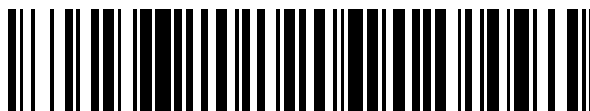


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 181**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010** **E 10720350 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 2429581**

54 Título: **Respuesta inmunitaria reforzada en especies aviares**

30 Prioridad:

14.05.2009 US 178099 P

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

05.11.2015

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)**

**Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

ABRAHAM, ALBERT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 550 181 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Respuesta inmunitaria reforzada en especies aviares

La presente invención se refiere a un procedimiento de activación inmunitaria en una especie aviar. En particular, la presente invención incluye procedimientos de provocación de respuestas respiratorias y sistémicas, inespecíficas y específicas de antígeno, que son útiles para la inmunización, vacunación y tratamientos de animales contra enfermedades infecciosas.

Las vacunas se usan para evitar enfermedades infecciosas y para tratar enfermedades establecidas. Las enfermedades infecciosas están causadas por agentes infecciosos, incluidos ejemplos tales como virus, bacterias, parásitos y otros hongos. Se han desarrollado muchos reactivos y procedimientos para evitar y tratar enfermedades infecciosas para todo tipo de especies, incluidos mamíferos aves, peces y primates.

Los programas de vacunación son particularmente importantes para animales criados con fines comerciales usados en la industria de la alimentación. Las aves son las principales dianas para muchos tipos de infecciones. Pollos, pavos y otras bandadas de aves comerciales y de cría son vacunadas de forma rutinaria para protegerlos contra la exposición ambiental a patógenos. Una de las enfermedades más importantes económicamente para la industria avícola es la enfermedad de Marek, que es una enfermedad linfoproliferativa que se produce de forma natural en los pollos. La enfermedad está causada por un herpesvirus altamente contagioso que se disemina horizontalmente y que ha sido responsable de grandes pérdidas económicas para la industria avícola. Los síntomas de la enfermedad de Marek aparecen ampliamente en los nervios, los órganos genitales, los órganos internos, los ojos y la piel de las aves infectadas y causa parálisis motora, disminución de la funcionalidad orgánica y desnutrición crónica que, en último término, conduce a la muerte.

Las aves eclosionadas quedan expuestas a microorganismos patógenos poco después del nacimiento. Aunque estas aves están protegidas inicialmente contra los patógenos por los anticuerpos derivados de la madre, esta protección solo es temporal y el propio sistema inmunitario inmaduro del ave debe comenzar a proteger al ave contra los patógenos. A menudo es deseable evitar la infección en aves jóvenes cuando son más susceptibles. También es deseable evitar la infección en aves más viejas, especialmente cuando las aves se almacenan en zonas cerradas, lo que conduce a una rápida propagación de la enfermedad.

En las bandadas más comerciales, a los polluelos recién eclosionados se les administran algunas vacunas por vía parenteral al eclosionar. Dado que la exposición a los patógenos suele producirse a una edad muy temprana, a menudo es necesario vacunarlos antes de introducirlos en las jaulas de cría o de engorde. Dicho esquema de vacunación requiera la manipulación de aves individuales e implica el posible riesgo de autoinyección accidental. Además, estas vacunas no siempre son eficaces. Los pollos jóvenes pueden quedar expuestos a una forma virulenta de una enfermedad demasiado pronto después de la vacunación antes de que tengan la oportunidad de desarrollar una inmunidad protectora adecuada.

Algunas vacunas con virus vivos se pueden administrar en los huevos antes de la eclosión de las aves. Este procedimiento se denomina "vacunación in ovo". Las aves vacunadas in ovo desarrollan resistencia a la enfermedad diana. No obstante, muchas vacunas usadas para las aves eclosionadas no se pueden usar para la vacunación in ovo debido a la patogenicidad para el embrión de los agentes de la vacuna. Los embriones en las últimas etapas son altamente susceptibles a la infección con la mayoría de los virus de las vacunas estudiadas. No todos los virus de las vacunas que no son patógenos para los pollos recién eclosionados son también seguros para los embriones en las últimas etapas. Por ejemplo, las cepas vacunales del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) y del virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) que se usan de forma rutinaria como vacunas neonatales en pollos recién eclosionados, son letales para los embriones después de su inoculación in ovo. Estos virus se han modificado para convertirlos en seguros para su uso in ovo. La modificación de los virus debilita la respuesta inmunitaria provocada y por tanto es un agente vacunal menos eficaz en la protección de los embriones en las últimas etapas.

El programa de vacunación resultante de vacunas tan dispares necesario para proporcionar protección frente a la enfermedad infecciosa y a la pérdida económica es compleja. Por tanto existe una necesidad de un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria no específica de antígeno que refuerce la protección de las aves contra enfermedades infecciosas y que sea fácil de administrar. Además, es deseable disponer de un procedimiento de provocación de una respuesta inmunitaria que proporcione una función protectora para más de un agente infeccioso. Además existe la necesidad de un procedimiento de provocación de una respuesta inmunitaria que tenga una duración mayor o que no requiera inyecciones de refuerzo de una vacuna. La presente invención proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria no específica de antígeno en las especies aviares que también disminuye la morbilidad de una bandada, proporciona una función protectora para más de un agente infeccioso y proporciona protección durante un periodo de tiempo más prolongado que otros procedimientos generalmente conocidos en la técnica.

Azita Taghavi publicó en su tesis para la obtención de un máster de la Universidad de Saskatchewan (abril, 2.008)

titulado: “Immunostimulatory effects and delivery of oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) in neonatal broilers” que la administración de ácido nucleico que contiene CpG en un vehículo de administración liposómico es capaz de proteger pollos neonatos contra infección por *E. coli*.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Fig. 1 representa gráficamente la tasa de eclosión entre grupos de huevos de pollo embrionados tratados de forma diferente. Los grupos de estudio analizados incluyen T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 10 Fig. 2 muestra gráficamente la mortalidad media diaria por jaula por día tras la eclosión. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 15 La Fig. 3 ilustra gráficamente la proporción de aves que sobreviven en cualquier día de estudio concreto por jaula sobre la base del número inicial de huevos embrionados. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 20 La Fig. 4 representa gráficamente la viabilidad de las aves tras la eclosión. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 25 La Fig. 5 ilustra gráficamente las tasas de supervivencia, las mortalidades durante la eclosión y las mortalidades después de la eclosión hasta el día 7 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 30 La Fig. 6 representa gráficamente las tasas de supervivencia, las mortalidades durante la eclosión y las mortalidades después de la eclosión hasta el día 14 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 35 La Fig. 7 representa gráficamente las tasas de supervivencia, las mortalidades durante la eclosión y las mortalidades después de la eclosión hasta el día 21 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 40 La Fig. 8 ilustra gráficamente las tasas de supervivencia, las mortalidades durante la eclosión y las mortalidades después de la eclosión hasta el día 28 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 45 La Fig. 9 representa gráficamente las tasas de supervivencia, las mortalidades durante la eclosión y las mortalidades después de la eclosión hasta el día 35 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 50 La Fig. 10 representa gráficamente las tasas de supervivencia, las mortalidades durante la eclosión y las mortalidades después de la eclosión hasta el día 45 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- La Fig. 11 muestra la tasa de mortalidad acumulada por grupo de embriones de 18 días hasta el día 45 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a *E. coli*; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- La Fig. 12 muestra la tasa de mortalidad acumulada por grupo tras la eclosión, desde el día 0 hasta el día 45 del

estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.

- 5 La Fig. 13 muestra las ganancias medias totales de peso corporal observadas desde el día 0 al día 7 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 10 La Fig. 14 muestra las ganancias medias totales de peso corporal observadas desde el día 0 al día 14 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 15 La Fig. 15 muestra las ganancias medias totales de peso corporal observadas desde el día 0 al día 21 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 20 La Fig. 16 muestra las ganancias medias totales de peso corporal observadas desde el día 0 al día 28 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 25 La Fig. 17 muestra las ganancias medias totales de peso corporal observadas desde el día 0 al día 35 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 30 La Fig. 18 muestra las ganancias medias totales de peso corporal observadas desde el día 0 al día 45 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 35 La Fig. 19 representa gráficamente el número de pollos eclosionados por grupo de estudio de los huevos de pollo embrionados. Los grupos de estudio analizados incluyen T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo más 1 dosis de vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 40 La Fig. 20 ilustra gráficamente el número de pollos vivos por grupo el día 7 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo más 1 dosis de vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo más 1 dosis de vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 45 La Fig. 21 muestra una comparación de pollos vivos y pollos muertos por grupo el día 7 del estudio.
- La Fig. 22 muestra el porcentaje de mortalidad por grupo de estudio hasta el día 7 del estudio. Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo más 1 dosis de vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos.
- 50 La Fig. 23 ilustra gráficamente el número de aves vivas al final del estudio (día 7) para cada grupo, incluidos embriones muertos, pollos muertos y pollos vivos (verde). Clave: T1, 0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T2, 0,1 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T3, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y expuestos a E. coli; T4, 10,0 µg de inmunomodulador/huevo más 1 dosis de vacuna de Marek y expuestos a E. coli; T5, 0 µg de inmunomodulador/huevo y no expuestos; y T6, 1,0 µg de inmunomodulador/huevo y no
- 55

expuestos.

La Fig. 24 representa gráficamente el porcentaje de pollos eclosionados por grupo de estudio de los huevos de pollo embrionados. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 4.

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

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

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

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

La Fig. 29 muestra el porcentaje de supervivencia para cada grupo de estudio el día 7 del estudio. Los grupos del estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 4.

15 La Fig. 30 muestra la mortalidad semanal para cada grupo de estudio hasta el día 7 y 14 del estudio. Los grupos del estudio analizados incluyen un subgrupo de los indicados en la Tabla 4.

La Fig. 31 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna contra la EM del HVPV en células de bazo la semana uno del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 5.

20 La Fig. 32 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna contra la EM del HVPV en PBMC la semana uno del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 5.

La Fig. 33 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna contra la EM del SB-1 en células de bazo la semana uno del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 5.

25 La Fig. 34 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna contra la EM del SB-1 en PBMC la semana uno del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 5.

30 La Fig. 35 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna contra la EM del HVPV en células de bazo la semana dos del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 5.

La Fig. 36 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna contra la EM del HVPV en PBMC la semana dos del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 5.

35 La Fig. 37 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna contra la EM del SB-1 en células de bazo la semana dos del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 5.

La Fig. 38 representa gráficamente el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna contra la EM del SB-1 en PBMC la semana dos del estudio. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 5.

40 La Fig. 39 representa gráficamente la reducción de la saculitis aérea en los pollos que recibieron el inmunomodulador in ovo, que se vacunaron contra la EN y que fueron expuestos. Los grupos de estudio analizados incluyen los indicados en la Tabla 7.

La Fig. 40 representa gráficamente los ELISA el día 26 para los grupos del estudio indicados en la Tabla 7.

45 La Fig. 41 representa gráficamente las tasas de supervivencia para los pollos de los grupos del estudio indicados en la Tabla 8.

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

La composición inmunomoduladora para uso en incrementar la eclosabilidad de huevo de pollo embrionado expuesto a *Escherichia coli* de la presente invención se define en las reivindicaciones.

La composición inmunomoduladora divulgada en el presente documento incluye un vehículo de administración liposómico y al menos una molécula de ácido nucleico. En particular, el inmunomodulador provoca una respuesta inmunitaria no específica de antígeno que se refuerza además con la administración de al menos un agente biológico tal como una vacuna.

- 5 Los procedimientos proporcionan nuevas estrategias de tratamiento para proteger las especies aviares de enfermedades infecciosas y para poblaciones que tienen enfermedad infecciosa. Además, usando la composición inmunomoduladora de la presente invención no hay ninguna reducción de la tasa de eclosabilidad o de la tasa de supervivencia tras la eclosión cuando el inmunomodulador se administra in ovo y no hay reducción de la tasa de eclosabilidad o de supervivencia cuando se coadministra con una vacuna. Además, la preadministración del
10 inmunomodulador antes de la administración de una vacuna refuerza adicionalmente la respuesta inmunitaria no específica de antígeno. Los procedimientos también permiten el uso seguro de vacunas disponibles previamente solo para la administración tras la eclosión para su uso in ovo. Además, el procedimiento permite la combinación de más de una vacuna con la composición inmunomoduladora. Por último, el procedimiento proporciona protección más duradera contra una enfermedad cuando el inmunomodulador se usa en combinación con una
15 vacuna.

I. Composición

a. Inmunomodulador

La composición inmunomoduladora incluye un vehículo de administración liposómico y al menos una molécula de ácido nucleico, como se describe en la patente de los EE.UU. N.º: 6.693.086 y se incorpora en el presente
20 documento por referencia.

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

Un vehículo de administración liposómico comprende una composición lipídica que es capaz de fusionarse con la membrana plasmática de una célula para administrar una molécula de ácido nucleico en el interior de una célula. En una forma de realización, cuando se administra un ácido nucleico: el complejo liposómico de la presente invención es de al menos aproximadamente 1 picogramo (pg) de proteína expresada por miligramo (mg) de proteína de tejido total por microgramo (µg) de ácido nucleico administrado. En otra forma de realización, la eficiencia de la transfección de un complejo ácido nucleico:liposoma es de al menos aproximadamente 10 pg de proteína expresada por mg de proteína de tejido total por µg de ácido nucleico administrado; y en otra forma de
35 realización más, al menos aproximadamente 50 pg de proteína expresada por mg de proteína de tejido total por µg de ácido nucleico administrado. La eficiencia de la transfección del complejo puede ser tan baja como de 1 femtogramo (fg) de proteína expresada por mg de proteína de tejido total por µg de ácido nucleico administrado, siendo más preferidas las cantidades anteriores.

40 Un vehículo de administración liposómico de la presente invención está entre aproximadamente 100 y 500 nanómetros (nm), en otra forma de realización entre aproximadamente 150 y 450 nm y en otra forma de realización más entre aproximadamente 200 y 400 nm de diámetro.

Los liposomas adecuados incluyen cualquier liposoma, tal como los usados de forma habitual en, por ejemplo, los procedimientos de administración génica conocidos por los expertos en la técnica. Los vehículos de administración liposómicos preferidos comprenden lípidos en vesículas multilaminares (VML) y lípidos extrudidos. Los procedimientos para la preparación de VML se conocen bien en la técnica. Vehículos de administración liposómicos más preferidos comprenden liposomas que tienen una composición de lípidos policationicos (es decir, liposomas catiónicos) y/o liposomas que tienen una estructura de colesterol conjugada con polietilenglicol. Ejemplos de composiciones de liposomas catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y colesterol, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) y colesterol, cloruro de 1-[2-(oleiloxy)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxietil)imidazolinio (DOTIM) y colesterol, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y colesterol y combinaciones de los mismos. Una composición liposómica más preferida para usar como vehículo de administración incluye DOTIM y colesterol.
50

Una molécula de ácido nucleico adecuada incluye cualquier secuencia de ácido nucleico tal como una secuencia codificadora o no codificadora y ADN o ARN. Las secuencias de ácido nucleico codificadoras codifican al menos una porción de una proteína o péptido, mientras que la secuencia no codificadora no codifica ninguna porción de una proteína o péptido. De acuerdo con la presente invención, ácidos nucleicos "no codificadores" pueden incluir
55

regiones reguladoras de una unidad de transcripción, tal como una región promotora. El término, "vector vacío" se puede usar de forma intercambiable con el término "no codificador" y se refiere particularmente a una secuencia de ácido nucleico en ausencia de una porción codificadora de proteína, tal como un vector plasmídico sin un inserto génico. Para provocar una respuesta inmunitaria no específica de antígeno no se requiere la expresión de una proteína codificada por la molécula de ácido nucleico; por tanto la molécula de ácido nucleico no necesariamente necesita estar unida de forma operativa a una secuencia de control de la transcripción. No obstante, se pueden obtener otras ventajas (es decir inmunidad específica de antígeno y reforzada) mediante la inclusión en la composición de la secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica un inmunógeno y/o una citocina.

