

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 197**

51 Int. Cl.:
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
A61K 35/02 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/736 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07760915 .4**
96 Fecha de presentación: **19.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2019680**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2009**

54 Título: **AUMENTO DE TÍTULO PARA VACUNACIÓN EN ANIMALES.**

30 Prioridad:
26.04.2006 US 380359

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2011

73 Titular/es:
OMNIGEN RESEARCH, LLC
1156 SOUTH PINE STREET
CANBY OR 97013, US

72 Inventor/es:
FORSBERG, Neil, Elliott y
PUNTENNEY, Steven, Bruce

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 371 197 T3

DESCRIPCIÓN

Aumento de título para vacunación en animales.

5 Campo técnico

El invento se refiere a combinaciones de una composición y una vacuna que aumentan el título de anticuerpos hacia la vacuna, y a métodos para usar la combinación.

10 Fundamento

La respuesta inmune atañe a dos sistemas distintos: el sistema innato y el sistema adquirido (mediado por anticuerpos). El sistema innato es un sistema evolutivamente antiguo que utiliza una diversidad de estrategias para prevenir una infección. Éstas incluyen las barreras de células epiteliales proporcionadas por la piel, el tracto gastrointestinal y los revestimientos del pulmón y la glándula mamaria. Además, el sistema innato incluye la barrera ácida del estómago (o abomaso en los animales rumiantes) y las enzimas digestivas del estómago, el páncreas y el intestino delgado. Finalmente, el sistema innato incluye los glóbulos blancos, los macrófagos y los neutrófilos. Estas células reconocen primero patógenos a través de la presentación de marcadores únicos en la superficie de los patógenos y luego fagocitan y matan a los patógenos.

El sistema innato proporciona la respuesta inmune inicial y proporciona el tiempo requerido para que el sistema de anticuerpos adquirido responda y desarrolle los anticuerpos necesarios para combatir a un patógeno específico. Normalmente se requieren de una semana a varias semanas para que una persona o un animal desarrollen una respuesta de anticuerpos. En este tiempo intermedio, un organismo depende del sistema innato para contener la infección.

El sistema inmune adquirido puede desarrollar anticuerpos en respuesta a un patógeno, toxina o producto químico específicos o cualquier molécula que el organismo reconozca como un antígeno (es decir, el sistema inmune reconoce el antígeno como algo no propio). Cuando una persona o un animal resultan infectados por patógenos, marcadores celulares específicos asociados con el patógeno se presentan a las células productoras de anticuerpos. El sistema inmune adquirido experimenta luego un proceso denominado "expansión clonal". Específicamente, esto permite la producción masiva de células que producen anticuerpos que se dirigen hacia un antígeno específico asociado con el patógeno.

Los anticuerpos son sintetizados por células T y células B. Las células T maduran en el timo y presentan anticuerpos que están unidos a sus superficies extracelulares. Las células T circulan luego libremente por la sangre y a través de tejidos linfáticos. La unión de la célula T a un patógeno a través del anticuerpo unido da por ello lugar a la identificación y la subsiguiente destrucción del patógeno. Por contraste, los anticuerpos producidos por las células B son secretados a la sangre, por donde circulan libremente. Cuando los anticuerpos producidos por células B se unen a un patógeno, inician una cascada de procesos que dan lugar a la identificación y la muerte del patógeno. Los anticuerpos que se producen en respuesta a una inmunización son clasificados por isotipos de anticuerpo. Los tres isotipos de anticuerpo más importantes incluyen IgM, IgG1 e IgG2. Otros isotipos incluyen, pero no se limitan a, los isotipos IgA, IgD, IgG3, IgG4 e IgE y, en aves de corral, el isotipo IgY.

La respuesta de IgM adaptativa es el primer anticuerpo producido por las células T y B en respuesta a un antígeno; sin embargo, es un anticuerpo relativamente "débil" con una afinidad por el antígeno y una especificidad limitadas. En los isotipos IgG1 e IgG2 están contenidas respuestas de anticuerpos más "potentes"; sin embargo, el desarrollo de los isotipos IgG1 e IgG2 requiere períodos de tiempo más prolongados. Las respuestas de los isotipos IgG en los individuos preñados son particularmente importantes ya que estos son los isotipos de anticuerpo que se transfieren de la madre al hijo a través del calostro en el momento del parto y que transfieren por ello una inmunidad pasiva al recién nacido.

La vacunación (también llamada inmunización) contra una enfermedad es comúnmente llevada a la práctica en las industrias médica humana y ganadera. Por ejemplo, para vacunar contra un patógeno, se administra a un animal una vacuna en forma de versión no infectiva del patógeno o sólo se administra una porción del patógeno. El sistema inmune adquirido responde produciendo anticuerpos hacia la vacuna. Si el animal resulta posteriormente expuesto al patógeno vivo, los anticuerpos generados en respuesta a la vacuna son rápidamente movilizados y luego reconocen y se centran en el patógeno para su destrucción.

La industria ganadera se basa en protocolos de inmunización contra enfermedades específicas del ganado para minimizar la morbilidad y la mortalidad que surgen de infecciones fúngicas, víricas y bacterianas. Por ejemplo, en la industria láctea, es común vacunar a los animales contra *E. coli* ya que ésta es una de las formas más comunes de infecciones en las glándulas mamarias (es decir, mastitis) y causa una pérdida de producción y, en varios casos, la pérdida de la vaca.

De los protocolos de vacunación actuales surgen varios problemas. Por ejemplo, la eficacia de los protocolos de vacunación varía de individuo a individuo. Específicamente, algunos individuos desarrollarán un título elevado (elevada concentración de anticuerpos en el suero) en respuesta a un protocolo de inmunización específico mientras que otros no. Puesto que hay una correlación directa entre el título de un anticuerpo y la respuesta del sistema inmune a una infección, algunos individuos permanecen susceptibles a una infección por el patógeno aun cuando han sido vacunados. En consecuencia, queda la necesidad de mejorar la eficacia de las vacunas para reducir la incidencia de una enfermedad en poblaciones de animales.

Sumario

La descripción se refiere a combinaciones para potenciar la eficacia de vacunas, y a métodos para usar las combinaciones. En las combinaciones de la descripción se usa una composición que tiene los componentes siguientes: β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, β -1,3(4)-glucano, diatomita, arcilla mineral y glucomanano. Esta composición se suministra a animales que están a punto de ser sometidos a un protocolo de vacunación o que están siendo sometidos a un protocolo de vacunación.

Las combinaciones aumentan la eficacia de la vacuna al aumentar la concentración sérica (título) de anticuerpos hacia la vacuna. La concentración sérica aumentada de anticuerpos permanece incluso después de que se ha retirado la composición de la dieta de los animales.

Breve descripción de los dibujos

En la Figura 1 se muestran los resultados de experimentos por transferencia Western que demuestran el efecto de la composición sobre la expresión de L-selectina de neutrófilo, como se describe en el Ejemplo 1.

En la Figura 2 se muestran los resultados de experimentos por transferencia Western que demuestran los efectos de la composición en las formas no calentada y calentada (globular) sobre la expresión de L-selectina de neutrófilo, como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 3 es un gráfico que resume los efectos de la composición sobre la expresión del mRNA que codifica L-selectina en neutrófilos de rata, como se describe en el Ejemplo 3.

