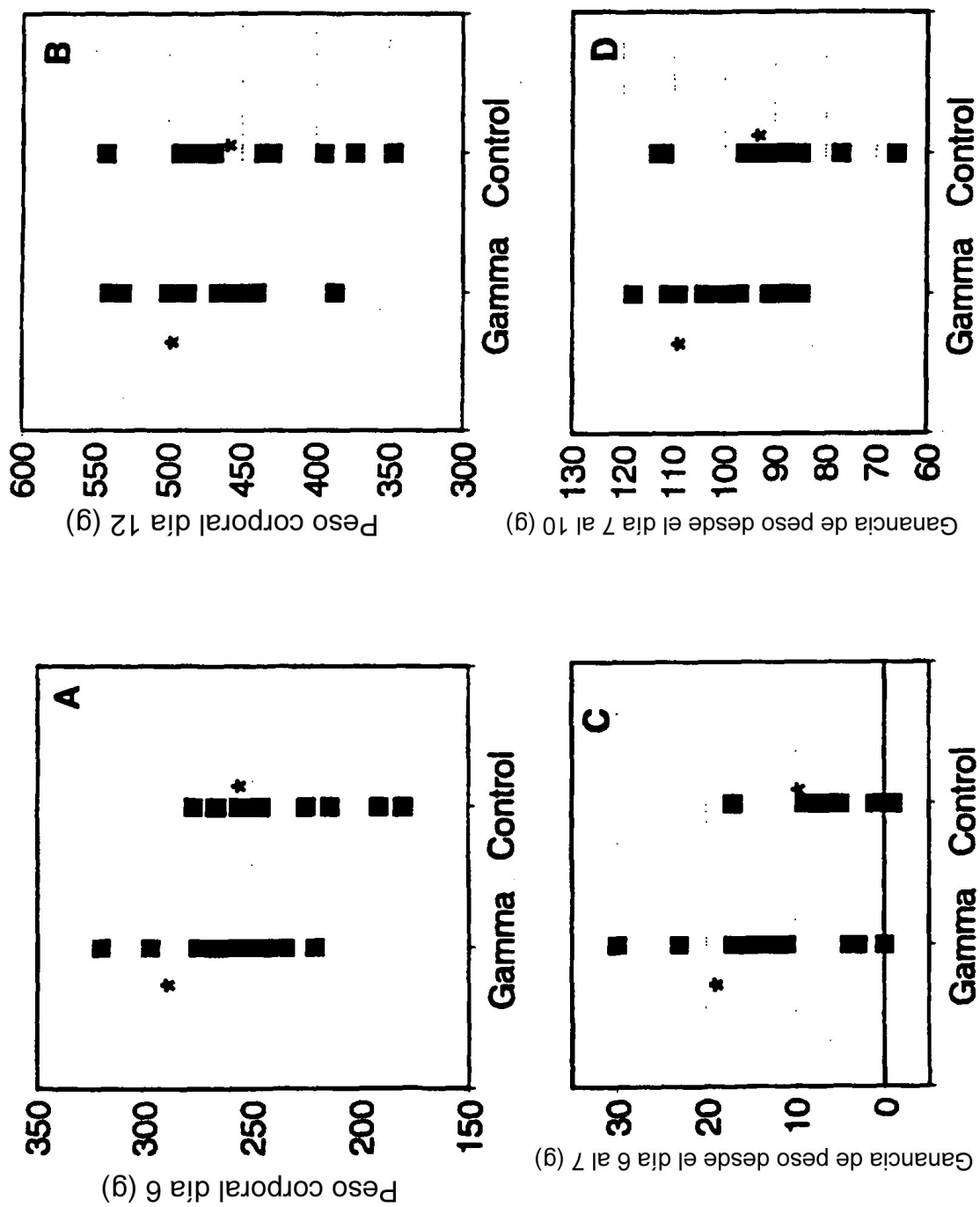


Figura 27