Se puede lograr formar complejos de un liposoma con una molécula de ácido nucleico usando procedimientos convencionales en la técnica o tal como se ha descrito en la patente de los EE.UU. N.º: 6.693.086 y se incorpora en el presente documento por referencia. Una concentración adecuada de una molécula de ácido nucleico para añadir a un liposoma incluye una concentración eficaz para administrar una cantidad suficiente de la molécula de ácido nucleico en un sujeto de modo que se provoque una respuesta inmunitaria sistémica. Cuando la molécula de ácido nucleico codifica un inmunógeno o una citocina, una concentración adecuada de molécula de ácido nucleico para añadir a un liposoma incluye una concentración eficaz para administrar una cantidad suficiente de la molécula de ácido nucleico en una célula de modo que la célula pueda producir suficiente proteína inmunógena y/o citocina para regular la inmunidad de la célula efectora del modo adecuado. En una forma de realización, desde aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 10 µg de molécula de ácido nucleico se combinan con aproximadamente 8 nmol de liposomas, en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,5 µg hasta aproximadamente 5 µg de moléculas de ácido nucleico se combinan con aproximadamente 8 nmol de liposomas y en aún otra forma de realización, desde aproximadamente 1,0 µg de molécula de ácido nucleico se combinan con aproximadamente 8 nmol de liposomas. En una forma de realización, la proporción entre ácidos nucleicos y lípidos (µg de ácido nucleico: nmol de lípidos) en una composición es de al menos aproximadamente 1:1 de ácido nucleico: lípido en peso (es decir, 1 µg de ácido nucleico: 1 nmol de lípido) y en otra forma de realización, al menos aproximadamente 1:5 y en otra forma de realización, al menos aproximadamente 1:10 y en otra forma de realización al menos aproximadamente 1:20. Las proporciones que se expresan en el presente documento se basan en la cantidad de lípido catiónico en la composición y no en la cantidad total de lípido en la composición. En otra forma de realización, la proporción entre los ácidos nucleicos y los lípidos en una composición de la invención es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:64 de ácido nucleico: lípido en peso y en otra forma de realización, de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:50 de ácido nucleico: lípido en peso y en otra forma de realización, de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 de ácido nucleico: lípido en peso y en otra forma de realización más, de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:30 de ácido nucleico: lípido en peso. Otra proporción entre ácido nucleico: lípido es de aproximadamente 1:8 a 1:16, siendo preferida la proporción de aproximadamente 1:8 a 1:32.

b. Agente biológico

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

Agentes biológicos adecuados son agentes que son eficaces en evitar o tratar enfermedades aviares. Dichos agentes biológicos incluyen proteínas de refuerzo inmunitario, inmunógenos, vacunas o cualquier combinación de los mismos. Las proteínas de refuerzo inmunitario adecuadas son aquellas proteínas conocidas porque refuerzan la inmunidad. A modo de ejemplo no limitante, una citocina, que incluye una familia de proteínas, es una familia de proteínas reforzadoras de la inmunidad conocidas. Inmunógenos adecuados son proteínas que provocan una respuesta inmunitaria humoral y/o celular de modo que la administración del inmunógeno a un sujeto produce una respuesta inmunitaria específica del inmunógeno contra la misma proteína o contra proteínas similares que se encuentran en los tejidos del sujeto. Un inmunógeno puede incluir un antígeno patógeno expresado por una bacteria, un virus, un parásito o un hongo. Los antígenos preferidos incluyen antígenos que producen una enfermedad infecciosa en un sujeto. De acuerdo con la presente invención, un inmunógeno puede ser cualquier porción de una proteína, que se da en la naturaleza o derivada sintéticamente, que provoca una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Como tal, el tamaño de un antígeno o inmunógeno puede ser tan pequeño como de aproximadamente 5-12 aminoácidos y tan grande como una proteína de longitud completa, incluidos los tamaños intermedios. El antígeno puede ser una proteína multimérica o una proteína de fusión. El antígeno puede ser antígenos peptídicos purificados derivados de células nativas o recombinantes. Las secuencias de ácidos nucleicos de las proteínas reforzadoras inmunitarias y los inmunógenos están ligadas de forma operativa a una secuencia de control de la transcripción, de modo que el inmunógeno se expresa en un tejido de un sujeto y provoca así una respuesta inmunitaria específica de inmunógeno en el sujeto, además de la respuesta inmunitaria no específica.

En otra forma de realización de la invención, el agente biológico es una vacuna. La vacuna puede incluir una vacuna con virus vivos infecciosos o una vacuna con virus muertos, inactivados. En una forma de realización, se pueden usar una o más vacunas, vacunas con virus vivos o muertos, en combinación con la composición inmunomoduladora de la presente invención. Las vacunas adecuadas incluyen las conocidas en la técnica para las

especies aviares. Los ejemplos de vacunas, sin limitación, incluyen las usadas en la técnica para protección contra el virus de la enfermedad de Marek (VEM), el virus de la enfermedad de New Castle (VEN), el virus de la anemia del pollo (VAP), el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), el virus de la bronquitis infecciosa (VBI), el herpesvirus del pavo (HVPV), el virus de la laringotraqueítis infecciosa (VLTi), el virus de la encefalomiелitis aviar (VEA), el virus de la viruela aviar (VVA), el cólera aviar, el virus de la gripe aviar (VGA), los reovirus, el virus de la leucosis aviar (VLA), el virus de la reticuloendoteliosis (VRE), los adenovirus aviares y el virus de la enteritis hemorrágica (VEH), la coccidiosis y otras enfermedades conocidas en la técnica. En otro ejemplo, la vacuna puede ser una vacuna como se ha descrito en las patentes de EE.UU. N.ºs: 5.427.791, 6.048.535 y 6.406.702. En una forma de realización ejemplo, se puede usar una vacuna para la protección contra la enfermedad de Marek en combinación con la composición inmunomoduladora de la presente invención.

II. Procedimientos

a. Procedimientos de estimulación inmunitaria

En una forma de realización de la invención, se provoca una respuesta inmunitaria en un miembro de las especies aviares mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición inmunomoduladora al miembro de las especies aviares. La cantidad eficaz es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria en el miembro de las especies aviares. El inmunomodulador incluye un vehículo de administración liposómico y una molécula de ácido nucleico.

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

En otra forma de realización de la divulgación, se provoca una respuesta inmunitaria en un miembro de las especies aviares mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición inmunomoduladora que incluye un vehículo de administración liposómico, una molécula de ácido nucleico aislada y un agente biológico. Se contempla que el agente biológico se pueda co-administrar con el inmunomodulador o independientemente del mismo. La administración independiente puede realizarse antes o después de la administración del inmunomodulador. También se contempla que se pueda usar más de una administración del inmunomodulador o agente biológico para extender la inmunidad reforzada. Además, más de un agente biológico se puede co-administrar con el inmunomodulador, se puede administrar antes del inmunomodulador o se puede administrar después de la administración del inmunomodulador tal como se describe en los ejemplos del presente documento. En una forma de realización, la cantidad eficaz del inmunomodulador es desde aproximadamente 0,05 microgramos hasta aproximadamente 5 microgramos del vehículo de administración liposómico y de la molécula de ácido nucleico aislada y desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 30000 DICT₅₀ del agente biológico vírico. En otra forma de realización, la cantidad eficaz del inmunomodulador es desde aproximadamente 0,1 microgramos hasta aproximadamente 3 microgramos del vehículo de administración liposómico y de la molécula de ácido nucleico aislada y desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1.000 DICT₅₀ del agente biológico vírico.

b. Enfermedades

Los procedimientos de la invención provocan una respuesta inmunitaria en un sujeto de modo que el sujeto está protegido frente a una enfermedad susceptible a la provocación de una respuesta inmunitaria. Como se usa en el presente documento, la frase "protegido frente a una enfermedad" se refiere a reducir los síntomas de la enfermedad, reducir la aparición de la enfermedad y reducir la gravedad de la enfermedad. Proteger a un sujeto se puede referir a la capacidad de una composición terapéutica de la presente invención, cuando se administra a un sujeto, para evitar la aparición de una enfermedad y/o para curar o aliviar síntomas, signos o causas de la enfermedad. Como tal, proteger a un miembro de las especies aviares frente a una enfermedad incluye tanto evitar la aparición de la enfermedad (tratamiento profiláctico) como tratar a un miembro de las especies aviares que sufra una enfermedad (tratamiento terapéutico). En particular, la protección de un sujeto frente a una enfermedad se consigue provocando una repuesta inmunitaria en el miembro de las especies aviares mediante la inducción de una respuesta inmunitaria beneficiosa o protectora que además puede, en algunos casos, suprimir, reducir, inhibir o bloquear una respuesta inmunitaria hiperactiva o perjudicial. El término "enfermedad" se refiere a toda desviación de la salud normal de un miembro de las especies aviares e incluye un estado en el que están presentes síntomas de la enfermedad, así como afecciones en las que se ha producido una desviación (p. ej., infección, mutación génica, defecto genético etc.) pero todavía no se han manifestado los síntomas.

Los procedimientos de la invención se pueden usar para la prevención de la enfermedad, la estimulación de la inmunidad de células efectoras contra la enfermedad, la eliminación de la enfermedad, el alivio de la enfermedad y la prevención de una enfermedad secundaria causada por la aparición de una enfermedad primaria.

Los procedimientos de la divulgación incluyen administrar la composición para proteger de la infección por una amplia variedad de patógenos. La composición administrada puede o no incluir un antígeno específico contra el

que provocar una respuesta específica. Se contempla que los procedimientos de la invención protejan al sujeto receptor de la enfermedad producida por agentes microbianos infecciosos, incluidos, sin limitación, virus, bacterias, hongos y parásitos. Ejemplos de enfermedades víricas infecciosas incluyen, sin limitación, las producidas por la infección por el virus de la anemia infecciosa de los pollos (VAIP), el virus de la enfermedad de Marek (VEM), el herpesvirus del pollo (HVP), el herpesvirus del pavo (HTV), el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), el virus de la enfermedad de Newcastle (VEN), el virus de la bronquitis infecciosa (VBI), el virus de la laringotraqueítis infecciosa (VLTi), el paramixovirus de tipo 3, el virus de la encefalomiелitis aviar (VEA), el virus de la viruela aviar (VVA), el virus del cólera aviar, el virus de la gripe aviar (VGA), los reovirus, el virus de la leucosis aviar (VLA), el virus de la reticuloendoteliosis (VRE), el adenovirus aviar, el virus de la enteritis hemorrágica (VEH), el pneumovirus, el virus de la viruela de las palomas, recombinantes de los mismos y otros virus conocidos en la técnica. Ejemplos de infecciones bacterianas incluyen, sin limitaciones, las resultantes de la infección con bacterias grampositivas o gramnegativas y hongos, tales como *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae*, *Bordetella sp.*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium colinum*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella sp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Clostridium botulinum*, *Hemophilus gallinarum*, *Erysipelothrix insidiosa*, *Riemerella anatipestifer* (RA) y otras bacterias conocidas en la técnica. Ejemplos de infecciones por hongos o mohos incluyen, sin limitaciones, las resultantes por la infección por *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* y otros hongos o mohos infecciosos conocidos en la técnica. Ejemplos de afecciones patológicas incluyen, sin limitación, las producidas por toxinas de bacterias grampositivas o gramnegativas y hongos tales como las toxinas de *Clostridium perfringens*, la toxina de *Clostridium botulinum*, la enterotoxina de *E. coli*, las toxinas de *Staphylococcus*, la leucotoxina de *Pasteurella* y las micotoxinas de *Fusarium* y otras toxinas conocidas en la técnica. Ejemplos de parásitos incluyen, sin limitación, *Eimeria meleagridis*, *Coccidia sp.*, *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinae*, *Capillaria annulata*, *Capillaria contorta*, *Capillaria obsignata*, *Syngamus trachea* y otros parásitos conocidos en la técnica.

c. Sujetos

Los procedimientos de la divulgación se pueden administrar a cualquier sujeto o miembro de las especies aviares, ya sea doméstica o silvestre. En particular, se puede administrar a los sujetos que se crían con fines comerciales para cría, carne o producción de huevos. Sujetos aviares adecuados incluyen, sin limitación, pollos, pavos, gansos, patos, faisanes, codornices, palomas, avestruces, aves de jaula, aves de colecciones en zoológicos y aviarios y similares. En una forma de realización, el miembro de las especies aviares se selecciona del grupo compuesto por pollos o pavos. Un experto en la técnica apreciará que los procedimientos de la invención serán considerablemente beneficiosos para las aves criadas en jaulas criadoras de alta densidad, tales como pollos de engorde y ponedores, ya que son especialmente vulnerables a la exposición ambiental a agentes infecciosos.

d. Administración

Se dispone de diversas vías de administración. El modo concreto seleccionado dependerá, por supuesto, de los agentes biológicos concretos seleccionados, la edad y el estado de salud general del sujeto, la afección concreta que se esté tratando y la dosis requerida para conseguir eficacia terapéutica. Los procedimientos de la presente invención pueden ponerse en práctica usando cualquier modo de administración que produzca niveles eficaces de una respuesta inmunitaria sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Las composiciones pueden presentarse cómodamente en forma de monodosis y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica.

La vacunación de las aves puede llevarse a cabo a cualquier edad. Normalmente, se llevan a cabo vacunaciones en embriones de 18 días (in ovo) y mayores con un microorganismo vivo y de 3 semanas y mayores con un microorganismo inactivado u otro tipo de vacuna. Para la vacunación in ovo, la vacunación se puede realizar en el último cuarto del desarrollo del embrión. La vacuna puede administrarse por vía subcutánea, en el folículo de la pluma, mediante pulverización, por vía oral, intraocular, intratraqueal, nasal, in ovo o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. La vacuna oral se puede administrar en el agua de bebida. Además, se contempla que los procedimientos de la invención pueden usarse según programas de vacunación rutinarios. En una forma de realización, la composición inmunomoduladora de la presente invención se administra in ovo. En otra forma de realización, la composición inmunomoduladora se administra en forma de pulverización tras la exposición a *E. coli*.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración en el momento, administración retardada o administración sostenida. Dichos sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de las composiciones lo que aumenta de este modo la comodidad. Se dispone de muchos tipos de sistemas de administración de liberación y se conocen por el experto en la técnica. Incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. En, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º: 5.075.109 se describen microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos, incluidos esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y

ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogeles; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; pastillas comprimidas usando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente condensados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a sistemas erosionales en los que un agente de la invención está contenido en una forma dentro de una matriz tales como los descritos en las patentes de EE.UU. N.ºs: 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152 y sistemas difusionales en los que un componente activo atraviesa un polímero a una velocidad controlada, tales como los que se describen en las patentes de EE.UU. N.ºs: 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además se pueden usar sistemas de administración en hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

Dado que se podrían realizar varios cambios en la composición, productos y procedimientos anteriores sin desviarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y en los ejemplos que se proporcionan más adelante se interprete como ilustrativa y no en un sentido limitante.

Definiciones

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de inmunomodulador para tratar o evitar una enfermedad infecciosa es la cantidad necesaria para causar el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica de antígeno tras la exposición al microbio, de modo que se produzca una reducción en la cantidad del microbio dentro del sujeto y preferentemente la erradicación del microbio. La cantidad eficaz para una aplicación concreta puede variar en función de factores tales como la enfermedad o afección que se está tratando, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de inmunomodulador sin necesitar experimentación excesiva.

El término "citocina" se refiere a una familia de proteínas reforzadoras de la inmunidad. La familia de citocinas incluye factor de crecimiento hematopoyético, interleucinas, interferones, las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, las moléculas de la familia del factor de necrosis tumoral y las quimiocinas (es decir, las proteínas que regulan la migración y la activación de las células, particularmente las células fagocíticas). Entre los ejemplos de citocinas se incluyen, sin limitación, interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), interleucina 18 (IL-18), interferón- α (IFN α) e interferón- α (IFN α).

El término "provocar" puede usarse de forma intercambiable con los términos activar, estimular, generar o regular por incremento.

La expresión "provocar una respuesta inmunitaria" en un sujeto se refiere a controlar específicamente o influir en la actividad de la respuesta inmunitaria y puede incluir activar una respuesta inmunitaria, regular por incremento una respuesta inmunitaria, reforzar una respuesta inmunitaria y/o alterar una respuesta inmunitaria (tal como provocando un tipo de respuesta inmunitaria que a su vez cambie el tipo prevalente de respuesta inmunitaria en un sujeto de una que es perjudicial o ineficaz a una que es beneficiosa o protectora).

La expresión "ligado de forma operativa" se refiere a unir una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la transcripción de un modo tal que la molécula puede ser expresada cuando se transfecta (es decir, se transforma, transluce o transfecta) en una célula huésped. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, la elongación y la terminación de la transcripción. Secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tales como las secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Los expertos en la técnica conocen una diversidad de tales secuencias de control de la transcripción. Entre las secuencias de control de la transcripción preferidas se incluyen las que funcionan en células de aves, peces, mamíferos, bacterias, plantas e insectos. Aunque con la invención se puede usar cualquier secuencia de control de la transcripción, las secuencias pueden incluir secuencias de control de la transcripción que se dan en la naturaleza asociadas con una secuencia que codifica un inmunógeno o una proteína estimuladora inmune.