En la Figura 4 se muestran los resultados de experimentos por transferencia Western que demuestran los efectos de la composición sobre la expresión de interleucina 1 β (IL-1 β) de neutrófilo, como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 5 es un gráfico de barras que resume los resultados de los ELISAs utilizados para cuantificar el título de IgG1 contra la vacuna J5, como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 6 es un gráfico de barras que resume los resultados de los ELISAs usados para cuantificar el título de IgG2 contra la vacuna J5, como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 7 es un gráfico de barras que ilustra los efectos de una dosis baja (15 gramos/día) y una dosis alta (30 gramos/día) de la composición sobre la expresión de interleucina 1 β en ganado vacuno, como se describe en el Ejemplo 6.

En la Figura 8 se muestran los resultados de experimentos por transferencia Western que demuestran los efectos de la composición sobre la expresión de L-selectina de neutrófilo en ganado vacuno, como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 9 es un gráfico de barras que resume los resultados de ELISAs usados para cuantificar el total de los títulos de IgG1 e IgG2, como se describe en el Ejemplo 7.

Descripción de las realizaciones preferidas

Como se requiere, aquí se describen realizaciones detalladas de la presente composición; sin embargo, se ha de entender que las realizaciones descritas son meramente ejemplares del invento, el cual se puede materializar de diversas formas.

La presente descripción se dirige a combinaciones que aumentan la función inmune en animales, y a métodos para usar las combinaciones. Generalmente, en las combinaciones de la descripción se usa una composición que tiene los componentes siguientes: β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, β -1,3(4)-glucano, diatomita, arcilla mineral y glucomanano, que es conocido por aumentar la función inmune (Documento US 2005/0220846). La composición se utiliza en combinación con una vacuna para que la ingestión de la composición por el animal potencie la eficacia de la vacuna. Como aquí se define, una vacuna estimula el sistema inmune, incluyendo la producción de anticuerpos, cuando se administra a un animal. Una indicación de una eficacia potenciada de una vacuna es un título aumentado de anticuerpos hacia el antígeno de la vacuna en el suero del animal.

La combinación se puede utilizar eficazmente en el alimento para individuos o animales de muchas especies, tales como mamíferos, incluyendo seres humanos, y aves. En una realización preferida, las combinaciones se utilizan en mamíferos de ganadería. Las combinaciones pueden ser usadas igualmente bien con rumiantes y no rumiantes. Los ejemplos de rumiantes incluyen, pero no se limitan a, ganado vacuno, ovejas, cabras, vacas, ciervos, bisontes y búfalos. Los no rumiantes incluyen cochinitos, caballos, cerdas y otros. En una realización particularmente preferida, las composiciones de la composición se utilizan para ovejas y ganado bovino.

En una realización, la composición se suministra a un animal durante el periodo durante el cual el animal está siendo sometido a un protocolo de vacunación. Un protocolo de vacunación típico requiere la administración de al menos una, y normalmente varias, dosis de la vacuna a lo largo de un periodo definido, para maximizar la estimulación del sistema inmune y la producción de anticuerpos. En una realización preferida, la composición se suministra diariamente a un animal empezando antes del inicio del protocolo de vacunación y continuando después del inicio del protocolo de vacunación. En realizaciones alternativas, la composición se puede suministrar a un animal empezando después del inicio del protocolo de vacunación o simultáneamente con el inicio del protocolo.

La vacuna de la combinación puede provocar una respuesta hacia un patógeno, una toxina, un fármaco u otras moléculas. La vacuna puede ser una vacuna de DNA, por lo que se inyecta una molécula de DNA que codifica un antígeno a un animal, lo que da lugar a la síntesis del antígeno y, posteriormente, a una respuesta inmune hacia el antígeno. En una realización preferida, la vacuna de la combinación estimula la producción de anticuerpos hacia un patógeno causativo de enfermedad. En una realización particularmente preferida, la vacuna estimula la producción de anticuerpos contra patógenos que causan mastitis. La vacuna J5 es una de dichas vacunas contra la mastitis comercialmente asequibles (asequible de Pfizer).

Otros ejemplos de patógenos y enfermedades para las cuales se vacunan comúnmente a seres humanos y animales y que se pueden beneficiar de un protocolo que potencia la eficacia incluyen, pero no se limitan a, rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR; del inglés, infectious bovine rhinotracheitis), parainfluenzavirus de tipo 3 (PI3), virus de la diarrea vírica bovina (BVDV; del inglés, bovine viral diarrhea virus), virus respiratorio sincitial bovino (BRSV; del inglés, bovine respiratory syncytial virus), rotavirus, coronavirus, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella spp.*, conjuntivitis, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, leptospirosis, brucelosis, enfermedad de Newcastle, viruela aviar, erisipela, cólera aviar, virus de la enfermedad de Marek (MDV; del inglés, Marek's disease virus), virus de la bronquitis infecciosa (IBV; del inglés, infectious bronchitis virus), encefalomiелitis aviar, coccidiosis, rinoneumonitis, gripe equina, *Streptococcus equi*, arteritis vírica equina, ehrlichiosis monocítica equina, encefalomiелitis, encefalitis del Nilo Occidental, rabia, parvovirus, adenovirus, *Bordetella*, enfermedad de Lyme, *Giardia*, tosferina, virus del sarampión, hepatitis A y B, difteria y poliomielitis.

Los componentes de la composición de la combinación se preparan mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica y se pueden obtener de fuentes comerciales. La β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa es producida a partir de una fermentación sumergida de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum*. La diatomita es asequible como un producto comercialmente asequible lavado con ácido, con sílice (SiO_2) al 95% y con sus componentes restantes sin analizar, aunque consisten esencialmente en ceniza (minerales) según es definido por la Association of Analytical Chemists (AOAC, 2002). El β -1,3(4)-glucano y el glucomanano pueden derivar de preparaciones comerciales de extracto de pared celular de levadura procedente de una levadura inactivada primaria (*Saccharomyces cerevisiae*), con la composición química mostrada en la Tabla 1:

Tabla 1

Humedad	2-3 %
Materia seca	97-98%
Proteínas	14-17%
Grasa	20-22%
Fósforo	1-2%
Mananos	22-24%
β -1,3(4)-glucanos	24-26%
Ceniza	3-5%

Las arcillas minerales (aluminosilicatos) usadas en esta composición pueden ser cualesquiera de una diversidad de arcillas comercialmente asequibles que incluyen, pero no se limitan a, arcilla montmorillonita, bentonita y zeolita.

En una realización preferida de la combinación, se combinan β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita, glucano y glucomanano, y arcilla mineral, en peso a peso, en unas cantidades en los intervalos de aproximadamente 0,05-3%, 1-40%, 1-20% y 40-92%, respectivamente. En otra realización preferida, se combinan β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita, glucano y glucomanano, y arcilla mineral en unas cantidades de 0,1-3%, 5-40%, 2-15% y 40-80%, respectivamente. En una realización especialmente preferida, se combinan β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomi-

ta, glucano y glucomanano, y arcilla mineral en unas cantidades de 0,2-3%, 20-40%, 4-10% y 50-70%, respectivamente.

5 En una realización, la composición es un polvo suelto y seco que es adecuado para la inclusión directa en un producto alimenticio o pienso comercialmente asequible o como un suplemento para una ración o dieta mixta total. El polvo se puede mezclar con pienso sólido o líquido o con agua. En otra realización, la composición tiene forma de glóbulos.