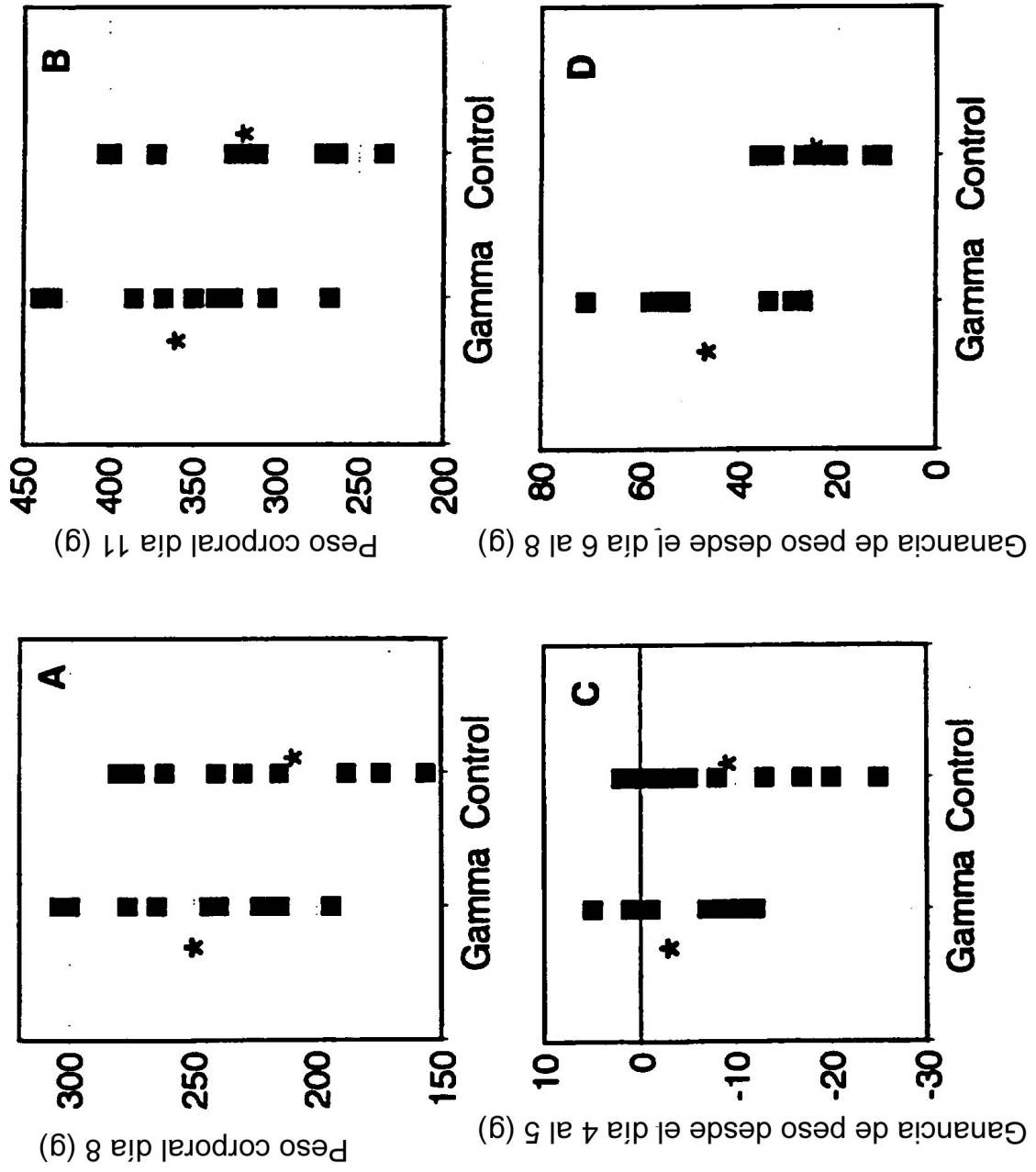


Figura 28