Las expresiones "molécula de ácido nucleico" y "secuencia de ácido nucleico" se pueden usar de forma intercambiable e incluyen AD, ARN o derivados bien de ADN o bien de ARN. Las expresiones también incluyen oligonucleótidos y secuencias más grandes, incluidas moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína o un fragmento de la misma y moléculas de ácido nucleico que comprenden regiones reguladoras, intrones u otros ADN o ARN no codificantes. Normalmente, un oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico de una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 nucleótidos y más normalmente, de al menos aproximadamente 5 nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede derivar de cualquier fuente, incluidas fuentes de mamíferos, de peces, de bacterias, de insectos, de virus, de plantas o sintéticas. Una molécula de ácido nucleico se puede producir mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como tecnología de ADN recombinante (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación, clonación) o síntesis química. Las moléculas de ácidos nucleicos incluyen moléculas de ácidos nucleicos naturales y homólogos de las mismas, incluyendo, pero sin limitación, variantes alélicas naturales y moléculas de ácido nucleico modificadas en las que se han insertado, delecionado, sustituido o invertido nucleótidos de tal manera que dichas modificaciones no interfieren

sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico para codificar un inmunógeno o una proteína estimuladora de inmunidad útil en los procedimientos de la presente invención. Se puede producir un homólogo de ácido nucleico usando una serie de procedimientos conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989). Los expertos en la materia conocen técnicas para la detección selectiva de inmunogenicidad, tal como inmunogenicidad del antígeno patógeno o la actividad de las citocinas e incluyen una diversidad de ensayos in vitro e in vivo.

Ejemplos

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

Ejemplo 1. Materiales y procedimientos.

Immunomodulador

El inmunomodulador usado en el presente estudio era una composición comprendiendo un lípido catiónico y ADN no codificante. Se formularon los componentes lipídicos inmunomoduladores sintéticos cloruro de [1-[2-[9-(Z)-octadecenoiloxi]]-2-[8](Z)-heptadecenil]-3-[hidroxietil]imidazolinio (DOTIM) y un colesterol lipídico neutro sintético para producir liposomas de un diámetro de aproximadamente de 200 nm (véase la patente de EE.UU. 6.693.086). El componente de ADN fue un plásmido de ADN no codificante de 4292 pares de bases (pMB 75,6) producido en *E. coli*, que, al estar negativamente cargado, se asocia con los liposomas cargados positivamente (catiónicos) (véase, la patente de EE.UU. 6.693.086).

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

Grupo	Dosis diana (microgramos/huevo)	Dosis calculada (microgramos)	Volumen de partida (ml)	Diluyente (D5W) (ml)	Volumen total (ml)	Volumen de la dosis por animal (ml)
T1	0	0	0	25,00	25,00	0,05
T2	0,1	0,11	0,15	24,85	25,00	0,05
T3	1,0	1,02	1,50	23,50	25,00	0,05
T4	10,0	9,97	14,70	10,3	25,00	0,05
T5	0	0	0	25,00	25,00	0,05
T6	1,0	1,02	1,50	23,50	25,00	0,05

Animales del estudio

Huevos de pollo disponibles comercialmente (de engorde para carne) se miraron al trasluz para determinar la viabilidad a los 18 días de incubación. En los estudios se incluyeron los embriones sanos y los embriones infértiles, muertos y no sanos se descartaron. Los pollos se introdujeron en una jaula para pollos cubierta lateralmente de estilo California convencional. En cada jaula había 50 aves de ambos sexos introducidas el día 0. Los pollos se alimentaron con raciones que cumplían las recomendaciones del MRC para la edad y el peso de los animales del estudio y los pollos tenían acceso *ad libitum* al agua proporcionada a través de un administrador de agua con una campana fijado al suministro de agua para cada jaula.

Infección y exposición experimentales

Los pollos se expusieron a organismos para determinar la eficacia de la respuesta inmunitaria. La exposición, o infección experimental, incluyó la exposición a un inóculo de organismos tales como *Escherichia coli* (*E. coli*). Los organismos se usaron a una concentración de $2,63 \times 10^5$ y se administraron mediante pulverización de 0,15 ml del inóculo sobre cada huevo embrionado mientras están en la bandeja de eclosión.

Ejemplo 2. La administración del inmunomodulador aumenta la eclosión.

Se realizó un estudio para determinar la eficacia de un inmunomodulador, tal como se describe en el ejemplo 1, administrado en huevos de pollo embrionados de 18 días seguido por la exposición a *Escherichia coli* (*E. coli*). El estudio incluyó dos grupos (Tabla 2), un grupo expuesto a *E. coli* (T1-4) y el otro no expuesto (T5 y T6). Dentro del grupo expuesto a *E. coli* había cuatro subgrupos a cada uno de los que se administró una dosis diferente de inmunomodulador, incluidas las dosis de nada (T1), 0,1 µg (T2), 1,0 µg (T3) y 10,0 µg (T4). El grupo no expuesto

incluyó dos subgrupos en los que no se administró inmunomodulador (T5) o se administró 1,0 µg de inmunomodulador (T6).

Tabla 2. Grupos de tratamiento del estudio.

Grupo	Inmunomodulador	Exposición a E. coli
T1	0	Sí
T2	0,1 µg/kg	Sí
T3	1,0 µg/kg	Sí
T4	10,0 µg/kg	Sí
T5	0	No
T6	1,0 µg/kg	No

En el día 0 del estudio, se realizó la inyección in ovo en los huevos embrionados de 18 días que reciben inmunomodulador. En el día 1, se pulverizó a cada uno de los huevos embrionados de 19 días de los grupos expuestos (T1-T4) con 0,15 ml de los inóculos que contenían E. coli a una concentración de $2,63 \times 10^5$.

El análisis de todos los grupos tuvo como resultado un efecto de tratamiento estadísticamente significativo sobre la eclosabilidad de los huevos embrionados. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos control no expuestos (T5, 0 µg/kg al 91 % frente a T6, 1,0 µg/kg al 89 %). Además, la comparación entre los dos grupos no tratados (T1-expuestos y T5-no expuestos) tuvo como resultado la eclosión de más huevos embrionados en el grupo de no expuestos (85 % frente al 91 %, respectivamente). Por tanto, el modelo de exposición se confirmó como modelo efectivo para evaluar las tasas de eclosión.

Para los grupos tratados con el inmunomodulador, en el grupo T3 (1,0 µg/kg-huevos tratados) eclosionaron más aves (91,5 %) que bien en el grupo no tratado/expuesto T1 (84,5 %) o bien en el grupo T4 (10,0 µg/kg-huevos tratados (85 %) (Fig. 1). Se mostraron diferencias similares entre el grupo control de no tratados/no expuestos (T5) y estos mismos dos grupos de tratamiento (T1, como se ha indicado en lo que antecede y T4). No se mostraron otros hallazgos significativos entre ninguna de las comparaciones pareadas por grupos restantes (Fig. 1).

No hubo diferencias significativas sobre la proporción de aves que mueren por jaula, por grupo, por día del estudio. (Fig. 2). La proporción de aves que sobrevive a cualquier día de estudio concreto no tuvo como resultado ninguna interacción estadísticamente significativa entre el tratamiento y el tiempo, pero sí mostró un efecto significativo del tratamiento (Fig. 3). Las aves de los grupos T3, T5 y T6 tenían un número significativamente mayor de aves cualquier día en comparación con los grupos T1, T2 y T4. Además, las aves de T5 tenían un número significativamente mayor de aves vivas que T3. La evaluación de la viabilidad de las aves tras la eclosión tuvo como resultado hallazgos significativos similares a los indicados en lo que antecede (Fig. 4 a Fig. 12).

No hubo diferencias significativas en los pesos de las jaulas observados los días 7, 14, 21 o 28 (Fig. 13 a Fig. 16). Los análisis de los pesos totales de las jaulas el día 35 tuvieron como resultado una diferencia significativa entre los grupos T5 y T2 (una media de 87 kg frente a 75 kg, respectivamente) (Fig. 17). Los pesos de las jaulas al final del estudio (día 45) fueron mayores para los grupos T5 (120 kg) y T6 (117 kg) en comparación con los grupos T1 (105 kg) y T5 cuando se compararon con T2 (106 kg) y T4 (105 kg) (Fig. 18).

En resumen, se evaluó el efecto del inmunomodulador cuando se administró in ovo antes de la infección por E. coli en aves de engorde comerciales. Para los grupos tratados con el inmunomodulador, en el grupo T3 eclosionaron más aves (92 %) que en cualquiera de los grupos no tratados/expuestos T1 (85 %) o el grupo T4 (85 %). Se mostraron diferencias similares entre el grupo control de no tratados/no expuestos (T5) y los mismos grupos de tratamiento T1y T4. No hubo diferencias significativas en la mortalidad (Fig. 2 a Fig. 12) y los pesos corporales (Fig. 13 a Fig. 18). En este estudio, el inmunomodulador fue eficaz a la hora de incrementar la eclosabilidad de los huevos de engorde comerciales expuestos a E. coli antes de la eclosión, especialmente a la dosis de 1,0 µg lo que indica inmunidad reforzada entre los grupos que recibieron el inmunomodulador.

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

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

inmunomodulador (T6).

Tabla 3. Grupos de tratamiento del estudio.

Grupo	Administración in ovo	Número de huevos embrionados	Número de jaulas
T1	0 µg de inmunomodulador/huevo	1000	12
T2	0,1 µg de inmunomodulador/huevo	1000	12
T3	1,0 µg de inmunomodulador/huevo	1000	12
T4	1,0 µg de inmunomodulador + 1 dosis de vacuna de Marek/huevo	1000	12
T5	0 µg de inmunomodulador/huevo	1000	12
T6	1,0 µg de inmunomodulador/huevo	1000	12

Los huevos para engorde comercial se incubaron durante 18 días, se miraron al trasluz para determinar la viabilidad y después se realizó la inyección in ovo de los huevos embrionados de 18 días con el inmunomodulador. A continuación, se pulverizó a cada uno de los huevos embrionados de 19 días de los grupos expuestos con 0,15 ml de los inóculos que contenían *E. coli* a una concentración de $2,8 \times 10^7$ por mililitro. Los huevos eclosionaron el día 0 del estudio, que se extendió durante 45 días.

El número de huevos embrionados eclosionados se registraron para cada grupo ($n = 1000$ por grupo o bandeja de eclosión) (Fig. 19). De los pollos eclosionados, se registró el número de pollos que seguían vivos el día 7 después de la eclosión (Fig. 20). También se registró el número de pollos vivos/muertos por grupo el día 7 después de la eclosión (Fig. 21). El porcentaje de mortalidad disminuyó con cantidades crecientes del inmunomodulador en los grupos expuestos y la co-administración de la vacuna de Marek con el inmunomodulador disminuyó adicionalmente el porcentaje de mortalidad (Fig. 22).

Los datos demuestran que no había reducción de la eclosabilidad entre los grupos tratados con inmunomodulador y los grupos no tratados que no habían sido expuestos a *E. coli* (Fig. 23). La eclosabilidad fue significativamente mayor entre los grupos tratados con el inmunomodulador y los grupos no tratados que se expusieron a *E. coli*. La eclosabilidad de los huevos embrionados que recibieron el inmunomodulador y una dosis de la vacuna de Marek fue similar a la de los grupos control no tratados y no expuestos. En resumen, el inmunomodulador incrementa la eclosabilidad en condiciones de exposición y la respuesta protectora del inmunomodulador se refuerza con la co-administración de la vacuna de Marek. Los resultados indican que se provoca una respuesta inmunitaria no específica de antígeno con la administración del inmunomodulador o del inmunomodulador y la vacuna de Marek.

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

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

Tabla 4. Grupos de tratamiento del estudio.

Grupo	Administración In ovo	Número de pollos	Vacunación contra la enfermedad de Marek (embriones de 18 días)	Embriones de 18 días tratados con inmunomodulador	Embriones de 19 días expuestos a E. coli	Pollos tratados el día 0 con inmunomodulador
T1	0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	Sí	No	No	No
T2	0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	Sí	No	Sí	No
T3	1,0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	Sí	No	No	Sí
T4	1,0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	Sí	No	Sí	Sí
T5	1,0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	Sí	Sí	No	No
T6	1,0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	Sí	Sí	Sí	No
T7	1,0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	Sí	Sí	No	Sí
T8	1,0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	Sí	Sí	Sí	Sí
T9	0 µg de inmunomodulador/ huevo	400	No	No	No	No

Los huevos para engorde comercial se incubaron durante 18 días, se miraron al trasluz para determinar la viabilidad y después se realizó la inyección in ovo de los huevos embrionados de 18 días con el inmunomodulador. A continuación, se pulverizó a cada uno de los huevos embrionados de 19 días de los grupos expuestos con 0,15 ml de los inóculos que contenían *E. coli* a una concentración de $2,63 \times 10^7$ por mililitro. Los huevos eclosionaron el día 0 del estudio, que se extendió durante 45 días.

Para cada grupo se calculó el porcentaje de huevos embrionados eclosionados (Fig. 24). De los pollos eclosionados, se calculó el porcentaje de mortalidad el día 7 después de la eclosión para los grupos expuestos (Fig. 26) y no expuestos (Fig. 25). Los grupos expuestos demostraron mayores porcentajes de mortalidad que los grupos no expuestos tratados de forma similar (Fig. 27). El porcentaje de pollos vivos por grupo se calculó desde la eclosión hasta el día 7 (Fig. 28) así como desde el día 3 (embriones vivos de 18 días) al día 7 (Fig. 29, $n = 400$). Hubo una tasa de supervivencia significativamente mayor para las aves tratadas con el inmunomodulador antes de la exposición ($>98,2\%$, Fig. 28) en comparación con el grupo control que fue expuesto ($82,2\%$, Fig. 28). Asimismo, hubo una tasa de supervivencia significativamente mayor el día 7 para las aves tratadas en la eclosión con inmunomodulador antes y después de la exposición el día 7 (95% , Fig. 28) en comparación con los grupos control expuestos ($82,2\%$, Fig. 28). Estos resultados se resumieron usando un grupo que contenía 400 huevos por grupo (Fig. 29). Hubo una tasa de supervivencia mayor el día 7 para los embriones tratados antes de la exposición (grupo 400) ($>94,3\%$, Fig. 29) en comparación con el grupo control ($67,0\%$, Fig. 29). De forma similar, hubo una tasa de supervivencia significativamente mayor para las aves tratadas con el inmunomodulador in ovo ($97,4\%$, Fig. 30), sin segundo tratamiento, el día 14 se comparó con el grupo control expuesto ($81,9\%$, Fig. 30). Hubo un número de aves vivas significativamente mayor el día 14 en el grupo tratado con el inmunomodulador el día 1 de vida, después de la exposición, $93,9\%$ (Fig. 30), sin primer tratamiento, en comparación con el grupo control $81,9\%$ (Fig. 30). También hubo un número de aves vivas significativamente mayor el día 14 en el grupo tratado con el inmunomodulador in ovo y después en el día 1 de vida, $95,8\%$ (Fig. 30), en comparación con el grupo control $81,9\%$ (Fig. 30). La Fig. 30 muestra la mortalidad semanal de los grupos expuestos y no expuestos con diferentes tratamientos.

Los datos demuestran que no había reducción en la eclosabilidad entre los grupos tratados con el inmunomodulador (tratados una o dos veces) y los grupos no tratados que no se habían expuesto a *E. coli*. La eclosabilidad fue mayor en los grupos que se trataron con el inmunomodulador antes de la exposición a *E. coli*. Este efecto se reforzó cuando el inmunomodulador se co-administró con la vacuna de Marek. Asimismo, el tratamiento con el inmunomodulador correlacionó con una disminución de la mortalidad entre los grupos no expuestos. La mortalidad se disminuyó adicionalmente con la co-administración de la vacuna de Marek y el pre-tratamiento con el inmunomodulador antes de la administración del inmunomodulador con la vacuna de Marek. Estos resultados se resumieron en los grupos expuestos. En resumen, el inmunomodulador incrementa la eclosión en condiciones de exposición y la respuesta protectora del inmunomodulador se refuerza con la co-administración de la vacuna de Marek. Los resultados indican que la respuesta inmunitaria no específica de antígeno provocada por la administración del inmunomodulador se refuerza cuando su administración se acompaña con la vacuna de Marek. La co-administración del inmunomodulador con la vacuna de Marek refuerza adicionalmente la respuesta inmunitaria no específica de antígeno.