10 En una realización, cuando se incorpora directamente a piensos, la composición se puede añadir en cantidades que varían de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 kg por tonelada de pienso. En una realización preferida, la composición se añade a componentes de piensos para animales o a un alimento en cantidades de aproximadamente 0,5 kg a aproximadamente 10 kg por tonelada de pienso. En una realización especialmente preferida, la composición se puede añadir a piensos en cantidades que varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 kg por tonelada de pienso.

15 Cuando se expresa como un porcentaje de la materia seca del pienso, la presente composición se puede añadir a componentes de piensos para animales o a alimentos en cantidades que varían de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,0125% a aproximadamente 2% en peso. En una realización preferida, la composición se añade a componentes de piensos para animales o a un alimento en
20 cantidades de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,5% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,0625% a aproximadamente 1% en peso. En una realización especialmente preferida, la composición presente se añade en cantidades de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,7% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,125% a aproximadamente el 0,5% en peso, del pienso.

25 Alternativamente, la composición de la presente combinación se puede suministrar directamente a animales mamíferos o aves como un suplemento en cantidades de aproximadamente 0,01 gramos a aproximadamente 1 gramo por kilogramo de peso corporal en vivo, preferiblemente de aproximadamente 0,012 gramos a aproximadamente 0,5 gramos por kilogramo de peso corporal en vivo, más preferiblemente de aproximadamente 0,016 gramos a aproximadamente 0,37 gramos por kilogramo de peso corporal en vivo, al día. En una realización especialmente preferida,
30 la composición se puede proporcionar para uso en muchas especies en cantidades de aproximadamente 0,05 gramos a aproximadamente 0,20 gramos por kilogramo de peso corporal en vivo al día.

35 Como ejemplo, la composición se puede proporcionar a ovejas en cantidades en el intervalo de aproximadamente 2 gramos por cabeza al día a aproximadamente 8 gramos por cabeza al día. Para animales bovinos, la composición se puede proporcionar en cantidades en el intervalo de aproximadamente 10 gramos por cabeza al día a aproximadamente 60 gramos por cabeza al día. Quien tiene oficio y experiencia puede apreciar que la cantidad de la composición suministrada puede variar dependiendo de la especie animal, el tamaño del animal y el tipo del componente de pienso al que se añade la composición.

40 Se proporcionan ahora ejemplos con objeto de ilustrar los conceptos del invento con un cierto grado de especificidad.

EJEMPLO 1

45 Se llevó a cabo un experimento con ovejas con la finalidad de determinar la capacidad de la composición para aumentar la expresión de L-selectina de neutrófilo, un marcador del sistema inmune innato, en animales inmunosuprimidos. Se dividieron los animales (seis por grupo) en dos grupos: Testigo y Experimental. El grupo Testigo recibió una ración muy energética consistente en heno cortado disponible *ad libitum*, 0,45 kg de maíz triturado por cabeza al día y 0,45 kg de subproductos de la molienda del trigo cocidos por cabeza al día durante un periodo de 28 días.
50 Durante este tiempo, también recibieron dos inyecciones diarias de dexametasona, un fármaco inmunosupresor. El grupo Experimental recibió la ingesta diaria de la composición (5 gramos por cabeza al día) durante 28 días y recibió la misma dieta y el mismo protocolo de inyecciones de dexametasona que el grupo Testigo. Esta composición del grupo Experimental era 65,8 por ciento en peso de arcilla mineral, 0,20 por ciento en peso de endoglucanohidrolasa, 9,0 por ciento en peso de glucanos y glucomanano, y 25 por ciento en peso de diatomita calcinada. Al final del estudio, se tomaron muestras de sangre y se purificaron los neutrófilos usando una centrifugación en gradiente de Percoll. Se evaluó la cantidad de expresión de L-selectina en los neutrófilos usando técnicas de transferencia Western y anticuerpos específicos para L-selectina.
55

60 Como se muestra en la Figura 1, elemento superior, los animales que no habían recibido la composición tenían una expresión baja y variable de L-selectina. Como se muestra en la Figura 1, elemento inferior, los animales que habían recibido la composición presentaron un aumento consistente de la expresión de L-selectina. El elemento superior representa seis animales Testigo inmunosuprimidos. El elemento inferior representa seis animales Experimentales inmunosuprimidos que habían recibido la composición en su dieta.

65

EJEMPLO 2

En este estudio se examinó la estimulación del sistema inmune innato en ovejas cuando se suministró la composición Experimental del Ejemplo 1 en una dieta globular. La dieta basal consistía en cebada al 21,55%, harina de colza al 10,0%, subproductos de la destilación de cereales al 5%, maíz triturado al 40%, piedra caliza al 1,50%, sulfato de manganeso al 0,01%, microvitamina E al 0,01%, melaza al 4,0%, mono-cal al 0,25%, cloruro potásico al 0,25%, cloruro sódico al 0,60%, selenito sódico al 0,03%, subproductos de la molienda del trigo al 15,79%, sulfato de zinc al 0,01%, sulfato amónico al 0,75% y sulfato de cobalto al 0,25%. Cuando se añadió la composición Experimental a esta dieta, se incluyó en un 0,6% sustituyendo a esa porción de los subproductos de molienda de trigo. Se asignaron veintiocho ovejas a cuatro tratamientos que consistían en un grupo Testigo, un grupo que recibió la composición Experimental en forma pulverulenta, un grupo que recibió la composición Experimental en forma globular habiéndose formado los glóbulos a una temperatura de 71 °C, y un grupo que recibió la composición Experimental en forma globular habiéndose formado los glóbulos a 82 °C. Todos los animales fueron inmunosuprimidos por medio de una inyección diaria de dexametasona.

El estudio se llevó a cabo usando métodos idénticos a los del Ejemplo 1 salvo por qué la composición se administró en glóbulos que fueron fabricados formando los glóbulos a temperaturas elevadas. La razón fundamental para llevar este estudio a cabo fue determinar si el calentamiento de la composición (como se requiere en la formación de glóbulos) podría inactivar la capacidad de la composición para aumentar la inmunidad innata. Como se muestra en la Figura 2, las ovejas (Testigo) que no habían recibido la composición expresaron unos niveles muy bajos de L-selectina en neutrófilos. La provisión de la composición Experimental incluso en una forma globular (calentada) aún aumentaba acusadamente la expresión de la L-selectina de neutrófilo.

En la Figura 2, el elemento superior representa la expresión de L-selectina de neutrófilo en animales inmunosuprimidos alimentados con una dieta testigo sin la composición. El segundo elemento (polvo) representa la expresión de L-selectina en animales inmunosuprimidos que habían recibido la composición Experimental en forma no calentada y libremente mezclada, como en el Ejemplo 1 (grupo Experimental). Los elementos tercero y cuarto representan la expresión de L-selectina de neutrófilo en animales inmunosuprimidos que habían recibido la composición Experimental en forma globular. Los glóbulos usados en el Elemento 3 fueron formados por calentamiento a 71 °C y los glóbulos del Elemento 4 fueron calentados a 82 °C durante la fabricación de los piensos.

