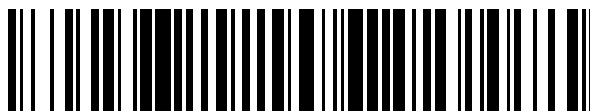


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 885**

51 Int. Cl.:

A61K 39/106 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2004** **E 04798929 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013** **EP 1691831**

54 Título: **Vacunación in ovo de campylobacter en especies aviáres**

30 Prioridad:

03.12.2003 US 526681 P

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

16.09.2013

73 Titular/es:

ZOETIS P LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park, New Jersey 07932, US

72 Inventor/es:

AGIN, TONIA SUE;
ROSEY, EVERETT LEE y
WEBER, FREDERICK HENRY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 422 885 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

Vacunación in ovo de campylobacter en especies aviares

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos de inducción de una respuesta inmune en una especie aviar contra *Campylobacter* mediante la administración, in ovo, de células vivas de *Campylobacter jejuni*.

Antecedentes de la invención

El consumo de aves de corral contaminadas con *Campylobacter* se ha visto implicado como una fuente principal de infección humana. Por lo tanto, la eliminación de estos microorganismos de la cadena de alimentos de aves de corral ha sido un objetivo importante de la investigación relacionada con *Campylobacter*.

10 Típicamente, *Campylobacter* crece y coloniza en el ambiente intestinal aviar. Se ha informado de colonización en pollos, patos, palomas, codornices, avestruces y pavos. La colonización de las aves de corral no resulta en enfermedad, pero es de naturaleza comensal.

15 El uso de un cultivo de exclusión competitiva para excluir *Salmonella* o *Campylobacter* del tracto digestivo de un ave ha sido descrito en la patente US N° 8.491.910. La eficacia de este procedimiento frente a *Campylobacter* parece ser variable. La vacunación in ovo con células de *Campylobacter jejuni*, muertas por calor, ha sido descrita por Noor et al. (British Poultry Science, 1995.36 (4): 563-73) y por Noor (Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner, 1998.3 (4): 264-269). La vacunación in ovo de pollos con flagelina y antígenos de proteínas de células enteras de *Campylobacter jejuni* ha descrita también por S. Noor et al. (Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner, 2000.5 (2): 119-124). Se han realizado también esfuerzos con el fin de identificar los genes implicados en la colonización (Ziprin et al., Abstracts, Poultry Science Association meeting, 8-11 de Agosto, 1999, Springdale, AR). Véase también, Rice, 1997, "Campylobacter jejuni in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection", Vaccine 15(17-18): 1922-1932, en el que se administran células muertas de *Campylobacter*, y Ziprin et al, 2002, Current Microbiology 44 (3): 221-223, en el que los pollos fueron vacunados después de la eclosión con cepas viables pero no colonizadoras.

25 Previamente a la presente invención, no ha habido una estrategia de inmunización eficaz que emplee una administración in ovo con células vivas de *Campylobacter jejuni*.

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona una cantidad inmunizadora eficaz de células vivas de *Campylobacter jejuni* para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra *Campylobacter* en un ave, que comprende la administración, in ovo, durante la cuarta parte final de la incubación, la cantidad inmunizadora efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni*, en el que dichas células vivas de *Campylobacter jejuni* están libres de anticuerpos neutralizantes o fragmentos de anticuerpos neutralizantes.

35 La presente invención proporciona también el uso de una cantidad inmunizadora eficaz de células vivas de *Campylobacter jejuni* en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune contra *Campylobacter* en un ave, que comprende la administración, in ovo, durante la cuarta parte final de la incubación, de la cantidad inmunizadora efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni*, en el que dichas células vivas de *Campylobacter jejuni* están libres de anticuerpos neutralizantes o fragmentos de anticuerpos neutralizantes.

Según la presente invención, las células vivas de *Campylobacter jejuni* pueden ser administradas de manera segura a cualquier especie aviar para el propósito de inducir una respuesta inmune contra *Campylobacter*, especialmente a especies de aves domésticas, tales como pollos, pavos, patos, gansos y codornices.