Ejemplo 5. La administración del inmunomodulador tras la infección que provoca una respuesta inmunitaria no específica de antígeno que se refuerza con la administración adicional de un agente biológico.

Hubo una tasa de supervivencia significativamente mayor para las aves tratadas con el inmunomodulador después de la exposición ($>95\%$, Fig. 28) en comparación con los grupos control expuestos ($82,2\%$, Fig. 28). Estos resultados se resumieron usando un grupo que contenía 400 huevos por grupo (Fig. 29).

Los resultados indican que la respuesta inmunitaria no específica de antígeno provocada por la administración del inmunomodulador tras la exposición a *E. coli* se refuerza cuando su administración se acompaña con la vacuna de Marek. La administración del inmunomodulador después de la vacuna de Marek reforzó la respuesta inmunitaria no específica de antígeno.

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

Se realizó un estudio para determinar si un inmunomodulador afectaría de forma negativa a la replicación temprana de la vacuna bivalente de la enfermedad de Marek. La vacuna bivalente de la enfermedad de Marek incluye el HVPV (herpesvirus del pavo) y el SB1 (herpesvirus del pollo).

Se incubaron huevos de engorde comerciales durante 18 días, se miraron al trasluz para determinar la viabilidad. Los huevos se separaron en 3 grupos, A-C con 20 huevos por grupo. Cada huevo se vacuno según se indica en la Tabla 5.

Tabla 5: Tratamiento

Grupo de tratamiento	Administración in ovo	Número de huevos embrionados de 18 días (huevos que han eclosionado)	Vacunación contra la enfermedad de Marek (embriones de 18 días)	Tratamiento de embriones de 18 días con inmunomodulador
A	0 µg de inmunomodulador/huevo	20 (12)	HVPV-SB1	No
B	1,0 µg de inmunomodulador/huevo	20 (18)	HVPV-SB1	Sí
C	0 µg de inmunomodulador/huevo	20 (14)	Ninguno	No

Para evaluar el efecto del inmunomodulador sobre la replicación del virus vacunal in vivo, se reaisló el virus a los 7 y 14 días después de la colocación a partir tanto de las células de bazo (SPC) como de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

5 Como se sabe que la infección por el virus de la vacuna de la EM varía de un ave a otra a nivel de la replicación del virus, el reaislamiento se realizó usando grupos triplicados de pollos (2 pollos por grupo, 3 grupos por punto de muestra).

10 A pesar de la variabilidad entre grupos, hay una clara tendencia en la replicación del HVPV y del SB-1 en presencia del inmunomodulador. Este dato fue el más significativo para la replicación del SB-1 durante la primera semana, pero las tendencias globales para HVPV y SB-1 fueron similares para ambos tejidos en ambos puntos de tiempo (7 y 14 días después de la eclosión). El dato se resume en las Fig. 31 a Fig. 38. La Fig. 31 muestra el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna de la EM del HVPV en células de bazo en la semana 1. La Fig. 32 muestra el efecto del inmunomodulador sobre la replicación en la vacuna de la EM del HVPV en PBMC en la semana 1. La Fig. 33 muestra el efecto del inmunomodulador sobre la replicación en la vacuna de la EM del SB-1 en células de bazo en la semana 1. La Fig. 34 muestra el efecto del inmunomodulador sobre la replicación en la vacuna de la EM del SB-1 en PBMC en la semana 1. Fig. 35 muestra el efecto del inmunomodulador sobre la replicación de la vacuna de la EM del HVPV en células de bazo en la semana 2. La Fig. 36 muestra el efecto del inmunomodulador sobre la replicación en la vacuna de la EM del HVPV en PBMC en la semana 2. La Fig. 37 muestra el efecto del inmunomodulador sobre la replicación en la vacuna de la EM del SB-1 en células de bazo en la semana 2. La Fig. 38 muestra el efecto del inmunomodulador sobre la replicación en la vacuna de la EM del SB-1 en PBMC en la semana 2.

El inmunomodulador no tiene un impacto negativo sobre la replicación de la vacuna de la EM. El inmunomodulador parece tener un efecto adyuvante que incrementa la replicación del HVPV y el SB-1 las primeras dos semanas después de la infección. Este dato sugiere que el inmunomodulador tendría un impacto positivo sobre la eficacia de la vacuna de la EM.

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

Se realizó un estudio para determinar el efecto del inmunomodulador con una vacuna contra la enfermedad de New Castle con microorganismos vivos modificados en pollos expuestos a la enfermedad de New Castle. El estudio incluyó nueve grupos que se trataron de forma diferente como se indica en la tabla 6.

30 Tabla 6. Grupos de tratamiento del estudio.

Día	Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
-3	Inmunomodulador (µg) in ovo				0,112	0,56	1,12			
	PBS in ovo	X	X	X				X	X	X
0	Se incluirán en el estudio pollos asignados al azar	X	X	X	X	X	X	X	X	X

(continuación)

Día	Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
0	Obtener sangre para títulos anti-VEN de pollos sacrificados del estudio	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Inmunomodulador (µg) por aerosol							0,112	0,56	1,12
	Inmunomodulador en aerosol			X	X	X	X	X	X	X
	PBS en aerosol	X	X							
7	Obtención de sangre para títulos anti VEN	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	Obtención de sangre para títulos anti VEN	X	X	X	X	X	X	X	X	X
21	Obtención de sangre para títulos anti VEN	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Exposición al VEN		X	X	X	X	X	X	X	X
22-26	Observación de signos clínicos de infección por VEN	X	X	X	X	X	X	X	X	X
26	Patología macroscópica para la saculitis aérea	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Histopatología traqueal	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Se incubaron huevos de engorde comerciales durante 18 días, se miraron al trasluz para determinar la viabilidad. Los huevos se separaron en 9 grupos, T1-T9 con 60 huevos por grupo. El grupo T9 sufrió un ataque por parásitos la primera noche después de la eclosión y hubo algunas muertes por causas desconocidas durante el curso del estudio. En el momento de la selección, el número de aves por grupo fue el enumerado en la tabla 7.

5

Tabla 7. Aves por grupo

Grupo	Tratamiento	Número de aves
1	Sin tratamiento, sin exposición	60
2	Solo exposición	60
3	Vacuna + Exposición	60
4	Vacuna + Exposición + 0,112 µg del inmunomodulador in ovo	58
5	Vacuna + Exposición + 0,56 µg del inmunomodulador in ovo	58
6	Vacuna + Exposición + 1,12 µg del inmunomodulador in ovo	57
7	Vacuna + Exposición + 0,112 µg del inmunomodulador en aerosol	60
8	Vacuna + Exposición + 0,56 µg del inmunomodulador en aerosol	59
9	Vacuna + Exposición + 1,12 µg del inmunomodulador en aerosol	50

En los huevos embrionados de 18 días en los grupos T4-T6 se inyectó el inmunomodulador in ovo. En los grupos

T1-T3 y T7-T9 se inyectó solución salina. El día 0, los huevos eclosionaron y en los pollos de los grupos T1-T2 se pulverizó solución salina, los grupos T3-T6 recibieron la vacuna de la enfermedad de New Castle, Newhatch-C2 fabricada por Intervet/Schering-Plough Animal Health, en los grupos T7-T9 se pulverizó el inmunomodulador y se vacunaron.

- 5 El suero se obtuvo para los títulos anti-VEN en los días 7, 14 y 21 después de la eclosión. El día 21 los grupos de pollos T2-T9 se expusieron al virus lentogénico de la enfermedad de Newcastle. El día 26 se sacrificaron los pollos, se les extrajo sangre y se realizó un examen de patología macroscópica para detectar saculitis aérea y se realizó el análisis del suero.

- 10 Los datos demuestran que no había diferencia significativa en la serología entre los grupos los días 7, 14 y 21. No obstante, el día 26, que fue 5 días después de la exposición, las aves que habían recibido el inmunomodulador in ovo presentaban títulos anti-VEN espectacularmente elevados por encima de todos los otros grupos incluido el que recibió la vacuna sola (Fig. 40).

- 15 La saculitis aérea se redujo espectacularmente entre T2-T5, los pollos que habían recibido el modulador in ovo (Fig. 39). Los resultados indican que la administración in ovo del inmunomodulador no interfiere en la vacunación con el VEN.

Ejemplo 8. Eficacia de la administración del inmunomodulador con agente biológico en una exposición virulenta

- 20 Se realizó un estudio para evaluar la interferencia de una monodosis del inmunomodulador con la vacunación de rutina frente a la enfermedad de Marek en huevos embrionados de 18 días. El estudio comparó la eficacia de la vacunación de la enfermedad de Marek contra una exposición virulenta.

- 25 Un total de 160 huevos embrionados se dividieron en 8 grupos. En la eclosión cada ave propagadora se inoculó con el virus de la enfermedad de Marek, el día 0 del estudio. El número de aves propagadoras que eclosionaron fue de 148 de 160 (véase la tabla 8 más adelante para el número inicial de huevos/aves frente al número real de aves al final del estudio entre paréntesis). Después de tres semanas, a cada grupo se añadieron 80 aves más, 15 aves no vacunadas ni tratadas (contactos) y 65 aves tratadas (vacunadas) (véase la tabla 8 más adelante para consultar el tratamiento de cada grupo).

Tabla 8: Tratamiento

Estancia	Grupo	Vacuna	Dosis	Vía	Propagadora	Contactos	Vacunados
2	A	HVPV/SB1	1X	in ovo	20 (19)	15 (15)	65 (59)
3	B	HVPV/SB1 + Inmunomodulador	1X	in ovo	20 (19)	15 (15)	65 (58)
4	A	HVPV/SB1	1X	in ovo	20 (19)	15 (15)	65 (58)
5	B	HVPV/SB1 + Inmunomodulador	1X	in ovo	20 (19)	15 (15)	65 (58)
6	A	HVPV/SB1	1X	in ovo	20 (18)	15 (14)	65 (59)
7	B	HVPV/SB1 + Inmunomodulador	1X	in ovo	20 (18)	15 (14)	65 (58)
8	A	HVPV/SB1	1X	in ovo	20 (18)	15 (14)	65 (59)
9	B	HVPV/SB1 + Inmunomodulador	1X	in ovo	20 (18)	15 (14)	65 (57)

- 30 El día 42 del estudio, las aves propagadoras supervivientes se retiraron y se les realizó la necropsia. El día 63 del estudio (día 42 para los contactos y los vacunados), las aves del estudio supervivientes se retiraron y se les realizó la necropsia.

- 35 La Fig. 41 muestra las curvas de supervivencia de aves propagadoras inoculadas, aves contacto no vacunadas, aves únicamente vacunadas, aves vacunadas/inmunomodulador. El dato de los contactos no vacunados es la media de 8 jaulas, mientras que cada grupo vacunado es la media de 4 jaulas cada uno. Como se puede observar, existe una similitud en la pendiente de las curvas de supervivencia para las aves únicamente vacunadas y las vacunadas/inmunomodulador.

La Fig. 42 muestra la incidencia media de la enfermedad de Marek entre las aves propagadoras inoculadas, aves contacto no vacunadas, solo aves vacunadas, aves vacunadas/inmunomoduladores. Los datos de las aves propagadoras y las aves contacto son la media de 8 jaulas, mientras que los de los grupos vacunados es la media de 4 jaulas cada uno. Como se puede observar, el grupo de únicamente vacunadas y el grupo de vacunadas/inmunomodulador tenían una incidencia mucho menor de la enfermedad de Marek. El grupo de vacunadas/inmunomodulador tenía una incidencia menor de la enfermedad de Marek que el grupo de únicamente vacunadas.

Como se puede observar desde la Fig. 41 hasta la Fig. 42, el inmunomodulador no tiene un efecto perjudicial sobre la protección de la vacuna de la enfermedad de Marek. De hecho, provocó un incremento en la eficacia de la vacuna.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunomoduladora, en la que la composición inmunomoduladora comprende:
 - a. un vehículo de administración liposómico catiónico; y
 - b. una molécula de ácido nucleico, en la que la molécula de ácido nucleico es un vector de ácido nucleico derivado de bacterias aislado sin un inserto génico, o un fragmento del mismo,
- 5 para uso en incrementar la eclosabilidad de un huevo de pollo embrionado expuesto a *Escherichia coli* por administración in ovo al huevo de desde 0,05 hasta 10 microgramos de la composición inmunomoduladora.
2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en la que el vehículo de administración liposómico comprende lípidos seleccionados del grupo que consiste en lípidos de vesículas multilaminares y lípidos extrudidos.
- 10 3. La composición para su uso de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el vehículo de administración liposómico comprende pares de lípidos seleccionados del grupo que consiste en DOTMA y colesterol; DOTAP y colesterol; DOTIM y colesterol y DDAB y colesterol.
4. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la molécula de ácido nucleico es un plásmido de ADN.
- 15 5. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que desde 0,1 hasta 5 microgramos de la composición inmunomoduladora se administran in ovo al huevo.
6. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que 1,0 microgramos de la composición inmunomoduladora se administran in ovo al huevo.
- 20 7. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición inmunomoduladora se administra a un huevo de pollo embrionado en el día 18 de la incubación.
8. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende adicionalmente un agente biológico y en la que el agente biológico es una vacuna usada para protección contra el virus de la enfermedad de Market (MDV), el virus de la enfermedad de New Castle (NDV), el virus de la anemia del pollo (CAV), el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBVD), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), el herpesvirus de pavo (HVT), el virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILT), el virus de la encefalomiелitis aviar (AEV), el virus de la viruela aviar (FPV), el cólera aviar, el virus de la gripe aviar (AIV), los reovirus, el virus de la leucosis aviar (ALV), el virus de la reticuloendoteliosis (REV), los adenovirus aviares, el virus de la enteritis hemorrágica (HEV) y combinaciones de los mismos.
- 25 9. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el vehículo de administración liposómico catiónico comprende DOTIM y colesterol.
10. La composición para su uso de las reivindicaciones 1 a 9, para administración antes de una exposición.
11. La composición para su uso de las reivindicaciones 1 a 9, para administración después de una exposición.