EJEMPLO 3

Se llevó a cabo un experimento con ratas para investigar si la composición tenía la capacidad para aumentar la inmunidad innata en un modelo no rumiante. En este estudio, se asignaron ratas a uno de dos tratamientos: un grupo Testigo (dieta no suplementada) y un grupo Experimental en el que se había añadido a la dieta la composición del Ejemplo 1 en un 1% del peso del pienso en estado seco. En este experimento, las ratas fueron alimentadas con comida triturada comercial para ratas, con o sin la composición Experimental. En este estudio no se utilizó la inmunosupresión usando protocolos de inyecciones de dexametasona. Después de 14 días, se tomaron muestras de sangre de las ratas anestesiadas, por medio de una punción cardíaca. Se aislaron los neutrófilos de las muestras de sangre usando una centrifugación en gradiente de Percoll y se aisló el RNA total usando TriZol.

Luego se determinó la concentración del RNA mensajero (mRNA) que codifica L-selectina de rata en las muestras de RNA de neutrófilo, por reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (QRT-PCR; del inglés, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction) usando cebadores que se desarrollaron específicamente para el ensayo de la L-selectina de rata. Las cantidades de mRNA de L-selectina fueron normalizadas presentándolas como una proporción del mRNA de β -actina, que se expresa en todas las células con un nivel bastante constante. Como se muestra en la Figura 3, y de acuerdo con los resultados de los Ejemplos 1 y 2, la composición aumentaba la expresión de mRNA de L-selectina en más de 6 órdenes de magnitud ($P < 0,05$).

Este estudio demostró que la expresión aumentada de la proteína L-selectina, como se muestra en los Ejemplos 1 y 2 por transferencia Western, puede ser causada por un aumento del mRNA que codifica esta proteína. Esto implica que la composición altera la velocidad de transcripción del gen que codifica L-selectina.

EJEMPLO 4

Los neutrófilos, células del sistema inmune innato, son capaces de señalar y por ello suprarregular la producción de anticuerpos por el sistema inmune adquirido a través de la secreción de interleucina 1β (IL- 1β). Para investigar la capacidad de la composición para provocar un aumento de la síntesis de IL- 1β por los neutrófilos, se evaluó la concentración de IL- 1β en neutrófilos tomados de las mismas ovejas, como se describió en el Ejemplo 1. Para completar este estudio, se usaron la transferencia Western y anticuerpos específicos para IL- 1β .

Como se muestra en la Figura 4, los animales que no habían recibido la provisión diaria de la composición contenían niveles casi indetectables de IL- 1β ; sin embargo la provisión de la composición a los animales causó un acusado aumento de la expresión de IL- 1β ($P < 0,05$). En la Figura 4, el elemento superior representa seis animales inmuno-

suprimidos alimentados con el Testigo. El elemento inferior representa seis animales inmunosuprimidos alimentados con la composición Experimental, que habían recibido la composición. Las concentraciones de IL-1 β se determinaron utilizando un análisis por transferencia Western y un anticuerpo específico para IL-1 β .

- 5 Estos datos indican que la composición posee la capacidad no sólo para aumentar marcadores de la inmunidad innata (por ejemplo, L-selectina; Ejemplos 1, 2 y 3) sino también para aumentar la expresión de la molécula clave de señalización (es decir, IL-1 β) que suprarregula el sistema inmune adaptativo.

EJEMPLO 5

- 10 La finalidad de este experimento fue determinar qué genes se expresaban diferencialmente en los neutrófilos después de la alimentación de ganado vacuno lechero peri-parturiente con la composición. En este estudio se examinó(aron) el(los) mecanismo(s) mediante el(los) cual(es) la composición aumentaba la expresión de IL-1 β en neutrófilos. El ganado vacuno lechero peri-parturiente es un buen modelo porque el estrés de la preñez conduce a una inmunosupresión, lo que hace que las vacas sean particularmente susceptibles a una infección.

- 15 En este experimento, se asignaron ocho vacas lecheras peri-parturientas a una dieta Testigo que no tenía la composición Experimental, y se asignaron ocho vacas a un grupo Experimental que recibió la composición del Ejemplo 1 en su dieta (56 gramos por cabeza al día). Se suministraron las dietas a los animales durante aproximadamente 28 días hasta el parto. A las 12-15 horas después del parto, se obtuvieron muestras de sangre de 500 ml por medio de una punción en la yugular y se prepararon los neutrófilos por medio de una centrifugación en gradiente de Percoll a gran escala.

- 25 Se aisló el RNA de los neutrófilos utilizando el método de TriZol y luego se sometió a transcripción inversa hasta cDNA usando transcriptasa inversa. Durante la transcripción inversa, se emplearon colorantes de base nucleotídica diferentemente coloreados (Cy3 y Cy5) para que los DNAs complementarios (cDNAs) sintetizados a partir de los dos diferentes grupos de tratamiento (Testigo y Experimental) incorporaran diferentes colores. Las muestras de cDNA de los grupos Experimental y Testigo fueron luego aplicadas a un portaobjetos con micromatriz BoTL-5. Esta micromatriz fue preparada en el Center for Animal Functional Genomics de la Michigan State University y contiene 1500 genes (cada uno dispuesto matricialmente por triplicado) sobre un portaobjetos de vidrio. Luego se dejó que los cDNAs generados a partir de las muestras de los grupos Experimental y Testigo compitieran para unirse a los 1500 genes de la matriz y se evaluó la expresión relativa de los genes comparando la abundancia relativa de las señales de Cy3 y Cy5 en cada mancha de la matriz. Luego se analizaron estadísticamente los datos para identificar los genes que se expresaban diferencialmente (aquellos genes en que $P < 0,05$).

- 35 Los resultados mostraron que se expresaban diferencialmente más de 20 genes ($P < 0,05$) en los neutrófilos bovinos tomados del grupo Experimental. El de la enzima conversiva de interleucina (ICE; del inglés, interleukin-converting enzyme) fue uno de dichos genes suprarregulados. Esto fue confirmado usando QRT-PCR y cebadores específicos para la secuencia de ICE bovina. La ICE es la enzima limitante de la velocidad en la conversión de la pro-IL-1 β inactiva en la IL-1 β activa secretada. De este modo, la composición puede suprarregular la inmunidad adaptativa (es decir, tal como aumentando el título de anticuerpos) por medio de su capacidad para aumentar la expresión de la actividad de la ICE de neutrófilo y, en consecuencia, la secreción de IL-1 β .

EJEMPLO 6

- 45 Para probar la hipótesis de que la composición potenciaba la eficacia de una vacuna, se examinó el desarrollo del título después de un protocolo de vacunación. Se asignaron dieciocho vacas (seis vacas en cada grupo) a uno de tres tratamientos: Testigo, Tratamiento 1 (15 gramos de composición por cabeza al día en la dieta) y Tratamiento 2 (30 gramos de composición por cabeza al día). La dieta de los animales consistía en una dieta de heno que fue presentada *ad libitum* con un suplemento diario que proporcionaba proteína cruda al 14%, grasa cruda al 3% y fibra cruda al 20% (Tabla 2). A lo largo de la prueba se proporcionaron a los animales 5,44 kilogramos de este suplemento por cabeza al día. Se mezcló directamente la composición Experimental del Ejemplo 1 en este suplemento para que se suministrara al ganado de los Tratamientos 1 y 2, respectivamente, las esperadas ingestas de 15 gramos por cabeza al día y 30 gramos por cabeza al día.