40 Según un aspecto de la presente invención, las células vivas usadas en la administración pueden comprender células vivas de más de una especie de *Campylobacter*. Las especies de *Campylobacter* adecuadas para su uso en la presente invención, además de *Campylobacter jejuni*, incluyen pero no se limitan a, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* o una combinación de los mismos.

45 Las células de *Campylobacter jejuni* pueden ser células de tipo salvaje o células de *Campylobacter jejuni* que han sido modificadas genéticamente para contener una o más mutaciones en el genoma, o para contener una secuencia heteróloga deseable. Preferentemente, dicha secuencia heteróloga codifica:

- (a) una proteína esencial en la colonización de aves domésticas por *Campylobacter*,
- (b) un antígeno de un virus, bacteria o parásito que causa una enfermedad en un ave doméstica;

- (c) un antígeno de un organismo que causa enfermedades en seres humanos transmitidas por los alimentos;
- (d) una proteína que potencia el crecimiento o la eficacia de la alimentación de un ave doméstica; o
- (e) una proteína que estimula el sistema inmune de un ave.

5 Preferentemente, las células se combinan con un vehículo veterinario aceptable antes de su administración y se administran en una cantidad que es eficaz para inducir una respuesta inmune en la especie aviar desarrollada a partir del huevo tratado, preferentemente en una cantidad de al menos aproximadamente 5×10^5 y, más preferentemente, de al menos aproximadamente 1×10^6 células vivas. Más preferentemente, dicho vehículo veterinario aceptable se combina con células vivas de *Campylobacter jejuni* previamente a una administración *in ovo*.

10 En otro aspecto de la presente invención, las células vivas de *Campylobacter jejuni* se combinan con al menos otro inmunógeno seleccionado de entre un inmunógeno vírico, bacteriano o protozooico.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado según la presente invención, que las células vivas de *Campylobacter jejuni* pueden ser administradas *in ovo*, de manera segura, a huevos de una especie aviar, lo que resulta en una colonización efectiva e induce una respuesta inmune en la especie aviar contra *Campylobacter*.

15 Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune en una especie aviar contra *Campylobacter* mediante una administración *in ovo* de células vivas de *Campylobacter jejuni*.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "especie aviar" o "ave" pretende incluir cualquier especie de ave, incluyendo un ave doméstica o un ave de caza, por ejemplo, pollo, pavo, pato, ganso o codorniz.

20 Preferentemente, las células vivas de *Campylobacter jejuni* son administradas a huevos de un ave doméstica criada para la producción comercial de huevos o carne, tal como un pollo, pavo, pato, ganso y codorniz domésticos.

25 El término "*Campylobacter*" se refiere a cualquier especie de *Campylobacter* o cualquier cepa de una especie *Campylobacter*, incluyendo *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*. Las cepas de *Campylobacter jejuni* adecuadas para su uso en el presente procedimiento incluyen *C. jejuni* UA535 y *C. jejuni* 81-176, así como las cepas mutantes siguientes: *C. jejuni* CsrA (con mutación en el gen Cj1103, un homólogo de *csrA*), *C. jejuni* HspR (Cj1230), *C. jejuni* HtrA (Cj1228c), *C. jejuni* Dps (Cj1534c), *C. jejuni* flbA (Cj0822c), *C. jejuni* PnP (Cj1253) y *C. jejuni* SurE (Cj0293).

30 Tanto las cepas de tipo salvaje como las mutantes de *Campylobacter jejuni* pueden ser usadas en el procedimiento de la presente invención, incluyendo las cepas que han sido modificadas genéticamente y que contienen una o más mutaciones en el genoma. La capacidad de una cepa *Campylobacter* mutante en la colonización y la inducción de una respuesta inmune en una especie aviar puede determinarse siguiendo las técnicas descritas en los ejemplos siguientes o las técnicas conocidas por las personas con conocimientos en la materia.

35 En una realización preferida, la cepa *Campylobacter jejuni* empleada en el procedimiento de la presente invención ha sido modificada genéticamente para que contenga una secuencia heteróloga de polinucleótidos. La secuencia heteróloga puede ser transferida a la cepa *Campylobacter jejuni* a través de un plásmido, un fago o un vector cósmido mediante diversos medios, tales como conjugación, electroporación o transformación. Otros procedimientos, tales como la transducción, son también adecuados, en el que el ADN recombinante en la forma de un fago transductor o vector cósmido es empaquetado dentro de un fago. Una vez que el polinucleótido recombinante está en la cepa *Campylobacter jejuni* portadora, puede seguir existiendo como un replicón autónomo separado o puede ser insertado en el cromosoma de *Campylobacter jejuni* y puede ser reproducido junto con el cromosoma durante la división celular.