35

FIG. 1

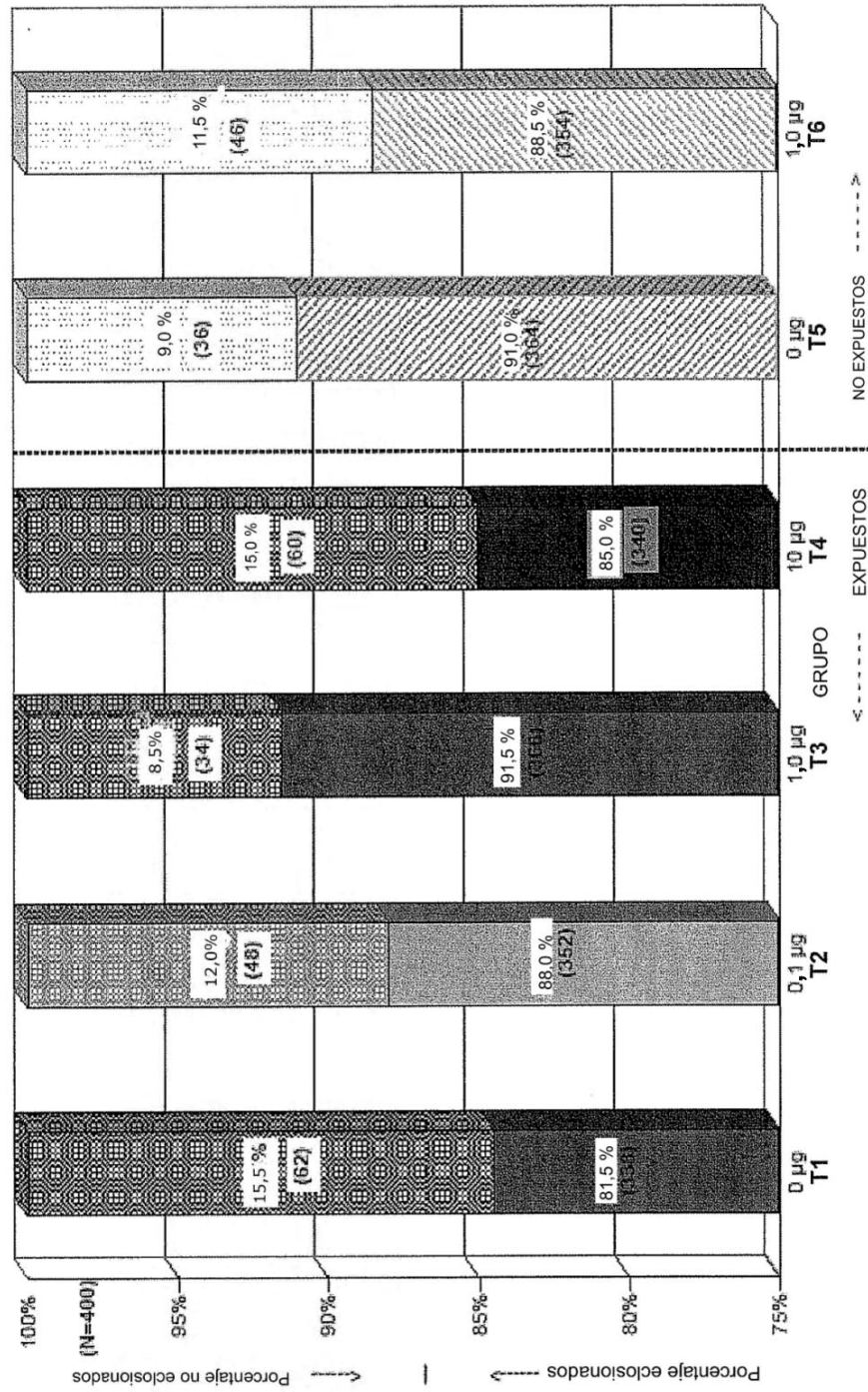


FIG. 2

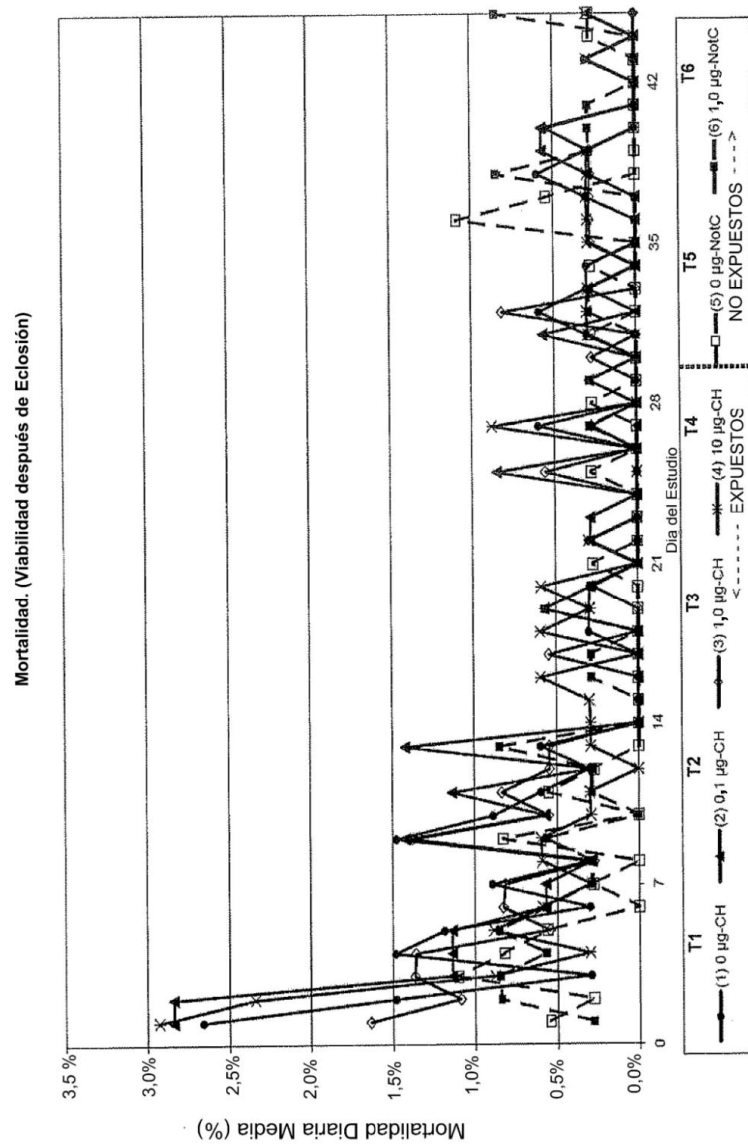


FIG. 3
Supervivientes a partir de embriones de 18 días
(N = 400 huevos por grupo)

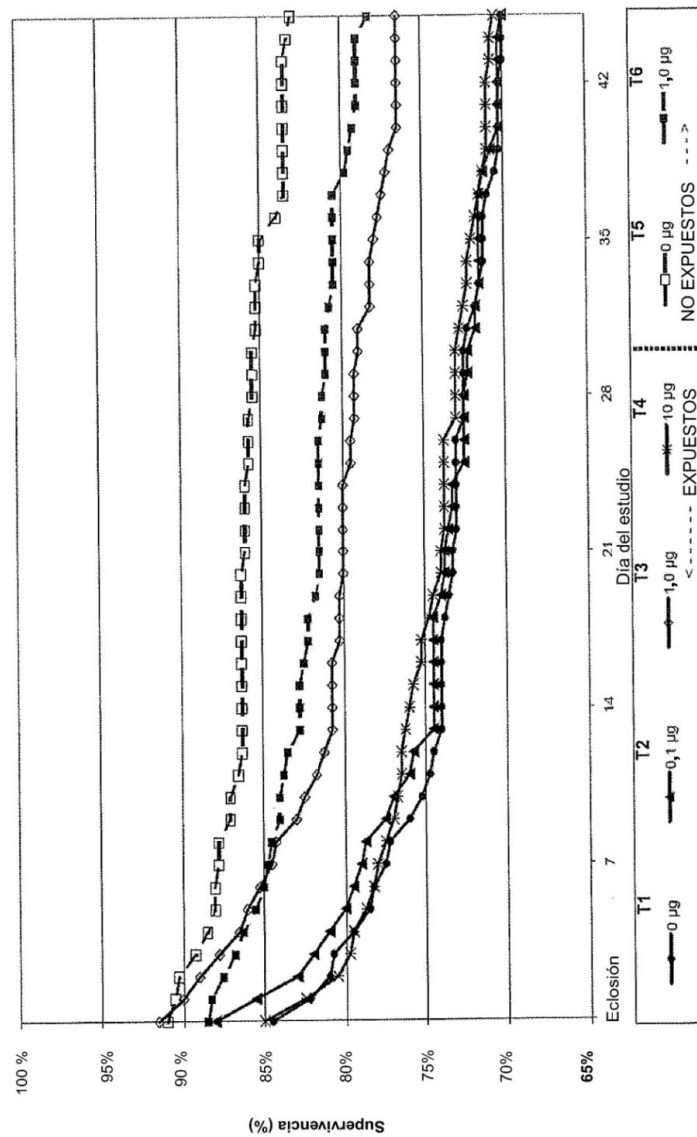


FIG. 4

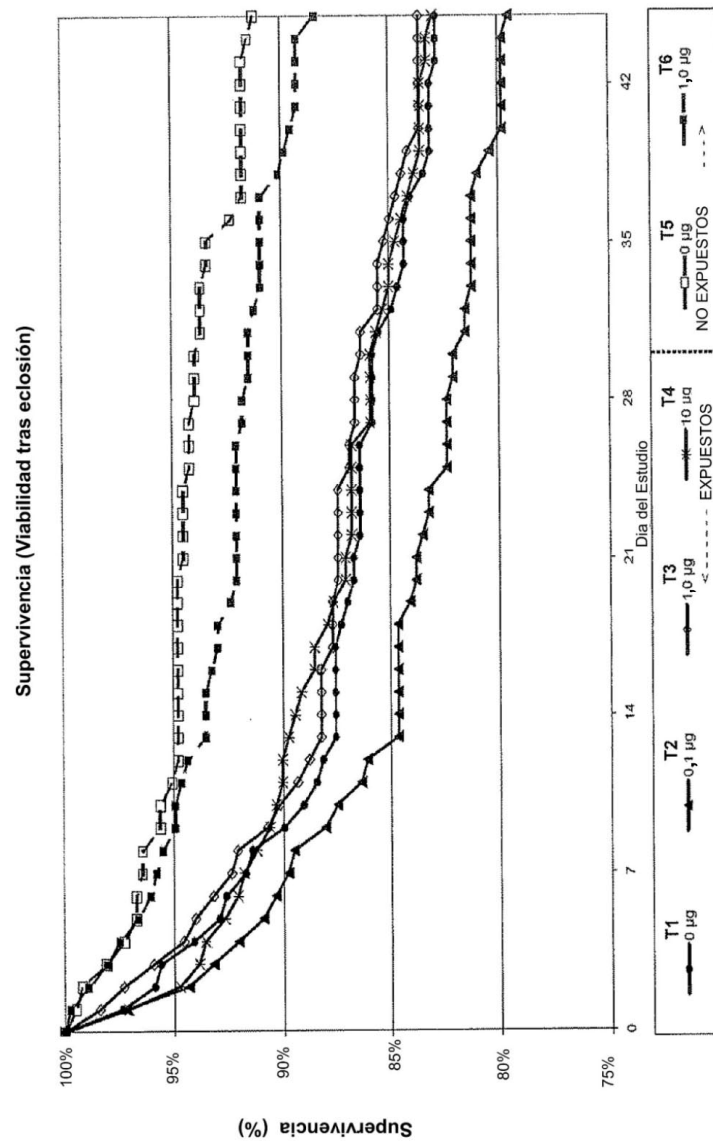


FIG. 5

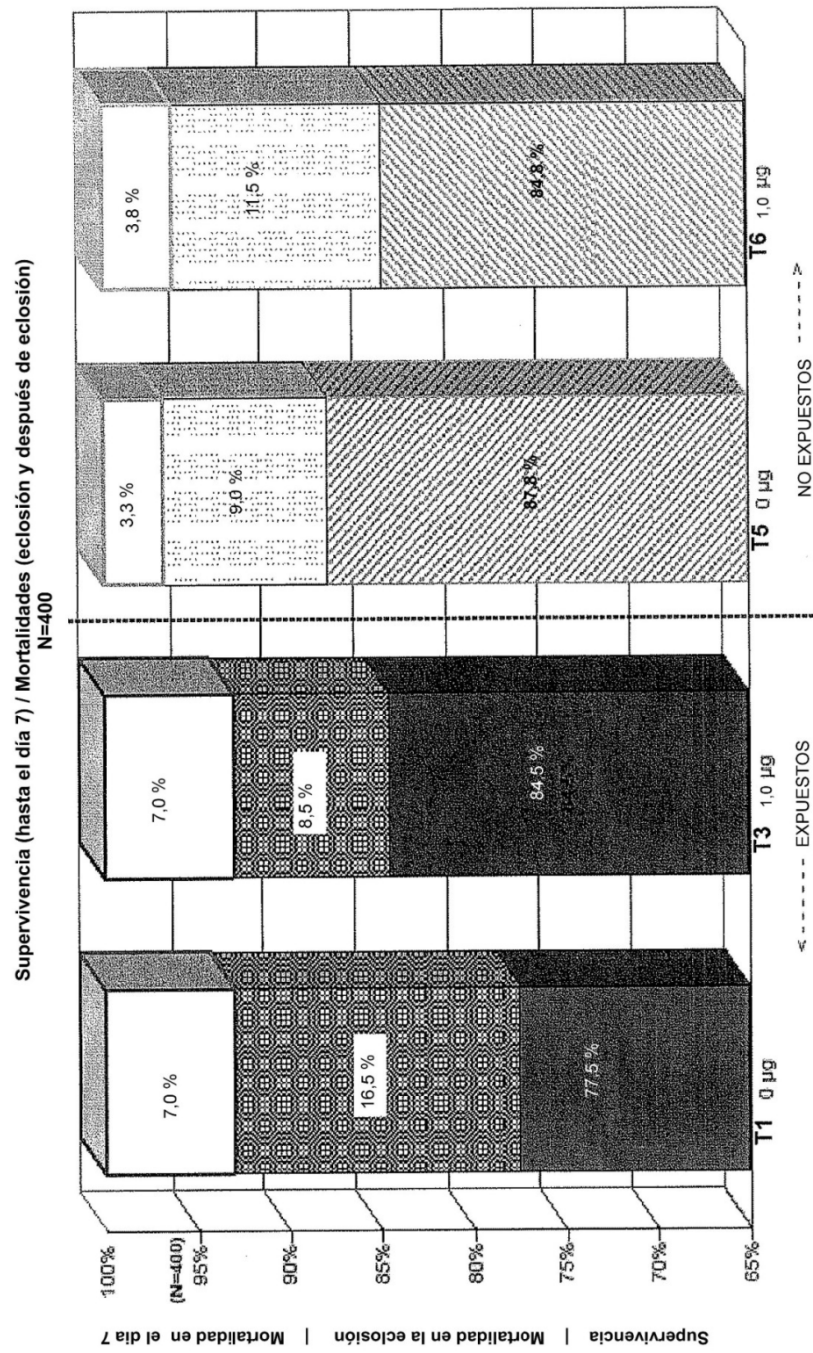


FIG. 6

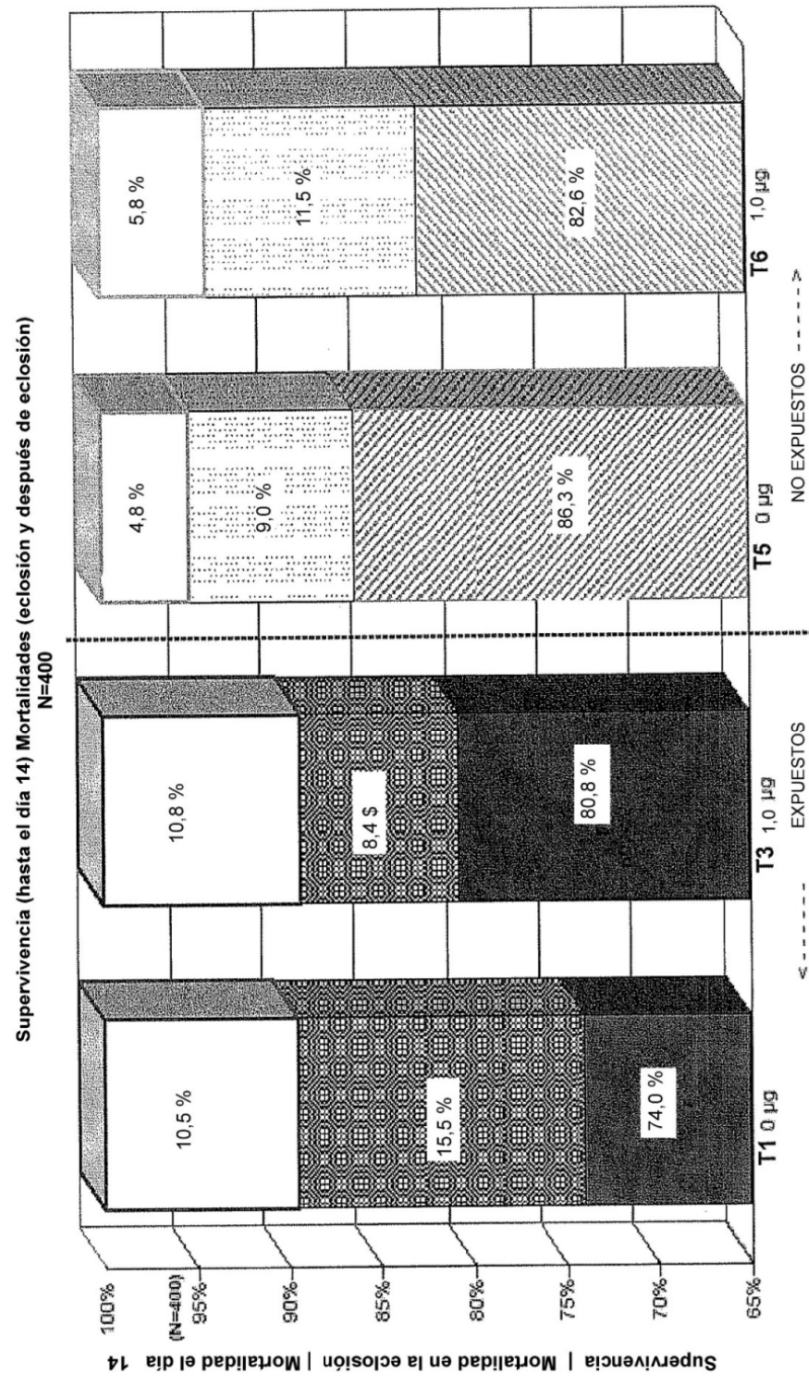


FIG. 7

Supervivientes (hasta el día 21) / Mortalidades (eclosión y después de la eclosión)
(N = 400)