- 55 Se administraron estos tratamientos dietéticos a los animales durante 56 días, después de los cuales se retiró la composición de la dieta de los Tratamientos 1 y 2. Todos los animales fueron mantenidos con la misma dieta testigo sin la composición hasta el Día 84. Los Días 7, 21 y 35 del experimento se administró a todos los animales una vacuna de *E. coli* J5 (Pfizer). Este protocolo de vacunación (es decir, tres inyecciones separadas por 14 días) seguía las recomendaciones del fabricante. Esta vacuna se usa comercialmente en la industria láctea como un medio para reducir la probabilidad de una mastitis por coliformes. Una limitación de esta vacuna, y de la mayoría de las demás vacunas, es la respuesta variable y limitada en lo referente al título.

- 65 Se tomaron muestras de sangre usando una punción en la yugular los Días 0, 14, 28, 42 y 56, día en que se retiró la composición de la dieta de los animales. Todos los animales permanecieron con una dieta común sin la composición

hasta el Día 84. También se tomaron muestras de sangre el Día 82 para determinar si se mantenían cambios en el título provocados por la composición, después de la retirada de ésta de la dieta. Se preparó suero de todos los animales por centrifugación. Se evaluaron las concentraciones de anticuerpos específicos para la vacunación con *E. coli* J5 en tres diferentes fracciones inmunoglobulínicas (IgM, IgG1 e IgG2) usando ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISAs; del inglés, enzyme-linked immunosorbant assays). Para examinar los títulos hacia *E. coli* J5 en las fracciones inmunoglobulínicas de IgM, IgG1 e IgG2, un cultivo de *E. coli* (obtenido del Dr. Jeanne Burton, Center for Animal Functional Genomics, Department of Animal Sciences, Michigan State University) fue desarrollado, recolectado y utilizado para revestir placas de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron muestras de suero (diluidas a 1:5000) procedentes de los animales a pocillos individuales de las placas revestidas y se dejaron en incubación durante una hora para permitir que los anticuerpos del suero de los animales se unieran al antígeno de *E. coli* J5. Las placas para ELISA fueron lavadas con disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) que contenía Tween-20.

A las placas lavadas se añadieron anticuerpos secundarios [anticuerpos anti-bovinos conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase) y generados en animales ovinos] que se unían específicamente a IgM, IgG1 o IgG2 bovinas. Los anticuerpos secundarios fueron conjugados con peroxidasa de rábano picante. Después de una incubación durante una hora adicional con los anticuerpos secundarios, las placas fueron lavadas de nuevo con PBS y Tween-20. Se añadió tetrametilbencidina (TMB), el sustrato de la peroxidasa, a las placas y se cuantificó la reacción coloreada resultante midiendo la absorbancia a 450 nm usando un dispositivo lector de placas para ELISA.

Como se muestra en la Tabla 3, la composición Experimental no ejerció efecto alguno (en el umbral de $P > 0,05$) sobre el desarrollo del título hacia *E. coli* J5 asociado con el isotipo de anticuerpo IgM. Sin embargo, la composición estimulaba y mantenía un título hacia J5 en los isotipos de anticuerpo IgG1 e IgG2, como se muestra en las Figuras 5 y 6 y en las Tablas 4 y 5.

El título de IgG1 había aumentado el Día 56 ($P < 0,05$) tanto en los animales que habían recibido el Tratamiento 1 como en aquellos que habían recibido el Tratamiento 2 (Tabla 4 y Figura 5). El Día 82, el título en los animales Testigo había retrocedido hasta los niveles pre-experimentales (Día 0). Sin embargo, los animales que habían sido alimentados con el Tratamiento 1 o el Tratamiento 2 tenían un título hacia J5 elevado en comparación con el de los animales Testigo ($P < 0,05$). De hecho, los animales que habían recibido el Tratamiento 1 o 2 no presentaron pérdida alguna en el título de IgG1 una vez que se hubo retirado el invento de la dieta después de 56 días (Tabla 4 y Figura 5).

Como se muestra en la Tabla 5 y la Figura 6, con respecto a la fracción de IgG2, la adición de 15 g por cabeza al día (Tratamiento 1) o 30 g por cabeza al día (Tratamiento 2) de la composición causó un aumento gradual del título de IgG2 hacia J5 a los 42 días (es decir, la dosis superior aumentó el título en un 57% y la dosis baja en un 30% con respecto al Testigo), aunque este efecto no fue estadísticamente significativo en $P < 0,05$ (el valor de P fue 0,16). Después de 56 días, el Tratamiento 2 (la dosis superior de la Composición) había causado una elevación significativa del título hacia J5 ($P < 0,05$). El Tratamiento 1 (la dosis baja de la Composición) había causado una elevación del título hacia J5 en la fracción de IgG2 en este punto temporal, aunque este efecto no fue estadísticamente significativo en un umbral de $P < 0,05$ (valor de $P = 0,12$). El Día 82 del estudio, una vez que la Composición hubo sido retirada de la dieta, los animales alimentados con la dosis superior de la Composición tenían un título elevado en la fracción de IgG2 (aumento del 14% en comparación con el Testigo); sin embargo, este efecto no era significativo en el umbral de $P < 0,05$ (valor de $P = 0,09$).

Estos datos indican que la Composición tiene la capacidad para aumentar el título en la fracción de IgG1 y, además, de mantenerlo después de la retirada de la composición de la dieta ($P < 0,05$). La Composición también tiene la capacidad para aumentar el desarrollo del título en la fracción de IgG2 ($P < 0,05$).

También se examinaron las concentraciones de IL-1 β en las muestras de suero de los animales Testigo, Tratamiento 1 y Tratamiento 2 usando un ELISA para IL-1 β (R+D Systems Minneapolis, Minnesota, EE.UU.). Como se muestra en la Figura 7, los resultados indicaban que tanto el Tratamiento 1 como el Tratamiento 2 aumentaban las concentraciones séricas de IL-1 β después de 28 días. Después de 56 días, la dosis baja de la Composición también había elevado significativamente la concentración sérica de IL-1 β ($P < 0,05$). La dosis elevada de la Composición había causado una elevación numérica de IL-1 β sérica el Día 56 del estudio; sin embargo, este efecto no era significativo en $P < 0,05$ (valor de $P = 0,23$). Aunque sin pretender un respaldo teórico, la composición puede estimular el sistema inmune innato (por ejemplo, por medio de la activación de neutrófilos) y los neutrófilos pueden luego estimular el sistema inmune adquirido mediante la secreción de IL-1 β . La IL-1 β aumentó específicamente la capacidad de las células B para aumentar la velocidad de desarrollo del título de IgG2 y mantener el título en la fracción de IgG1.

También se evaluaron las concentraciones proteínicas de L-selectina de neutrófilo usando la transferencia Western, como se muestra en la Figura 8. También se determinó la concentración de mRNA para L-selectina como en el estudio con ratas (Ejemplo 4) pero usando cebadores específicos para animales bovinos. Se determinó que tanto el Tratamiento 1 (15 g de composición Experimental/cabeza/día) como el Tratamiento 2 (30 g de composición Experi-

mental/cabeza/día) aumentaban ($P < 0,05$) las concentraciones de L-selectina de neutrófilo en comparación con el tratamiento Testigo.