40 Según la presente invención, la secuencia heteróloga de polinucleótidos puede codificar un antígeno de un organismo, tal como un virus, bacteria o parásito, que causa una enfermedad en aves o que causa enfermedades transmitidas por los alimentos en los seres humanos tras el consumo de un ave contaminada con el organismo. La administración de células vivas de *Campylobacter jejuni*, modificadas genéticamente, que contienen dicha secuencia heteróloga puede inducir una respuesta inmune en las especies aviares tanto contra *Campylobacter* como contra el organismo patógeno. Los ejemplos de dichos organismos patógenos incluyen *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Eimeria*, *Clostridium*, virus de la enfermedad de bursitis infecciosa.

45 La secuencia heteróloga de polinucleótidos puede codificar también una proteína esencial en la colonización de aves domésticas por *Campylobacter*. Las proteínas que se sabe que son esenciales en la colonización de *Campylobacter* incluyen, por ejemplo, los productos génicos de *dnaJ* y *cadF*.

50 Además, la secuencia heteróloga de polinucleótidos puede codificar una proteína o un péptido que estimula el sistema inmunitario de las aves. Los ejemplos de proteínas o péptidos que estimulan el sistema inmune de las aves incluyen, por

ejemplo, la toxina del cólera o la toxina de *E. coli* lábil al calor.

Además, la propia secuencia heteróloga de polinucleótidos puede potenciar el crecimiento o la eficiencia de la alimentación de un ave doméstica, o puede codificar una proteína o péptido que potencia el crecimiento o la eficiencia de la alimentación de un ave doméstica. Los ejemplos de dichas moléculas o proteínas incluyen el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento similar a la insulina, interleucinas, y péptidos antimicrobianos.

Según la presente invención, un especie *Campylobacter* es cultivada mediante procedimientos estándar conocidos por las personas con conocimientos en la materia y células vivas de dicha *Campylobacter* son recogidas para su administración *in ovo* a los huevos de una especie aviar. Pueden combinarse células vivas de más de una especie *Campylobacter* para su administración *in ovo*.

Además de células *Campylobacter*, puede administrarse también un vehículo veterinario aceptable. Preferentemente, tanto las células *Campylobacter* como un vehículo veterinario aceptable son administradas *in ovo*, juntas o por separado.

Las células vivas de *Campylobacter* administradas, con o sin un vehículo veterinario aceptable, están libres de factores neutralizantes, tales como anticuerpos neutralizantes o fragmentos de anticuerpos, tal como se describe en la patente US 6.440.408.

La expresión "un vehículo veterinario aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasan la adsorción, etc. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, etc. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina, entre otros.

Los adyuvantes adecuados para su uso en el presente procedimiento incluyen, pero no se limitan a: geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina; glucósidos, por ejemplo, derivados de saponina tales como Quil A o GPI-0100 (patente US N° 6.877.081); tensioactivos catiónicos tales como DDA, polioles plurónicos; polianiones; polímeros de bloque no iónicos, por ejemplo, Pluronic F-127 (B.A.S.F., EE.UU.); péptidos; aceites minerales, por ejemplo, Montanide ISA-50 (Seppic, París, Francia), carbopol, Amphigen (Hydronics, Omaha, NE EE.UU.), Alhydrogel (Superfos Biosector, Frederikssund, Dinamarca), emulsiones de aceite, por ejemplo, una emulsión de aceite mineral tal como BayolF/Arlacel A y agua, o una emulsión de aceite vegetal, agua y un emulsionante tal como lecitina; alumbre, colesterol, rmlT, citoquinas y sus combinaciones. El componente inmunogénico puede ser incorporado también en liposomas, o conjugado en polisacáridos y/u otros polímeros para su uso en una formulación de vacuna. Las sustancias adicionales que pueden ser incluidas en un producto para su uso en los presentes procedimientos incluyen, pero no se limitan a, uno o más conservantes tales como sal de disodio o tetrasodio del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), mertiolato, etc. Pueden incluirse también en un producto inmunostimulantes que potencian la respuesta del sistema inmune a antígenos. Los ejemplos de inmunostimulantes adecuados incluyen citoquinas tales como IL-12 o IL-2, o moléculas estimuladoras tales como muramil dipéptido, aminoquinolonas, lipopolisacárido, etc. El adyuvante puede ser combinado con células vivas de *Campylobacter* antes de la administración *in ovo*, o puede ser administrado de manera independiente en cualquier momento después de la eclosión por medio de la alimentación, el agua o pulverización con aerosol, proporcionadas al ave.