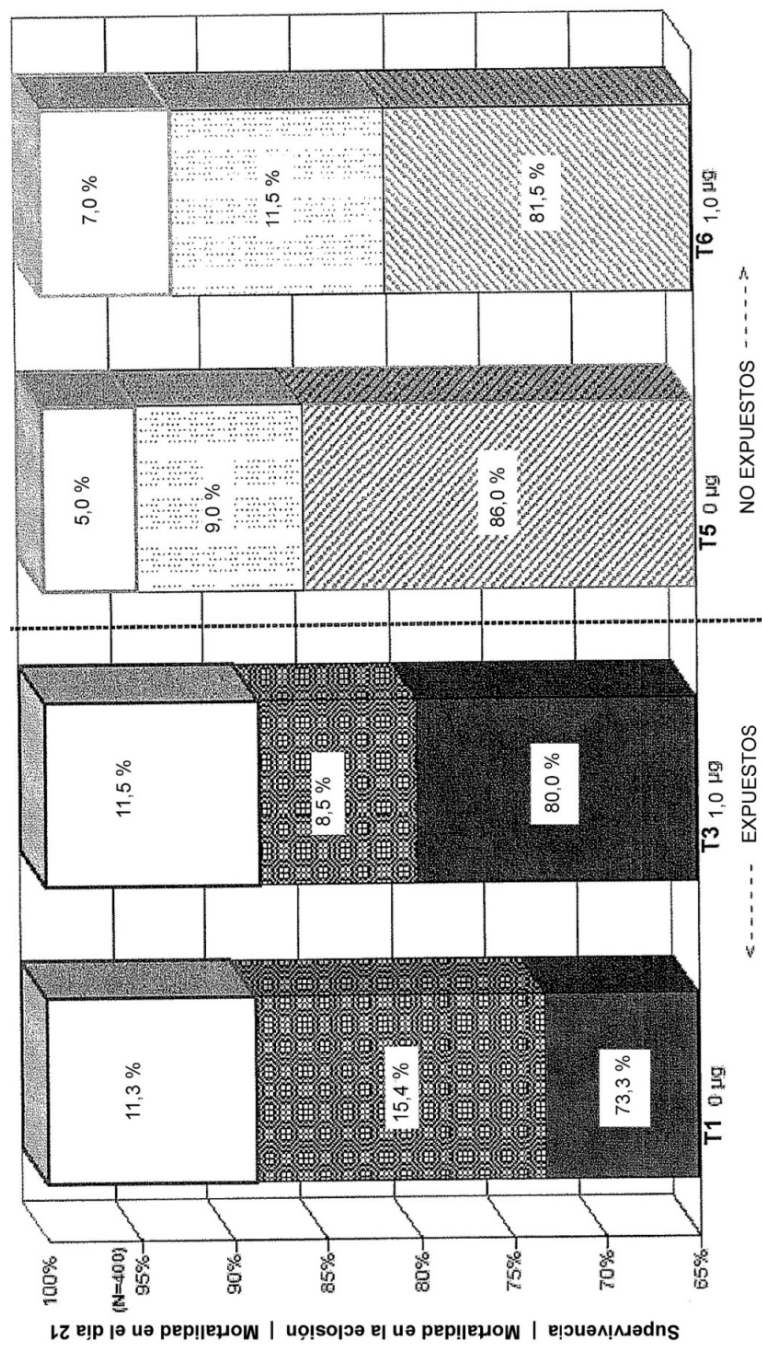


FIG. 8

Supervivencia (Hasta el día 28) / Mortalidades (Eclosión y después de la eclosión)
(N = 400)

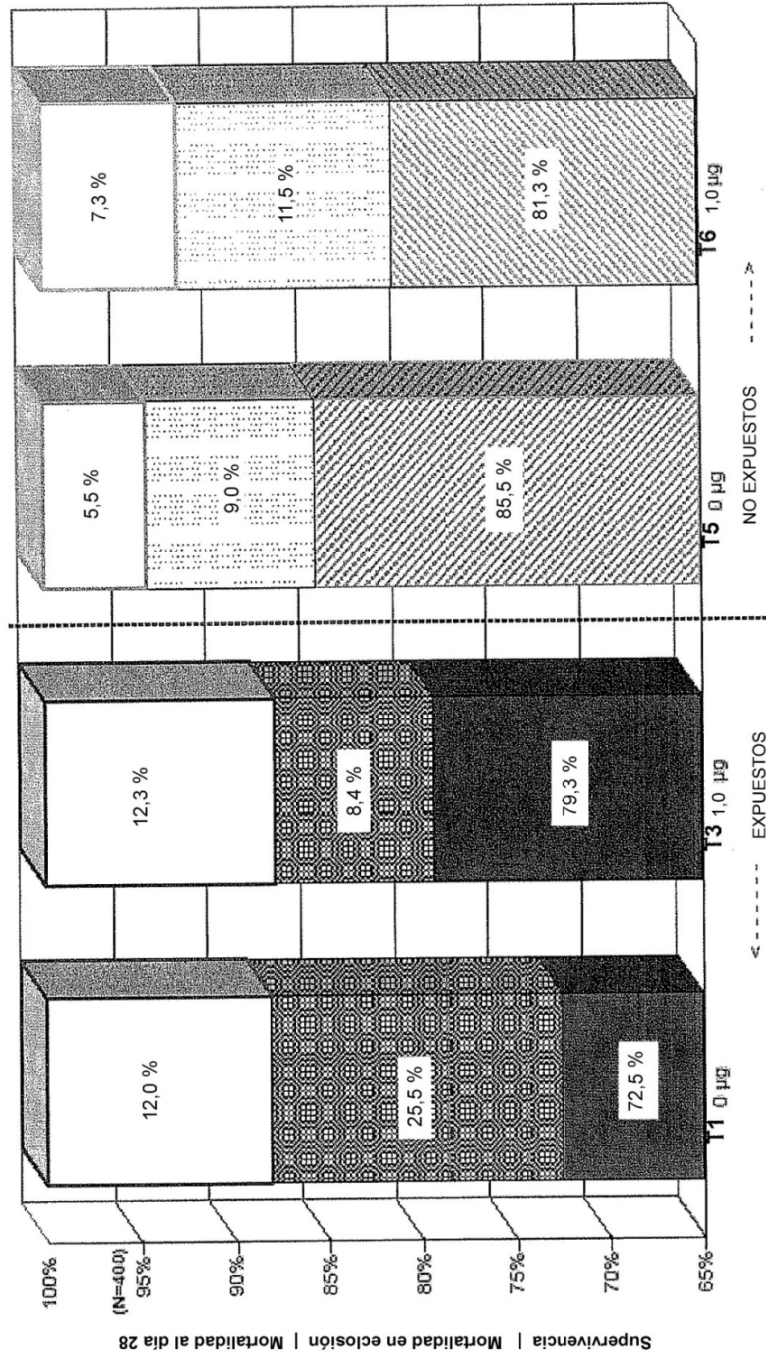
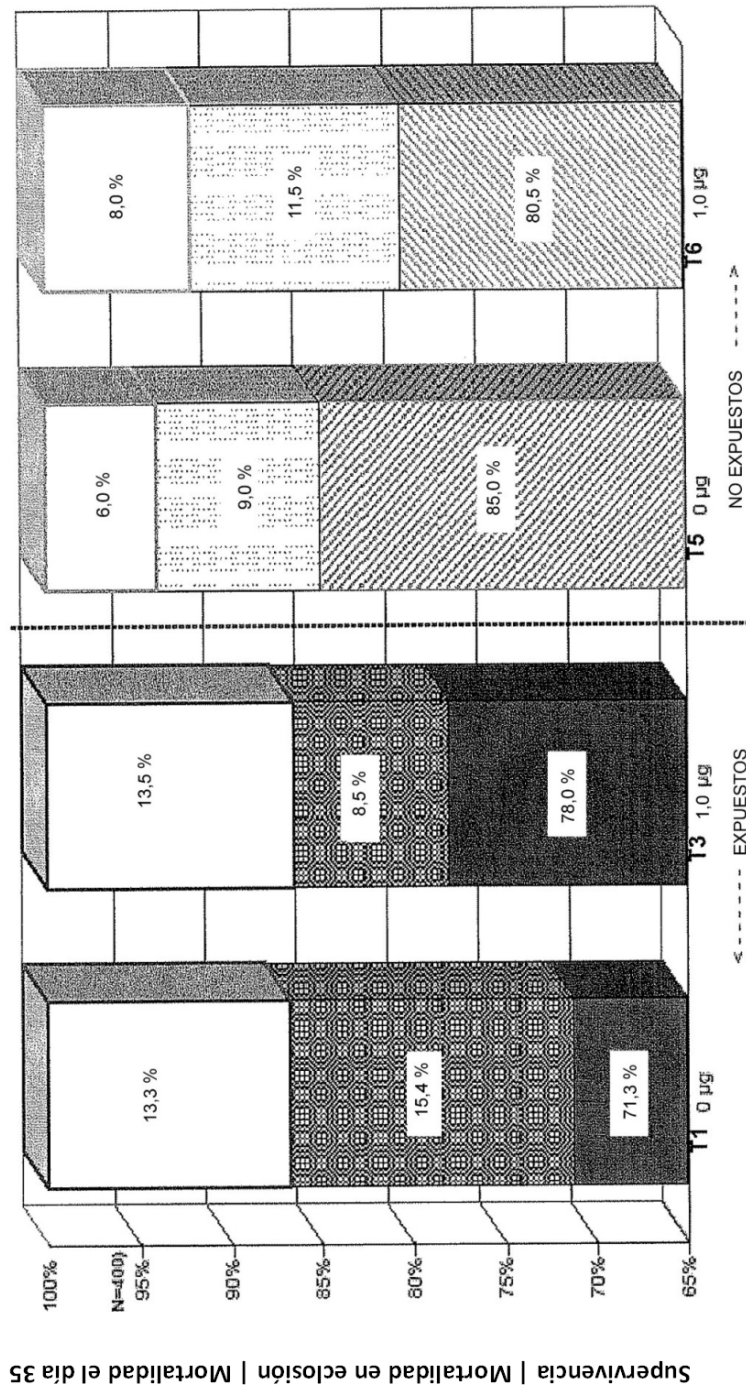


FIG. 9

Supervivencia (Hasta el día 35) / Mortalidades (Eclosión y después de la eclosión)
(N = 400)



Supervivencia | Mortalidad en eclosión | Mortalidad el día 35

FIG. 10

Supervivencia (Hasta el día 45) / Mortalidades (Eclosión y después de la eclosión)
(N = 400)