TABLA 2

Ingrediente	Porcentaje del suplemento (sobre una base de pienso)
Cáscaras de algodón	32,5
Maíz	25,0
Subproductos de la molienda del trigo	6,25
Harina de colza	7,50
Subproductos de la destilación de cereales	8,73
Piedra caliza	0,75
Dynamate	0,25
Óxido de magnesio	0,15
Harina de alfalfa	14,0
Urea	0,50
Rumensin	0,01
Sulfato de zinc	0,01
Selenio	0,04
Cloruro sódico	0,30
Melaza	4,00

5

TABLA 3

Día de estudio	Testigo (Abs a 450 nm)	Tratamiento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamiento 2 (Abs a 450 nm)
14 días	0,477	0,404	0,391
28 días	0,736	0,409	0,424
42 días	0,842	0,405	0,408
56 días	1,97	0,717	1,65

TABLA 4

Día de estudio	Testigo (Abs a 450 nm)	Tratamiento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamiento 2 (Abs a 450 nm)
0 días	0,035	0,036	0,033
28 días	0,065	0,045	0,035
42 días	0,058	0,065	0,109
56 días	0,238 ^a	0,543 ^b	0,471 ^b
82 días	0,033 ^a	0,549 ^b	0,573 ^b

Los valores de una fila que no comparten un superíndice común difieren significativamente (umbral de $P < 0,05$).

10

TABLA 5

Día de estudio	Testigo (Abs a 450 nm)	Tratamiento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamiento 2 (Abs a 450 nm)
0 días	0,079	0,104	0,091
28 días	0,220	0,229	0,215
42 días	0,228	0,296	0,358
56 días	0,306 ^a	0,401 ^a	0,681 ^b
82 días	0,178	0,179	0,252

Los valores de una fila que no comparten un superíndice común difieren significativamente (umbral de $P < 0,05$).

EJEMPLO 7

- 15 Se completó un experimento con ovejas para investigar la capacidad de la composición Experimental del Ejemplo 1 para aumentar la inmunidad adaptativa en respuesta al protocolo de vacunación con *E. coli* J5 que se empleó en el Ejemplo 6. Se asignaron animales (doce animales por tratamiento) a tres tratamientos: Testigo, Tratamiento 1 (3 gramos de la composición Experimental del Ejemplo 1 por cabeza al día) y Tratamiento 2 (6 gramos de la composición Experimental del Ejemplo 1 por cabeza al día). Los animales fueron alimentados con estas dietas durante 75 días y fueron vacunados con la vacuna J5 de Pfizer los Días 7, 21 y 35 de la prueba. Se tomaron muestras de sangre los Días 0, 35 y 75. También se tomaron muestras de sangre el Día 90 una vez que se hubo retirado la composi-
- 20

ción del Tratamiento 1 o el Tratamiento 2 de la dieta, para determinar si esta composición tenía la capacidad para mantener el título.

5 En este estudio, se usó un anticuerpo secundario (IgG anti-ovina generada en conejo y conjugada con HRP; Beth Laboratories, Montgomery, Texas, EE.UU.) que reconocía tanto el isotipo IgG1 como el IgG2 de oveja. En la Tabla 6 y la Figura 9 se muestran datos de las fracciones combinadas de IgG1 e IgG2 de oveja. Los métodos usados en este estudio para llevar a cabo el ELISA fueron idénticos a los esbozados en el Ejemplo 6 salvo por qué se usó un anticuerpo anti-IgG ovina (VMRD, Pullman, Washington, EE.UU.).

10 El Día 35, la dosis elevada de la composición Experimental había causado una elevación del total de los títulos de IgG1 e IgG2. El Día 75, las dosis baja y elevada de la Composición habían causado un aumento gradual del título hacia J5. Específicamente, la dosis baja causó un aumento del título del 17% y la dosis elevada causó un aumento del título hacia J5 del 31%. El Día 90, los animales del Tratamiento 1 no presentaban una elevación del título en comparación con los animales alimentados con Testigo. Sin embargo, los animales del Tratamiento 2 que habían
15 recibido la dosis elevada de la Composición presentaban una elevación del título hacia J5 del 24%.

Estos datos respaldan las observaciones del Experimento 6 ya que la administración de la composición Experimental aumentó el desarrollo del título en las fracciones de IgG1 e IgG2 y mantuvo el título durante 15 días adicionales después de la retirada de la composición Experimental de la dieta.

20

TABLA 6

Día de estudio	Testigo (U de Abs a 450 nm)	Tratamiento 1 (U de Abs a 450 nm)	Tratamiento 2 (U de Abs a 450 nm)
0 días	0,174	0,173	0,173
35 días	0,270	0,285	0,336
75 días	0,350	0,410	0,460
90 días	0,376	0,379	0,469

El invento tendía a aumentar el título hacia J5 en las fracciones de IgG combinadas aunque los valores de P eran mayores que el umbral de $P < 0,05$.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación, que comprende:
 - 5 - una vacuna;
 - una composición que comprende β -1,3(4)-glucanos, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita, una arcilla mineral y glucomanano;
- 10 para uso en el aumento de la eficacia de la vacuna, en que la composición se suministra a un animal comenzando antes del inicio de un protocolo de vacunación, de modo que el título de los anticuerpos hacia la vacuna aumenta con respecto al título de los anticuerpos hacia la vacuna en ausencia de la composición.
- 15 2. La combinación de la Reivindicación 1, en que la composición se suministra en cantidades de 0,01 gramos a 1,0 gramos por kilogramo de peso corporal del animal en vivo.
3. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la vacuna es una vacuna contra la mastitis.
- 20 4. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 2, en que la vacuna contra la mastitis es la vacuna J5 de Pfizer.
- 25 5. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que los títulos de las clases IgG1 e IgG2 de anticuerpos hacia la vacuna aumentan en presencia de la composición con respecto a los títulos de los anticuerpos IgG1 e IgG2 en ausencia de la composición.
- 30 6. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el título de la clase IgG1 de anticuerpos hacia la vacuna aumenta con respecto al título de los anticuerpos IgG1 en ausencia de la composición.
7. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el título de la clase IgG2 de anticuerpos hacia la vacuna aumenta con respecto al título de los anticuerpos IgG2 en ausencia de la composición.
- 35 8. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que los títulos aumentados de las clases IgG1 e IgG2 de anticuerpos hacia la vacuna se mantienen después de la retirada de la composición de una dieta.
9. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el título aumentado de la clase IgG1 de anticuerpos hacia la vacuna se mantiene después de la retirada de la composición de una dieta.
- 40 10. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la composición se combina con el pienso de animales.
11. La combinación de la Reivindicación 10, en que la composición se suministra a animales en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2,5% en peso del pienso con respecto a una base ponderal en estado seco.
- 45 12. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1-4, para uso en la potenciación de la eficacia de una vacuna en el ganado.
13. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 12, en que el ganado es ganado bovino u ovino.
- 50 14. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 13, en que la composición se administra a ganado bovino en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 10 gramos a aproximadamente 60 gramos por animal al día.
15. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 13, en que la composición se administra a ovejas en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 2 gramos a aproximadamente 10 gramos por animal al día.
- 55 16. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la vacuna es una vacuna para rinotraqueitis infecciosa bovina, parainfluenzavirus de tipo 3, virus de la diarrea vírica bovina, virus respiratorio sincitial bovino, rotavirus, coronavirus, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella spp.*, conjuntivitis, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, leptospirosis, brucelosis, enfermedad de Newcastle, viruela aviar, erisipela, cólera aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus de la bronquitis infecciosa, encefalomiелitis aviar, coccidiosis, rinoneumonitis, gripe equina, *Streptococcus equi*, arteritis vírica equina, ehrlichiosis monocítica equina, encefalomiелitis, encefalitis del Nilo Occidental, rabia, parvovirus, adenovirus, *Bordetella*, enfermedad de Lyme, *Giardia*, virus del sarampión, hepatitis A, hepatitis B, difteria o poliomiелitis.
- 60 17. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la composición es un polvo suelto y seco adecuado para la inclusión directa en un producto alimenticio o pienso comercialmente asequible o como un suplemento para
- 65

una ración o dieta mixta total.