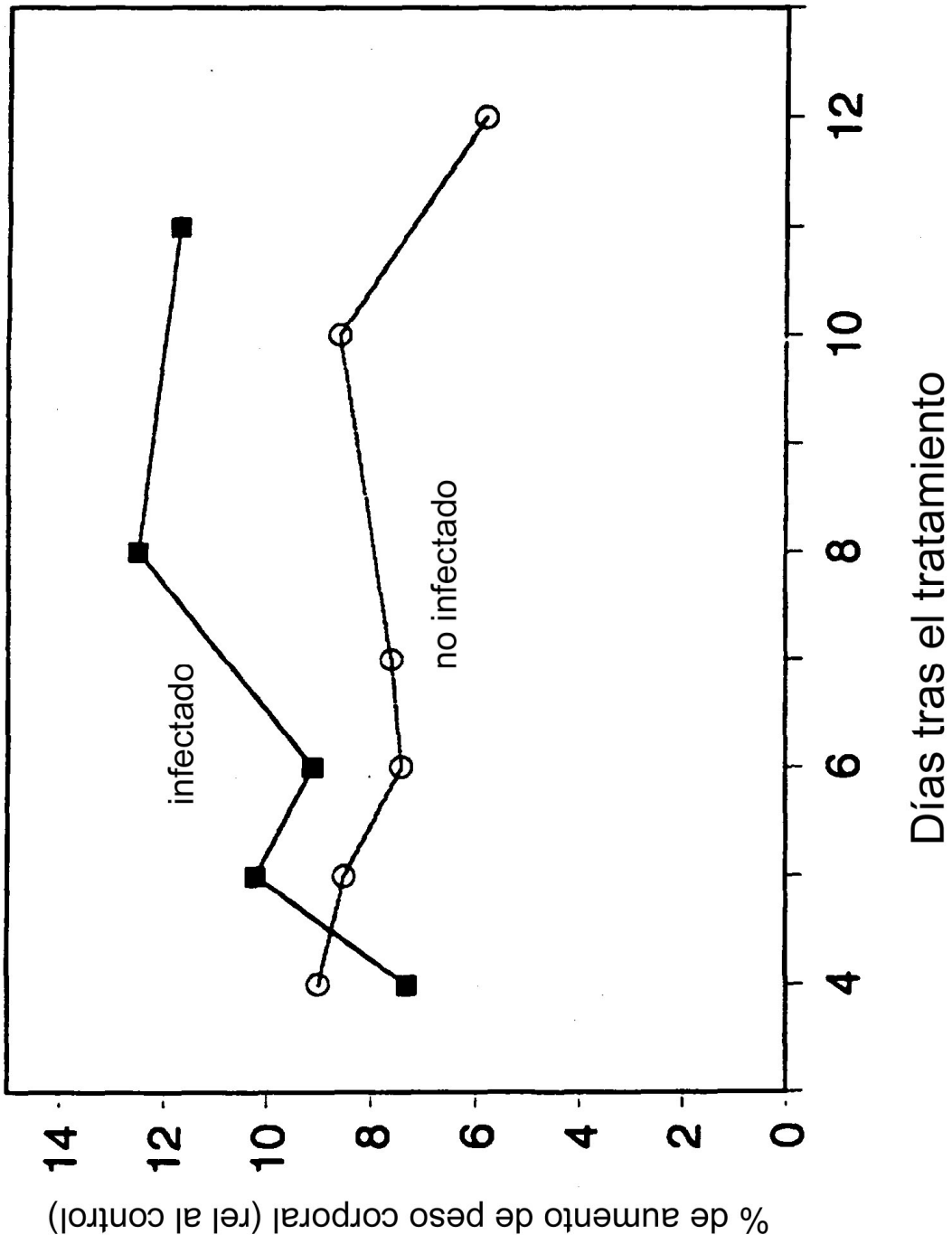
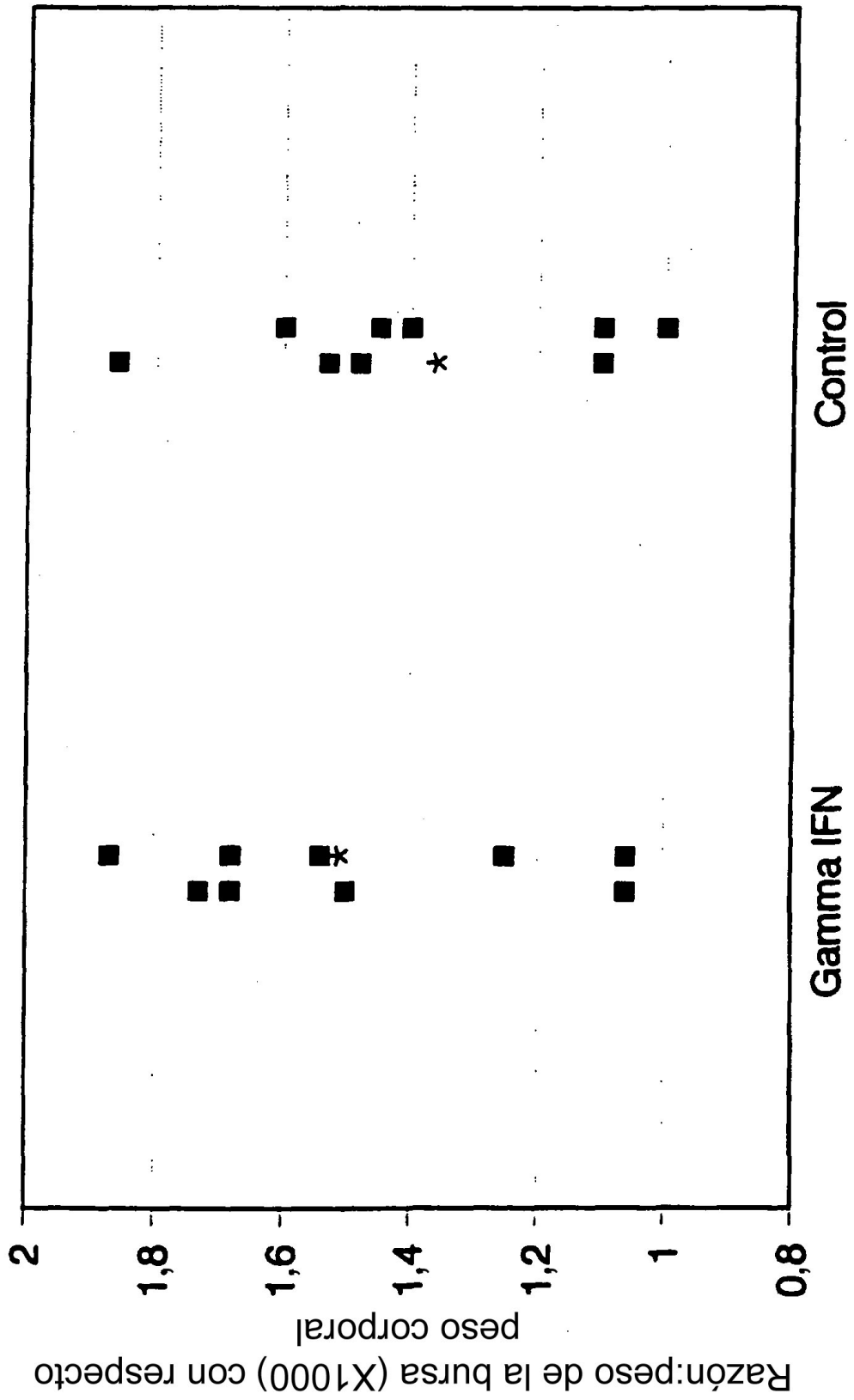