Las células vivas se administran a una dosis eficaz para inducir una respuesta inmune contra *Campylobacter* en la especie aviar desarrollada a partir del huevo tratado. La cantidad de células vivas de *Campylobacter jejuni* que es eficaz para inducir una respuesta inmune, o "la cantidad inmunizante efectiva", puede variar, dependiendo de las cepas particulares de *Campylobacter* usadas en la administración y la especie de ave a inmunizar. En términos generales, deberían administrarse al menos aproximadamente 5×10^5 células vivas para ser eficaces en la inducción de una respuesta inmune. Más preferentemente, se administran al menos 1×10^6 células vivas de *Campylobacter jejuni*.

Con la expresión "inducir una respuesta inmune" se hace referencia a que las células vivas de *Campylobacter jejuni* administradas a un huevo inducen una respuesta inmune en el ave desarrollada a partir del huevo, que a su vez proporciona cierto grado de protección a las aves contra la colonización de una especie de *Campylobacter*, que puede ser la misma o diferente que la especie de *Campylobacter* usada en la administración *in ovo*.

Una respuesta inmune inducida por la administración *in ovo* de células vivas de *Campylobacter jejuni* puede ser una respuesta inmune celular mediada principalmente por linfocitos T citotóxicos, o una respuesta inmune humoral mediada principalmente por linfocitos T auxiliares que, a su vez, activan los linfocitos conduciendo a la producción de anticuerpos, o la combinación de una respuesta inmune celular y una respuesta inmune humoral.

Según la presente invención, uno o más inmunógenos adicionales pueden ser incluidos en la administración *in ovo*. Dichos inmunógenos incluyen antígenos derivados de virus, por ejemplo el virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa aviar, el virus de la encefalomiелitis aviar, el virus del síndrome de caída de huevo, el virus de la influenza, reovirus, adenovirus, virus del síndrome de hidropericardio, entre otros, antígenos derivados de

bacterias, por ejemplo, *Haemophilus paragallinarum*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. pullori*, *S. gallinarum*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *Clostridium spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Enterococos*, entre otros, y antígenos derivados de protozoos, por ejemplo, *Eimeria tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, entre otros.

5 Mediante la expresión "administración in ovo" se hace referencia a la administración a huevos de una especie aviar, preferentemente, huevos en la cuarta parte final de la incubación. Es decir, para los huevos de gallina, la administración se realiza, preferentemente, aproximadamente entre el decimoquinto día y el decimonoveno día de incubación y, más preferentemente, aproximadamente el decimoctavo día de incubación. Para los huevos de pavo, la administración se realiza, preferentemente, aproximadamente entre el vigesimoprimer día y el vigesimosexto día de incubación y, más preferentemente, aproximadamente el vigesimoquinto día de incubación.

10 La administración puede ser realizada mediante cualquier procedimiento que resulte en la introducción de las células vivas de *Campylobacter* en un huevo a través de la cáscara. Un procedimiento de administración preferido es mediante inyección. La inyección puede realizarse en cualquier sitio de un huevo, siempre que la inyección no cause daños en los tejidos u órganos del embrión o las membranas extraembrionarias que rodean el embrión. La inyección puede conseguirse usando uno cualquiera de entre los dispositivos bien conocidos de inyección de huevos, tales como una
15 jeringa hipodérmica convencional equipada con una aguja de aproximadamente un calibre 18 a 22, o un sistema automatizado de inyección de huevos de alta velocidad, tal como se describe en las patentes US N° 4.681.063, 4.040.388, 4.469.047 y 4.593.648.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplo 1