5

18. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 17, en que la composición se combina con pienso sólido, pienso líquido o agua.

19. Una combinación de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la composición se suministra al animal comenzando antes del inicio de un protocolo de vacunación y continuando después del inicio del protocolo de vacunación.

Figura 1

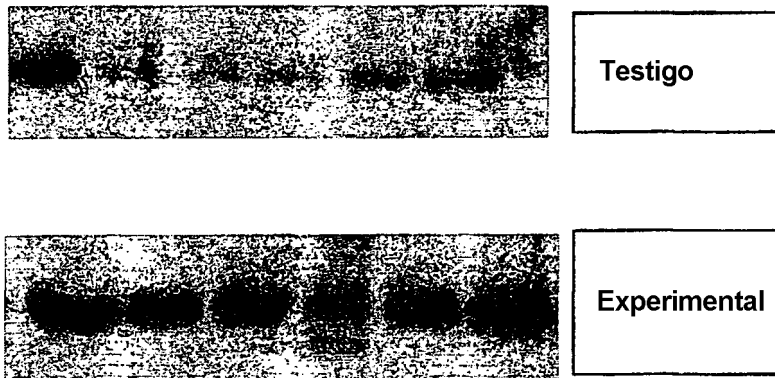


Figura 2

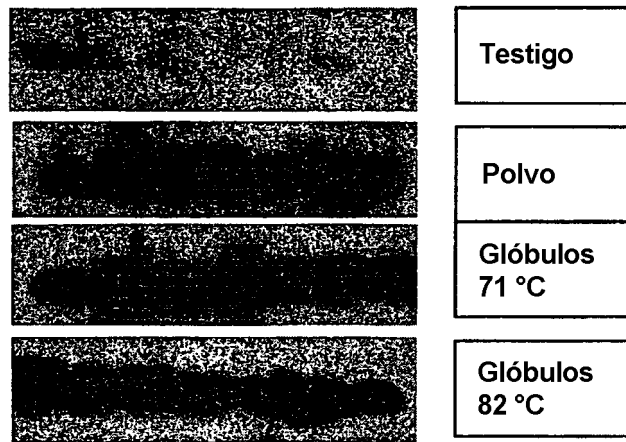


Figura 3

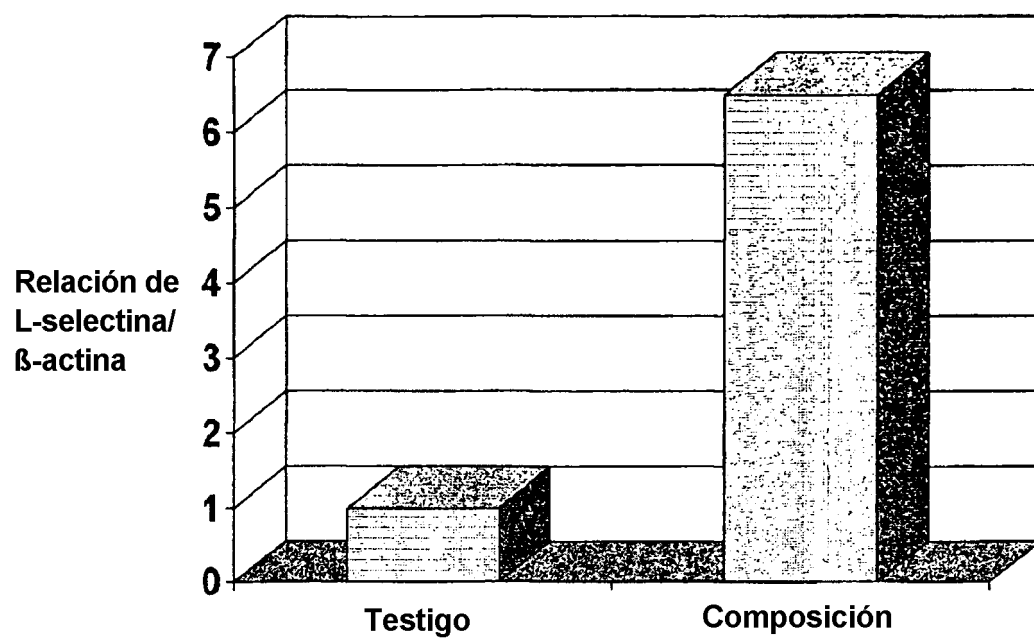


Figura 4

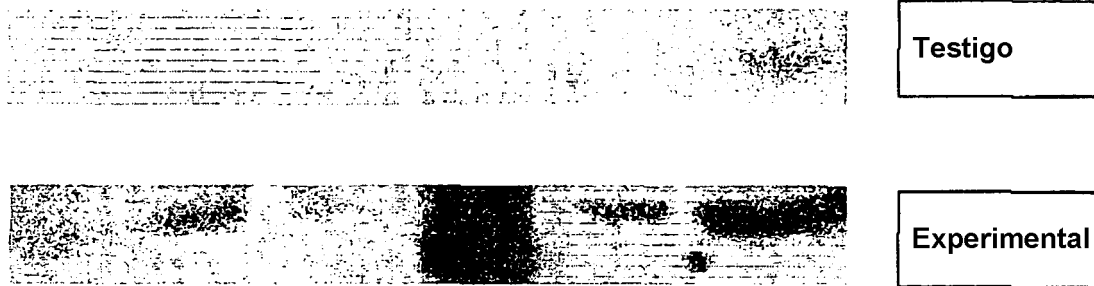


Figura 5

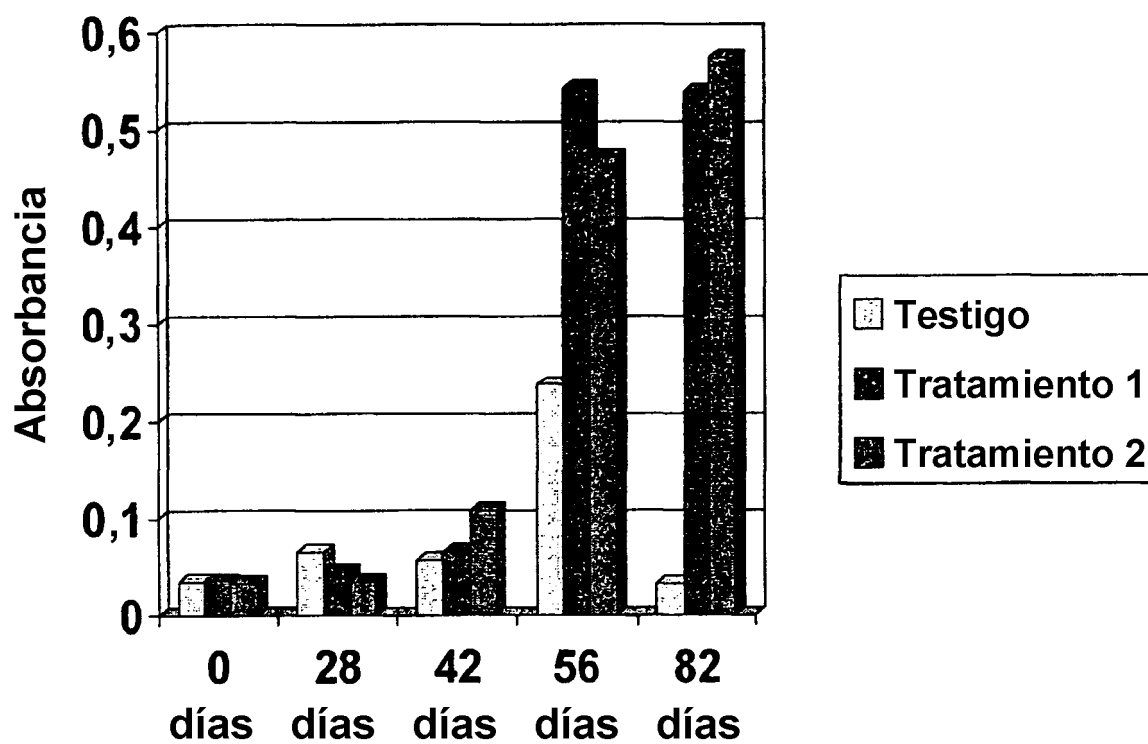


Figura 6

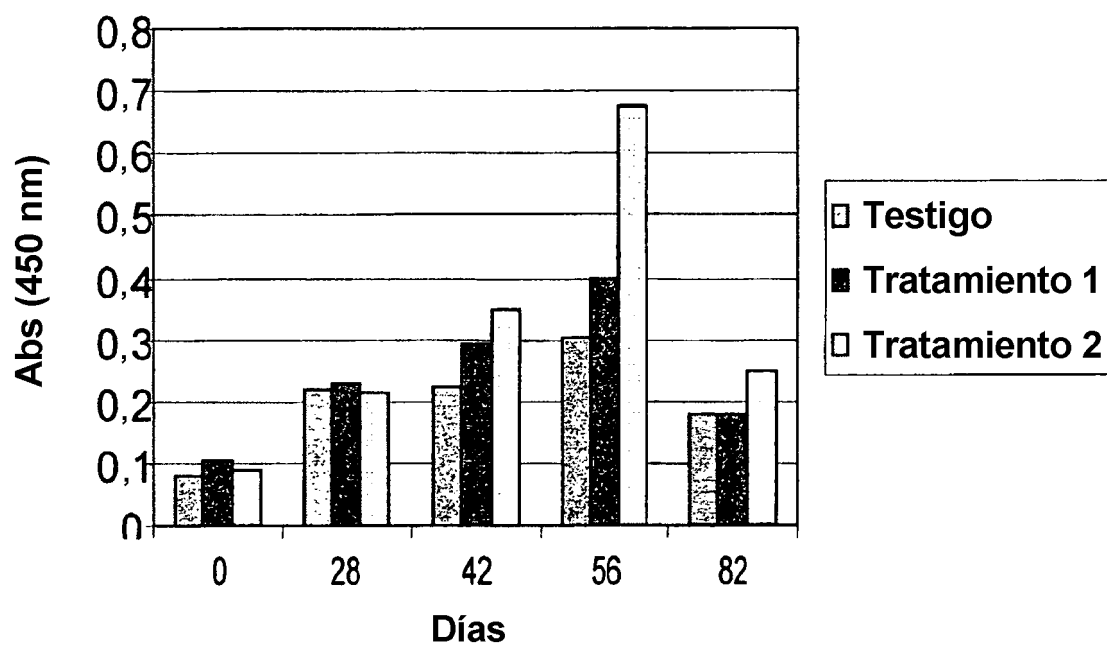


Figura 7

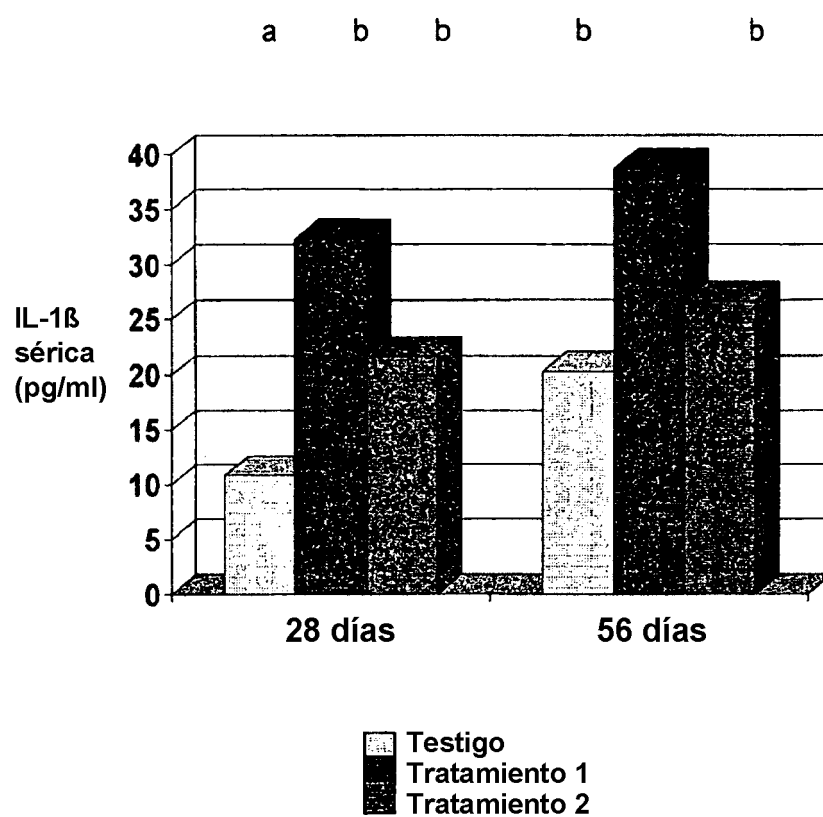


Figura 8

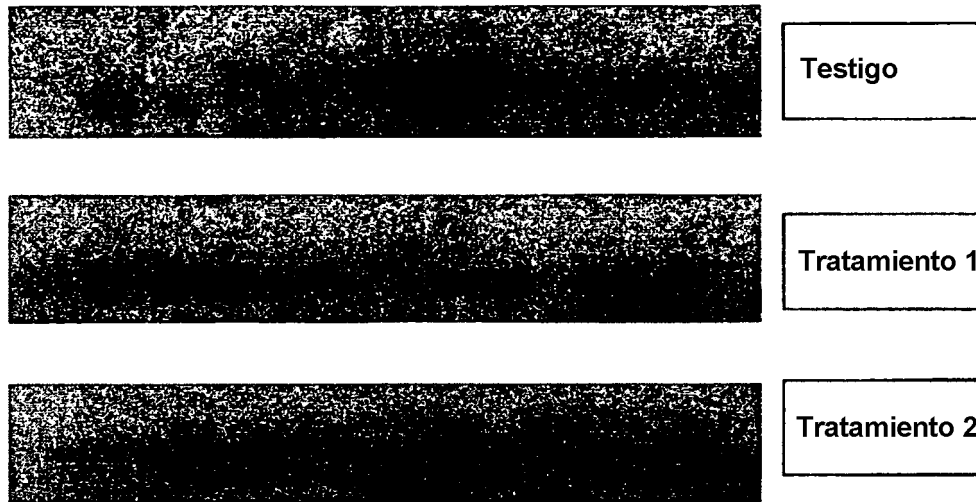


Figura 9