Figura 29



Tratamiento

Figura 30

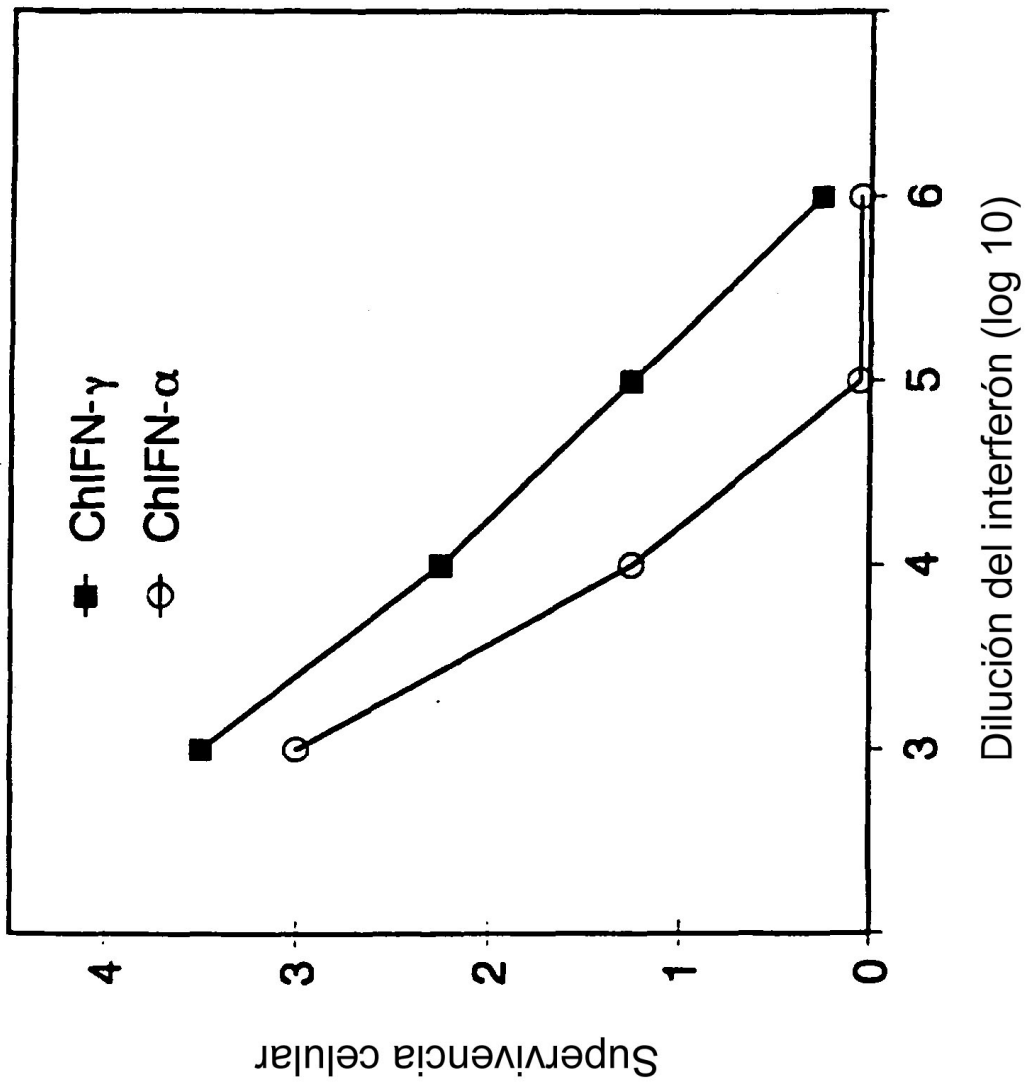


Figura 31