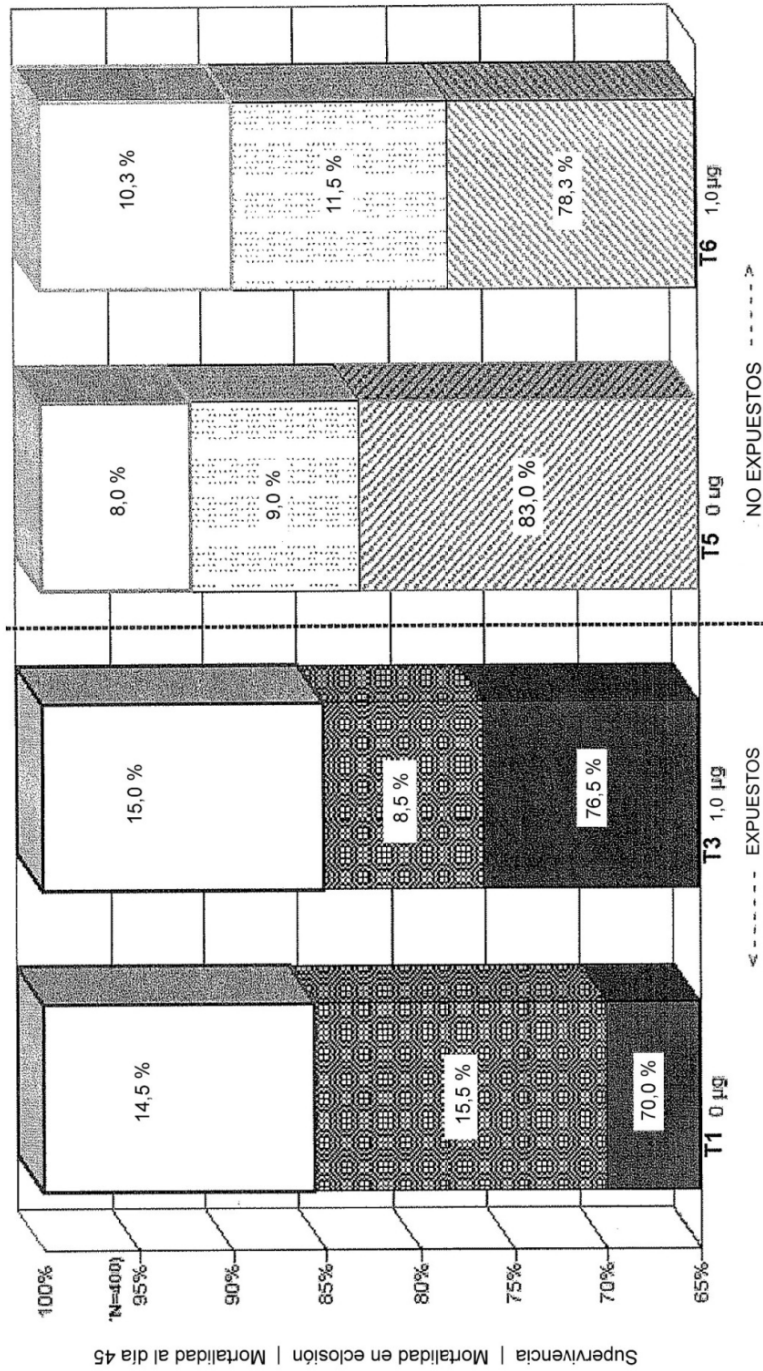


FIG. 11

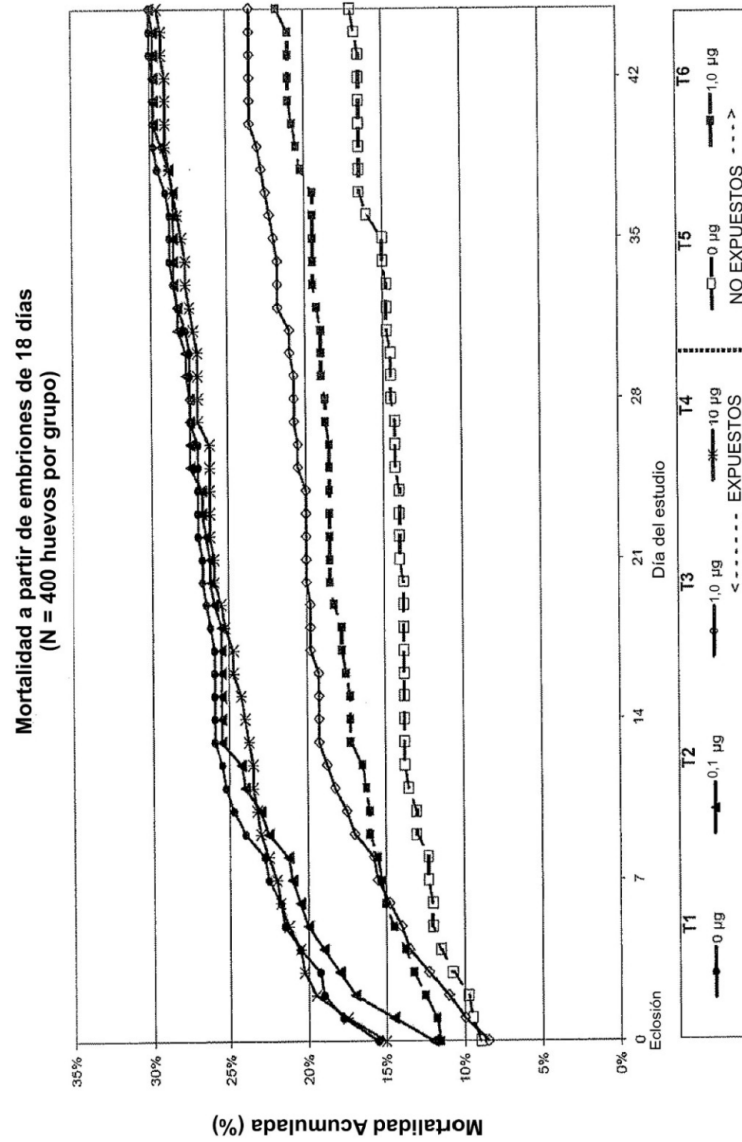


FIG. 12

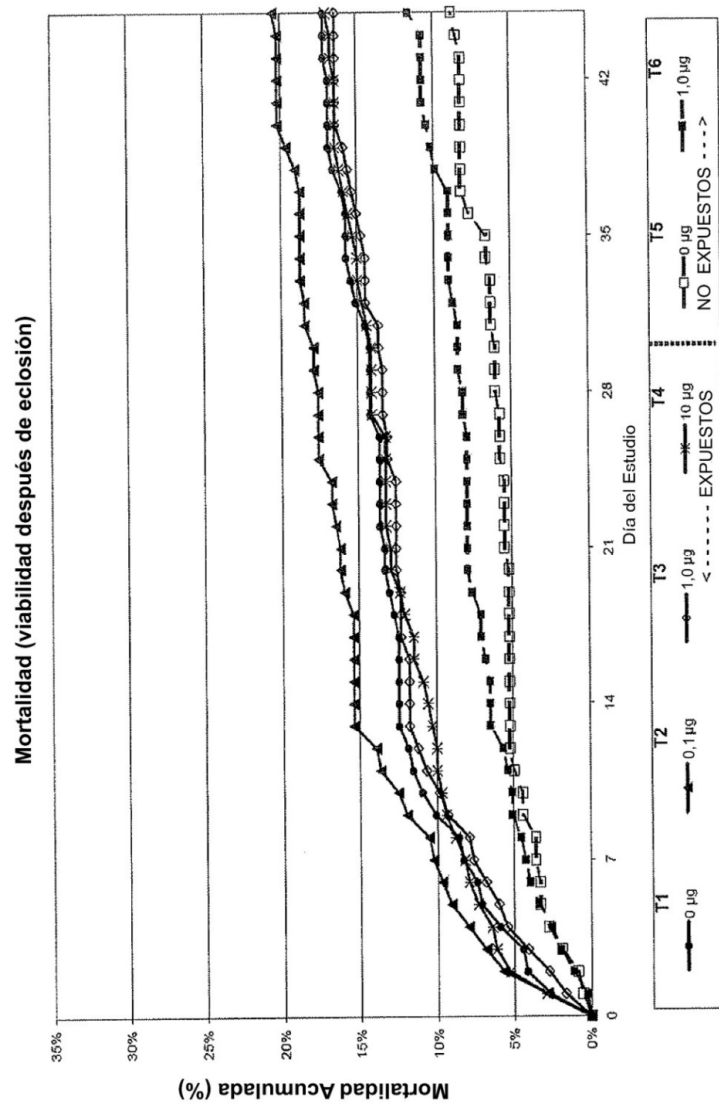


FIG. 13
Ganancia total de peso
(Hasta el día 7)

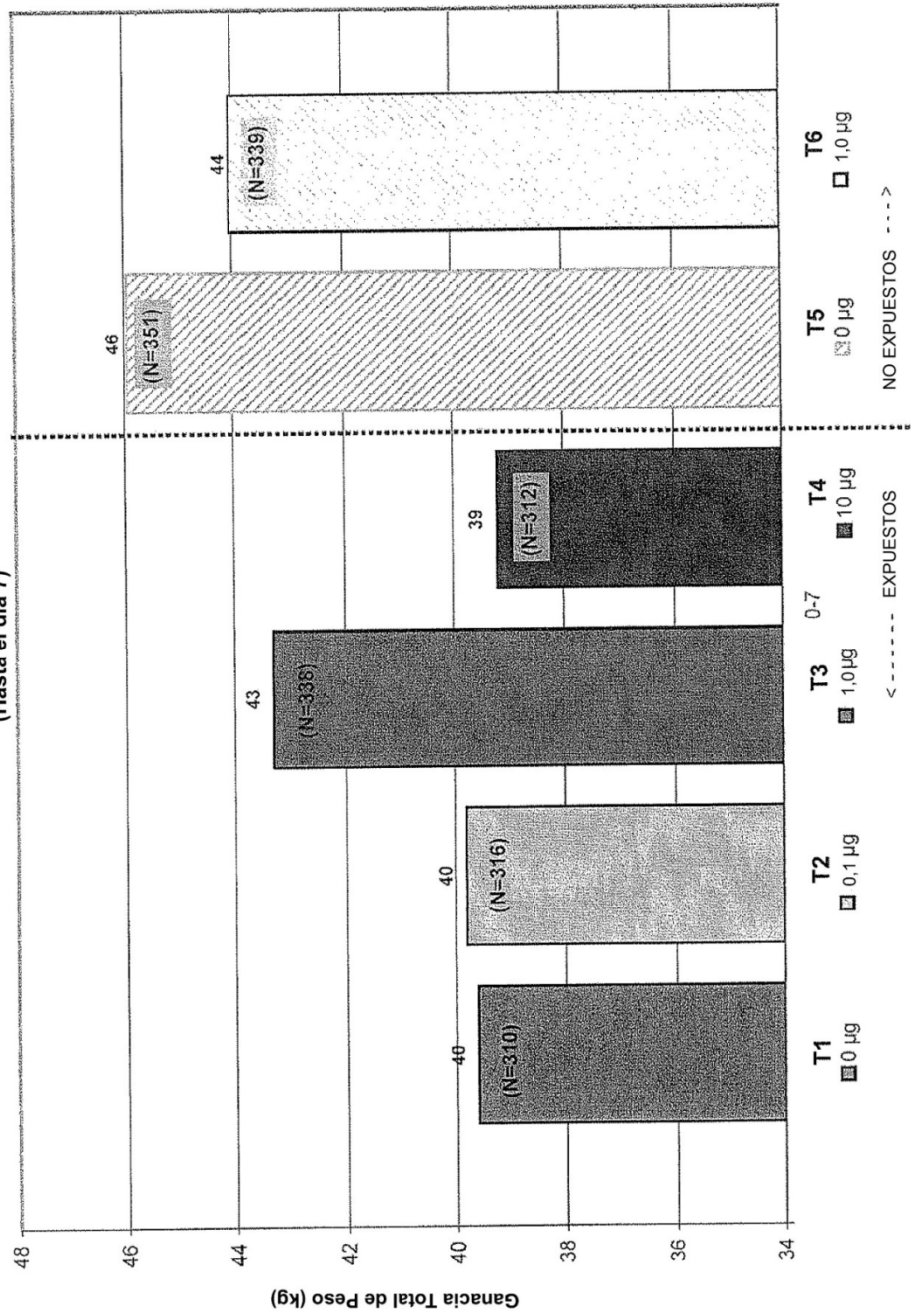


FIG. 14

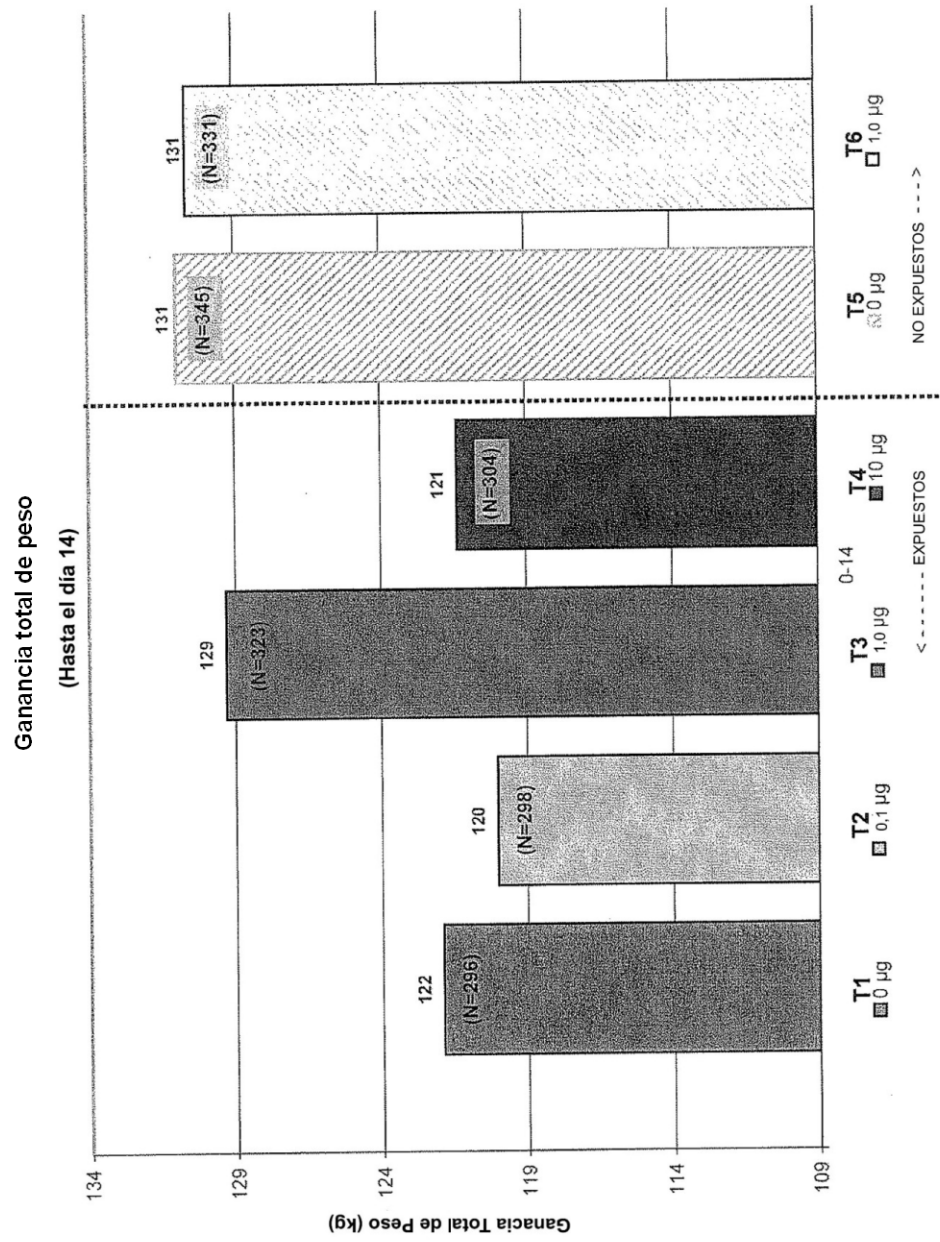


FIG. 15

Ganancia total de peso

(Hasta el día 21)

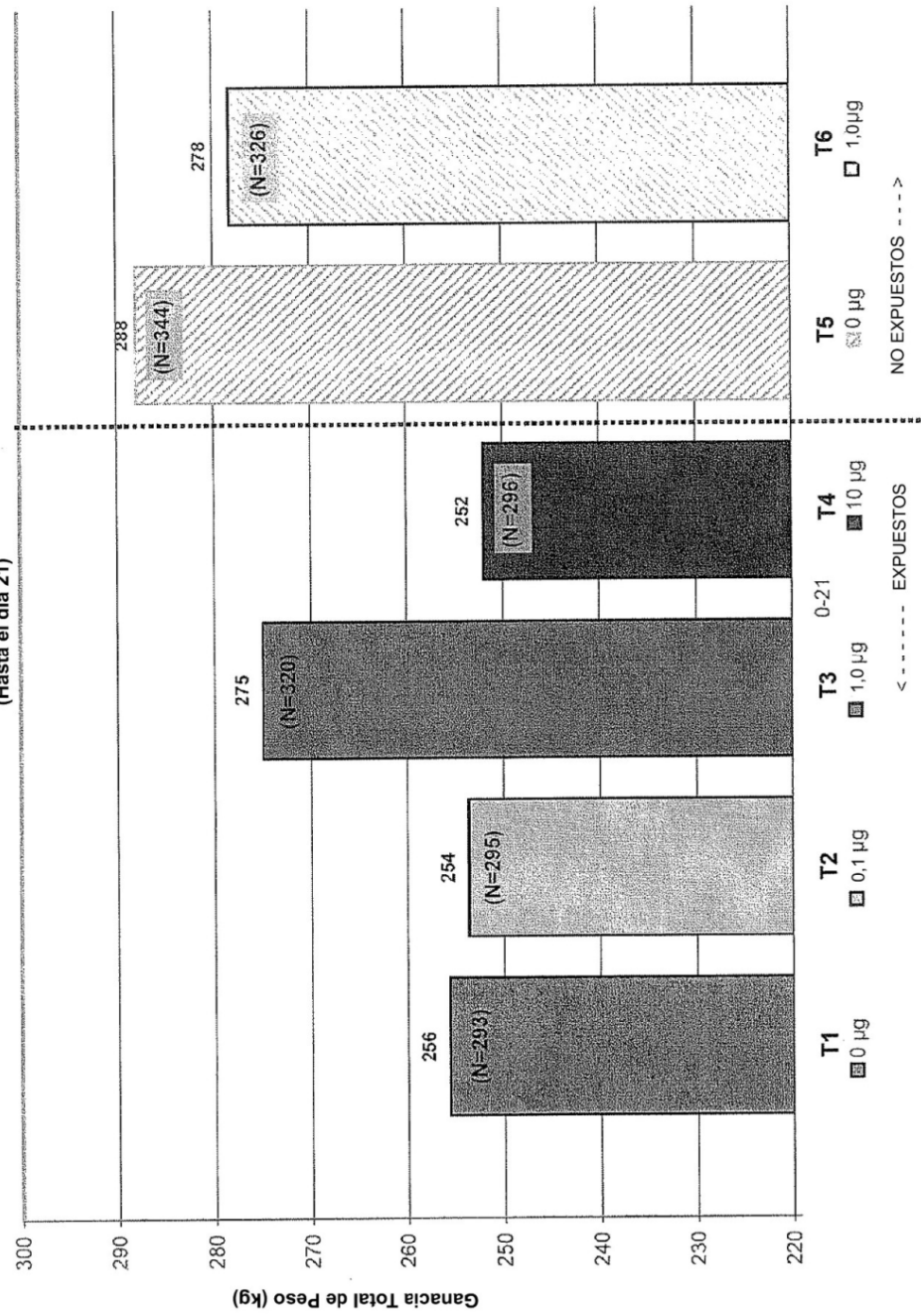


FIG. 16

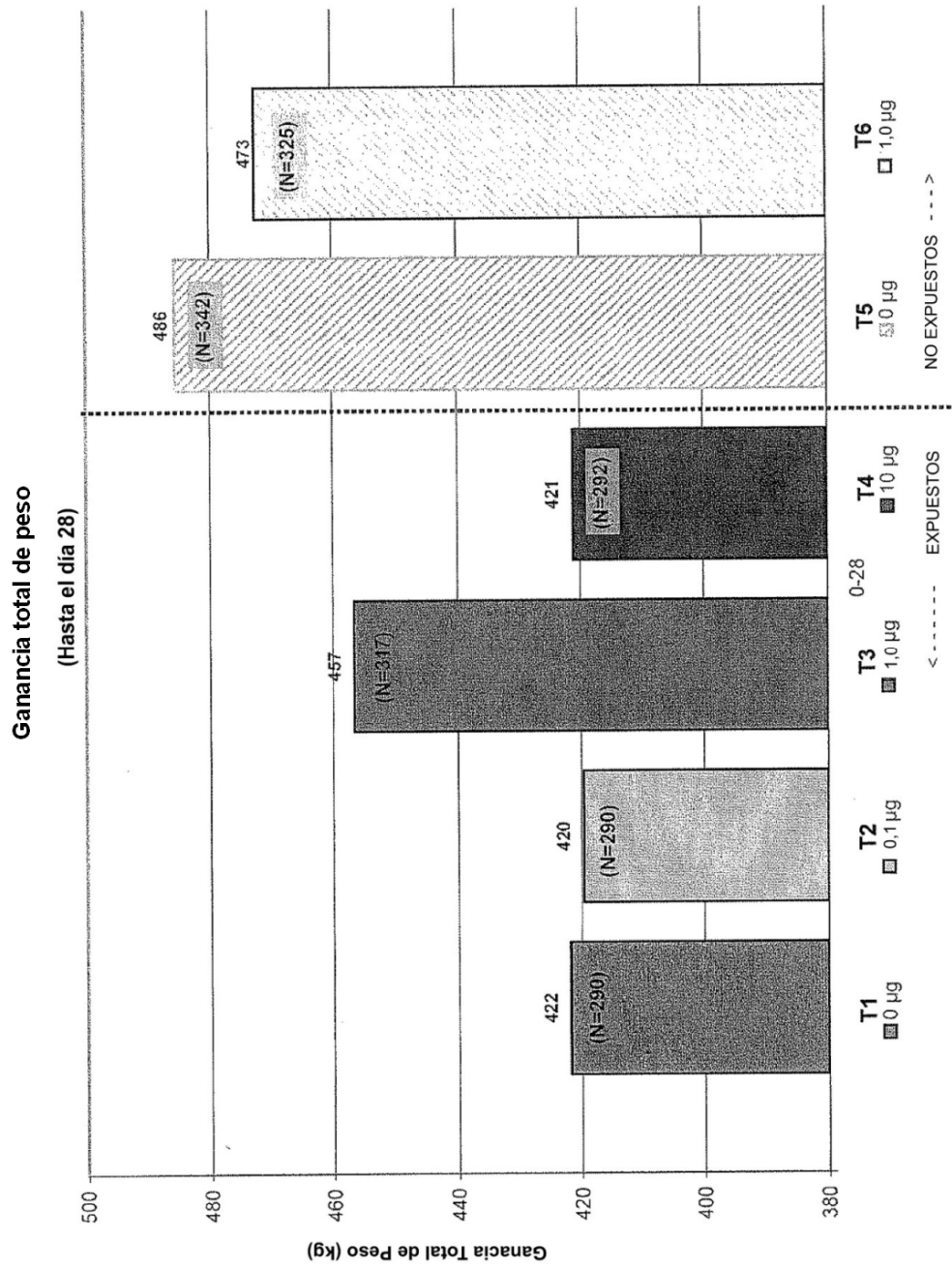


FIG. 17
Ganancia total de peso
(Hasta el día 35)