20 Huevos de pollo de engorde fueron inyectados *in ovo* el día 18 de incubación con 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC) de *Campylobacter jejuni* UA535. Este es una cepa de *C. jejuni*, no modificada, de tipo salvaje, aislada originalmente a partir de un caso clínico humano de campilobacteriosis. Un segundo grupo de huevos permaneció sin inocular hasta el día de la eclosión, momento en el que los pollos de este grupo fueron inoculados por vía oral con 10^6 UFC de *C. jejuni* UA535. En la eclosión, se registró el número de polluelos vivos y huevos no eclosionados en cada tratamiento y todos los
25 polluelos fueron colocados en lechos de paja con 3 corrales iguales de veinte aves por tratamiento.

La inoculación *in ovo* no tuvo impacto sobre la tasa de eclosión, ya que el 97,5% de los huevos no inoculados y el 98,8% de los huevos inoculados eclosionaron. Ambos grupos tenían pesos similares en la eclosión y ganaron peso a un ritmo similar a lo largo del estudio. Las dos vías de administración de *C. jejuni* para pollos de engorde resultaron en una colonización equivalente, en términos tanto del número de aves colonizadas como del número de *C. jejuni* por gramo de
30 contenido cecal. No se observaron signos de importancia clínica en ninguna de las aves. Estos datos indican que la inoculación *in ovo* de pollos de engorde con *C. jejuni* es tan segura como la inoculación por vía oral.

La media geométrica de la titulación de anticuerpos en respuesta a la inoculación *in ovo* fue al menos tan grande como, si no mayor que, la titulación resultante de la inoculación por vía oral en el día de la eclosión. Por lo tanto, *C. jejuni* UA535, de tipo salvaje, no sólo puede administrarse *in ovo*, de manera segura, a pollos de engorde, sino que la administración por
35 esta vía resulta en una colonización y una respuesta inmune robustas.

Ejemplo 2

Para demostrar que la colonización después de la inoculación *in ovo* con *C. jejuni* no es válida solo para la cepa UA535, se evaluó la colonización de aves mediante otro aislado clínico humano, *C. jejuni* 81-176. Los grupos de huevos de pollos de engorde fueron inyectados el día 18 de la incubación embrionaria con $1,8 \times 10^5$ ó $1,4 \times 10^7$ UFC de *C. jejuni* 81-176. Un
40 tercer grupo de huevos permaneció sin inocular. Al nacer, un grupo de polluelos de los huevos no inoculados fueron retenidos como aves de control no inoculadas, y un segundo grupo de polluelos de estos huevos recibieron $8,3 \times 10^6$ UFC de *C. jejuni* 81-176, por vía oral.

El conjunto de datos recogidos demostró que la administración *in ovo* de la cepa *C. jejuni* 81-176 es al menos tan eficaz en la colonización de polluelos de engorde como la administración oral en el día de la eclosión.

Ejemplo 3

El día 18 de incubación embrionaria, un grupo de huevos de pollo de engorde fue inoculado *in ovo* con 7×10^7 UFC de *C. jejuni* CsrA. Esta cepa tiene una mutación en CsrA, una proteína implicada en la regulación global del almacenamiento de carbono. Un segundo grupo de huevos se mantuvieron como controles no inoculados. Al nacer, un grupo de polluelos de los huevos no inoculados recibieron 3×10^8 UFC de *C. jejuni* CsrA, por vía oral. Otro grupo de polluelos nacidos de huevos
50 no inoculados se mantuvieron como controles.

Los resultados indicaron que la cepa mutante de *C. jejuni* colonizó todas las aves cuando se administró *in ovo*, y solo

colonizó 3 de cada 6 aves cuando se administró por vía oral. Además, la cepa mutante era capaz de colonizar totalmente las aves e inducir una respuesta de anticuerpos cuando se administró *in ovo*, pero pareció ser menos eficaz en la colonización de las aves cuando se administró por vía oral el día de la eclosión.

Ejemplo 4

5 El día 18 de la incubación embrionaria, se inocularon *in ovo* grupos de huevos de pollos de engorde con 9×10^6 UFC de *C. jejuni* hspR, 8×10^7 UFC de *C. jejuni* HtrA o 6×10^7 UFC de *C. jejuni* Dps. La cepa HspR tiene una mutación en una proteína de choque térmico; la cepa HtrA tiene una mutación en un gen de la serina proteasa, y la cepa Dps tiene una mutación en un gen implicado en la adquisición de hierro. Otro grupo de huevos se retuvo como controles no inoculados. Al nacer, los grupos de polluelos de los huevos no inoculados recibieron 4×10^6 UFC de *C. jejuni* hspR, 1×10^8 UFC de *C. jejuni* HtrA o 1×10^8 UFC de *C. jejuni* Dps, por vía oral. Otro grupo de polluelos nacidos de huevos no inoculados se mantuvo como control.

15 La cepa mutante hspR era indetectable en las muestras de las aves inoculadas por vía oral, pero la mitad de las aves que recibieron la cepa *in ovo* fueron colonizadas con *C. jejuni*. Los resultados indican que esta cepa mutante era capaz de colonizar pollos de engorde después de una administración *in ovo*, pero no después de una administración oral en el día de la eclosión. Las otras cepas mutantes colonizaron fácilmente las aves e indujeron una respuesta inmunológica independientemente de la vía de administración.

Ejemplo 5

20 El día 18 de incubación embrionaria, se inocularon *in ovo* grupos de huevos de pollos de engorde con $7,3 \times 10^7$ UFC de *C. jejuni* flbA, $1,1 \times 10^8$ UFC de *C. jejuni* Pnp, o $1,2 \times 10^8$ UFC de *C. jejuni* SurE. La cepa flbA tiene una mutación en un gen que codifica para una proteína estructural flagelar; la cepa Pnp tiene una mutación en un gen que codifica para una nucleotidiltransferasa, y la cepa SurE tiene una mutación en un gen que codifica una fosfatasa. Otro grupo de huevos se retuvo como controles no inoculados. Al nacer, los grupos de polluelos de los huevos no inoculados recibieron $9,3 \times 10^7$ UFC de *C. jejuni* flbA, $1,6 \times 10^8$ UFC de *C. jejuni* Pnp ó 8×10^7 UFC de *C. jejuni* SurE por vía oral. Otro grupo de polluelos nacidos de huevos no inoculados se retuvo como control.

25 La cepa mutante FIBA demostró una colonización transitoria cuando se administró *in ovo*, y esta cepa mutante parecía incapaz de colonización por vía oral. La cepa mutante Pnp colonizó las aves de manera eficaz, independientemente de la vía de administración. La cepa mutante SurE colonizó las aves de manera eficaz cuando se administró *in ovo*, pero no fue capaz de colonizar las aves cuando se administró por vía oral.

Ejemplo 6

30 En el día 18 de la incubación, un grupo de huevos de pollos de engorde se inyectaron *in ovo* con 2×10^6 células de la cepa *C. jejuni* UA535, de tipo salvaje. Un segundo grupo de huevos se mantuvieron como controles no inoculados. Al nacer, un grupo de aves de los huevos no inoculados fueron inoculadas por vía oral con 2×10^6 células de *C. jejuni* UA535. Las aves restantes que nacieron de huevos no inoculados se mantuvieron como controles. A los 27 días después de la eclosión, la mitad de las aves de cada grupo recibieron agua medicada que contenía 100 mg/l de kanamicina para eliminar la cepa *C. jejuni* inmunizante. Por lo tanto, estas aves infectadas/limpiadas serían consideradas como "inmunizadas".

35 A los 34 días después de la eclosión, grupos seleccionados de aves fueron expuestas a aves infectadas previamente con *C. jejuni* CjM20, una cepa modificada genéticamente para ser resistente a la kanamicina. Este procedimiento permitió la propagación de CjM20 desde las aves infectadas a las aves "inmunizadas". Por medio de diagnósticos, era posible distinguir la cepa CjM20 de la cepa UA535 inmunizante en las muestras recogidas.

40 Las aves no medicadas, no inmunizadas, expuestas a CjM20 fueron colonizadas completamente a los 41 días de edad. La colonización se retrasó un poco mediante el tratamiento con kanamicina, con aproximadamente la mitad de las aves colonizadas el día 41. Todas las aves medicadas, no inmunizadas, expuestas, fueron colonizadas totalmente a los 49 días de edad. Ambos grupos de aves inmunizadas tenían cantidades reducidas de *C. jejuni* en comparación con sus homólogos no inmunizados. Todas las bacterias recuperadas parecían ser resistentes a la kanamicina, lo que indica que la cepa inmunizante fue eliminada por el tratamiento con kanamicina. Las aves inmunizadas, no expuestas permanecieron libres de *C. jejuni* durante todo el estudio. De esta manera, la inmunización de polluelos de engorde contra la colonización con *C. jejuni* fue al menos tan eficaz por la vía *in ovo* como por la vía oral.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni* para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un ave contra *Campylobacter*, que comprende la administración, in ovo, durante la última cuarta parte de la incubación, de la cantidad inmunizante efectiva de células vivas de un *Campylobacter jejuni*, en la que dichas células vivas de *Campylobacter jejuni* están libres de anticuerpos neutralizantes o fragmentos de anticuerpos neutralizantes.
2. Cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni* para su uso según la reivindicación 1, en la que:
- (a) dicha ave es seleccionada de entre el grupo que consiste en un pollo, un pavo y un pato; o
 - (b) las células vivas son de tipo salvaje o han sido modificadas genéticamente.
3. Cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni* para su uso según la reivindicación 2(b), en la que se ha introducido una secuencia heteróloga de polinucleótidos en las células vivas de *Campylobacter jejuni*.
4. Cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni* para su uso según la reivindicación 3, en la que dicha secuencia heteróloga de polinucleótidos codifica:
- (a) una proteína esencial en la colonización de aves domésticas por *Campylobacter*,
 - (b) un antígeno de un virus, bacteria o parásito que causa una enfermedad en un ave doméstica;
 - (c) un antígeno de un organismo que causa enfermedades en seres humanos transmitidas por los alimentos;
 - (d) una proteína que potencia el crecimiento o la eficacia de la alimentación de un ave doméstica; o
 - (e) una proteína que estimula el sistema inmune de un ave.
5. Cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni* para su uso según la reivindicación 1, que comprende además la administración de un vehículo veterinario aceptable.
6. Cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni* para su uso según la reivindicación 5, en el que el vehículo veterinario aceptable es combinado con las células vivas de *Campylobacter jejuni* previamente a la administración in ovo.
7. Cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni* para su uso según la reivindicación 1, en la que dichas células vivas de *Campylobacter jejuni* se combinan con al menos un inmunógeno seleccionado de entre un inmunógeno vírico, bacteriano o protozoico.
8. Uso de una cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni* en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un ave contra *Campylobacter*, que comprende la administración in ovo, durante la última cuarta parte de la incubación, de la cantidad inmunizante efectiva de células vivas de *Campylobacter jejuni*, en la que dichas células vivas de *Campylobacter jejuni* están libres de anticuerpos neutralizantes o fragmentos de anticuerpos neutralizantes.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que
- (a) dicha ave es seleccionada de entre el grupo que consiste en un pollo, un pavo y un pato; o
 - (b) las células vivas son de tipo salvaje o han sido modificadas genéticamente.
10. Uso según la reivindicación 9(b), en el que se ha introducido una secuencia heteróloga de polinucleótidos en las células vivas de *Campylobacter jejuni*.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha secuencia heteróloga de polinucleótidos codifica:
- (a) una proteína esencial en la colonización de aves domésticas por *Campylobacter*,
 - (b) un antígeno de un virus, bacteria o parásito que causa una enfermedad en un ave doméstica;
 - (c) un antígeno de un organismo que causa enfermedades en seres humanos transmitidas por los alimentos;
 - (d) una proteína que potencia el crecimiento o la eficacia de la alimentación de un ave doméstica; o
 - (e) una proteína que estimula el sistema inmune de un ave.

12. Uso según la reivindicación 8, que comprende además la administración de un vehículo veterinario aceptable.
 13. Uso según la reivindicación 12, en el que dicho vehículo veterinario aceptable es combinado con las células vivas de *Campylobacter jejuni* previamente a la administración *in ovo*.
 14. Uso según la reivindicación 8, en el que dichas células vivas de *Campylobacter jejuni* se combinan con al menos un inmunógeno diferente seleccionado de entre un inmunógeno vírico, bacteriano o protozooico.
- 5