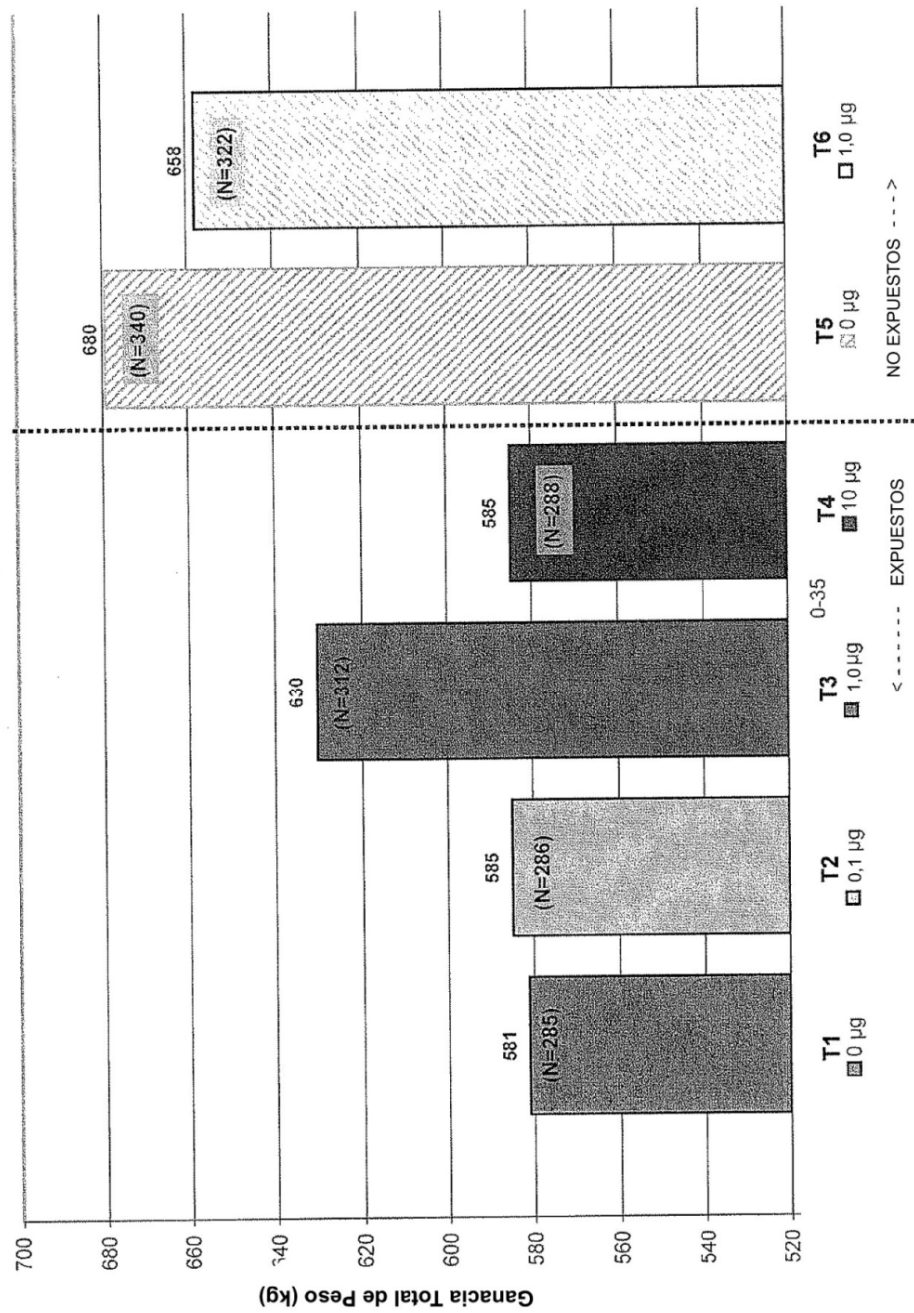


FIG. 18

Ganancia total de peso
(Hasta el día 45)

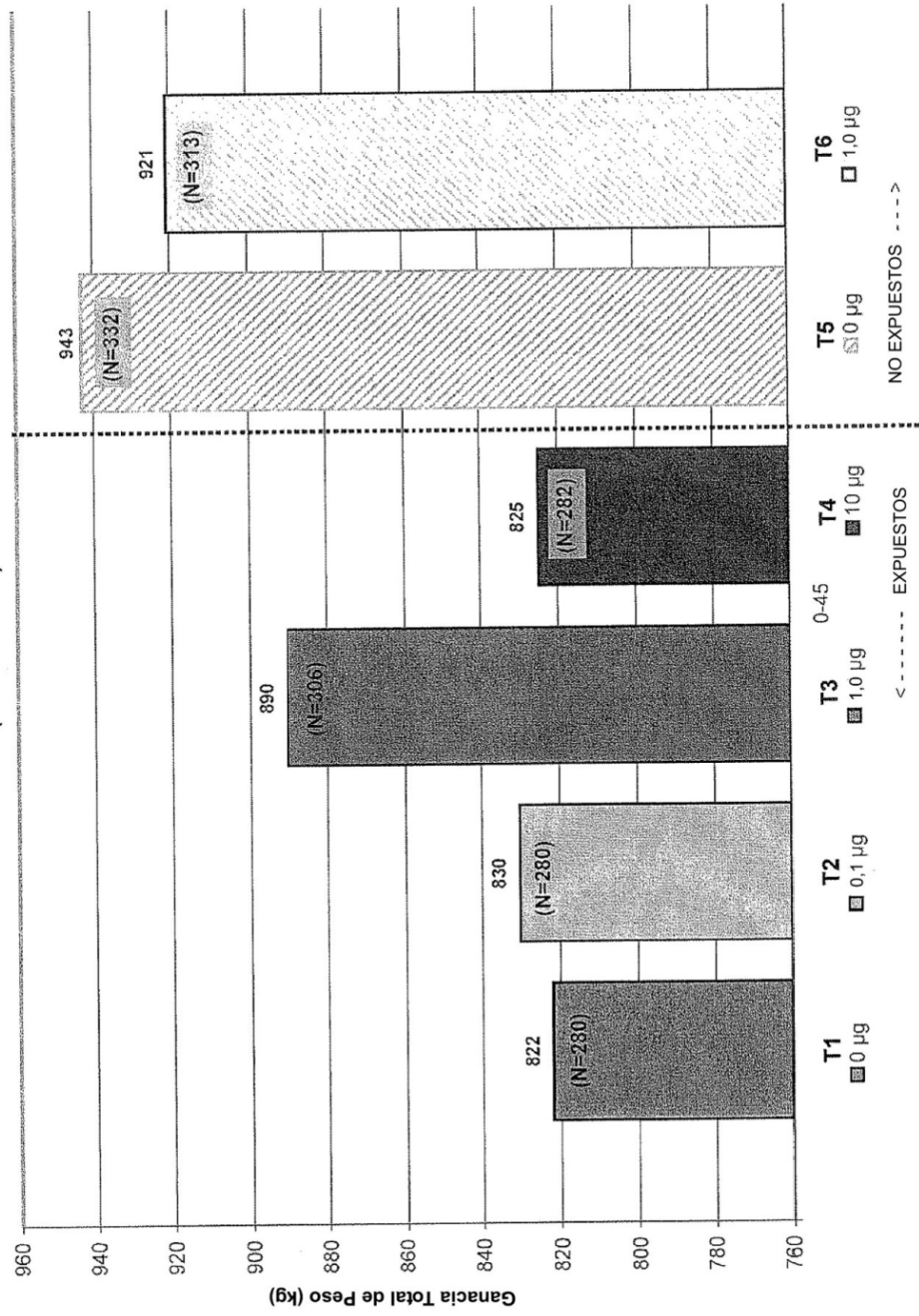


FIG. 19

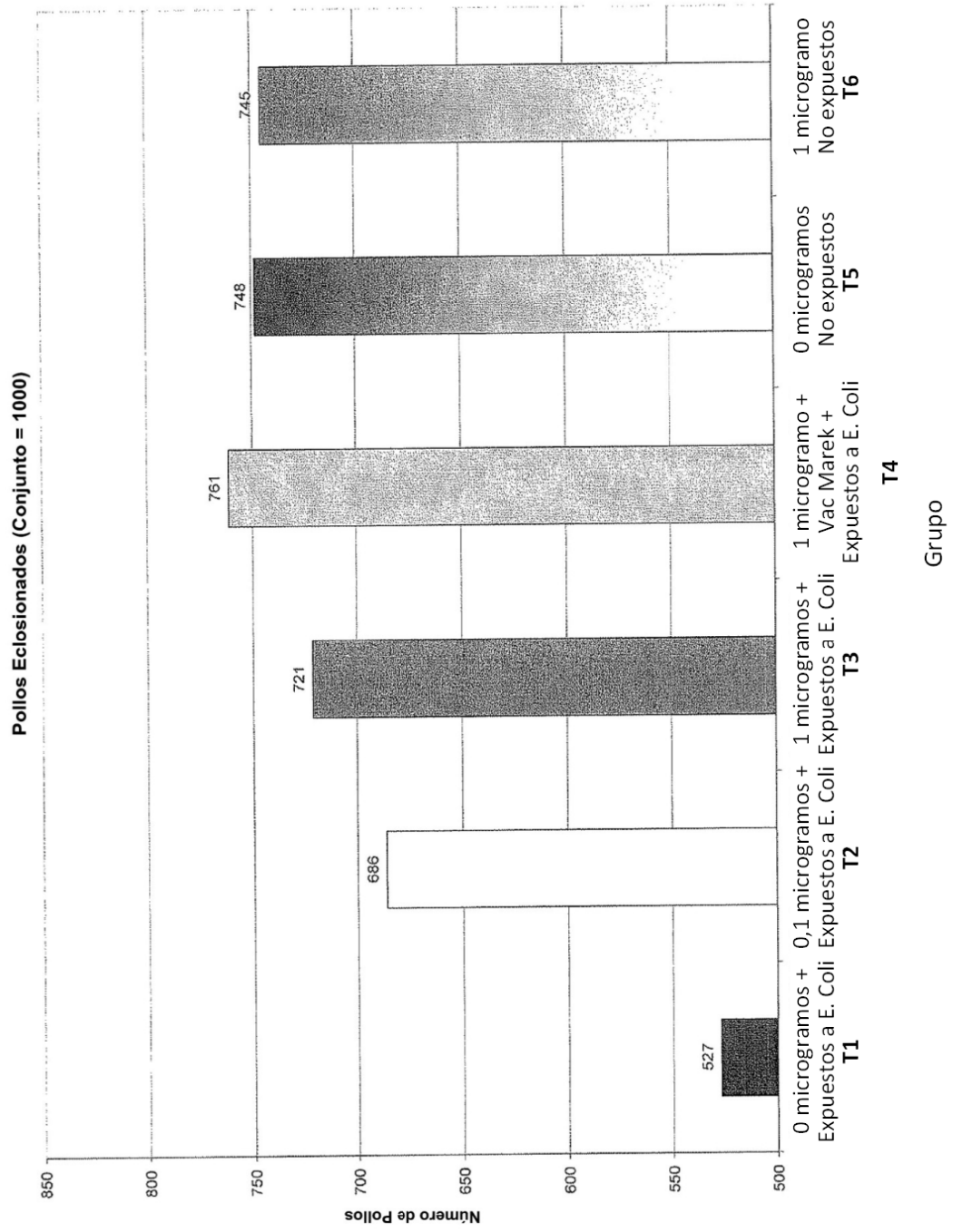


FIG. 20

Ningún Pollo vivo (N=1000/grupo) 7 días

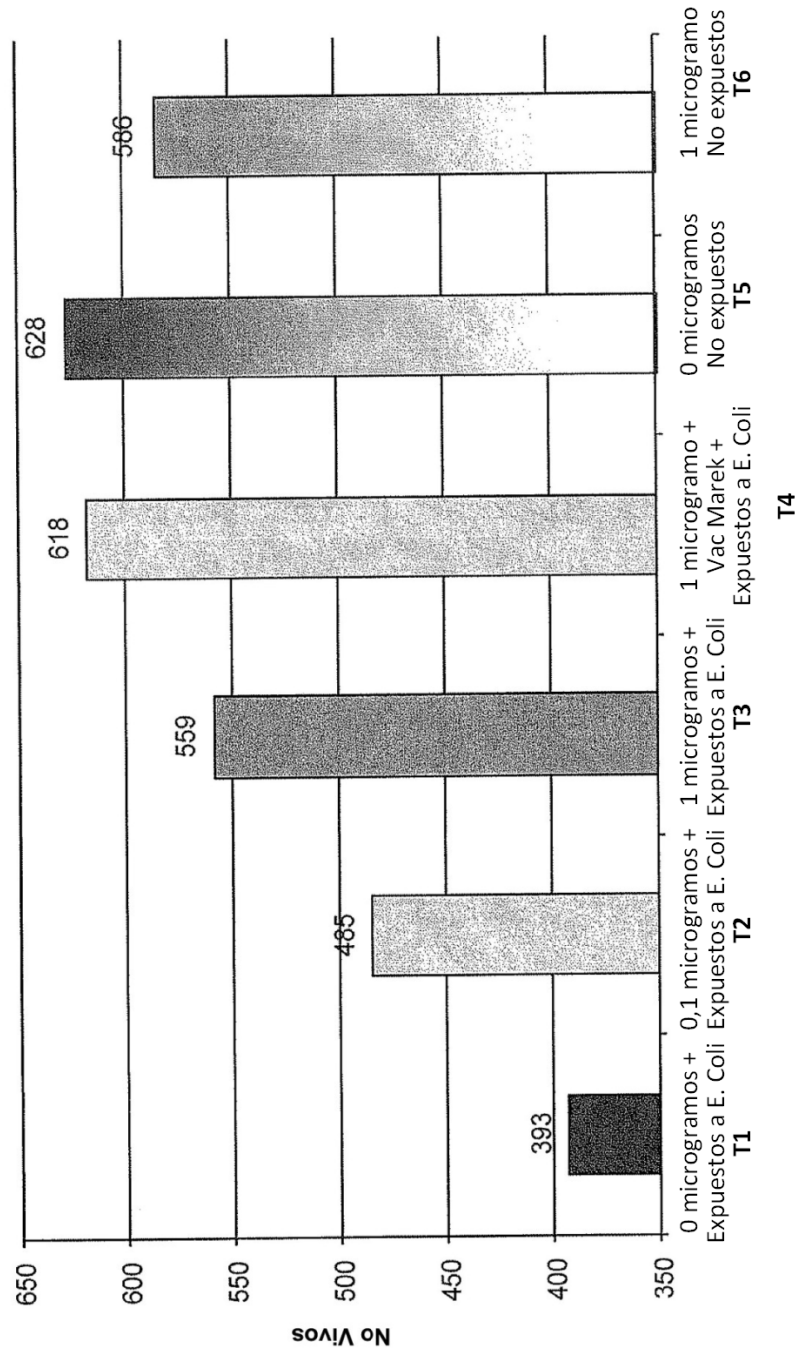


FIG. 21

Pollos Vivos / Mortalidad

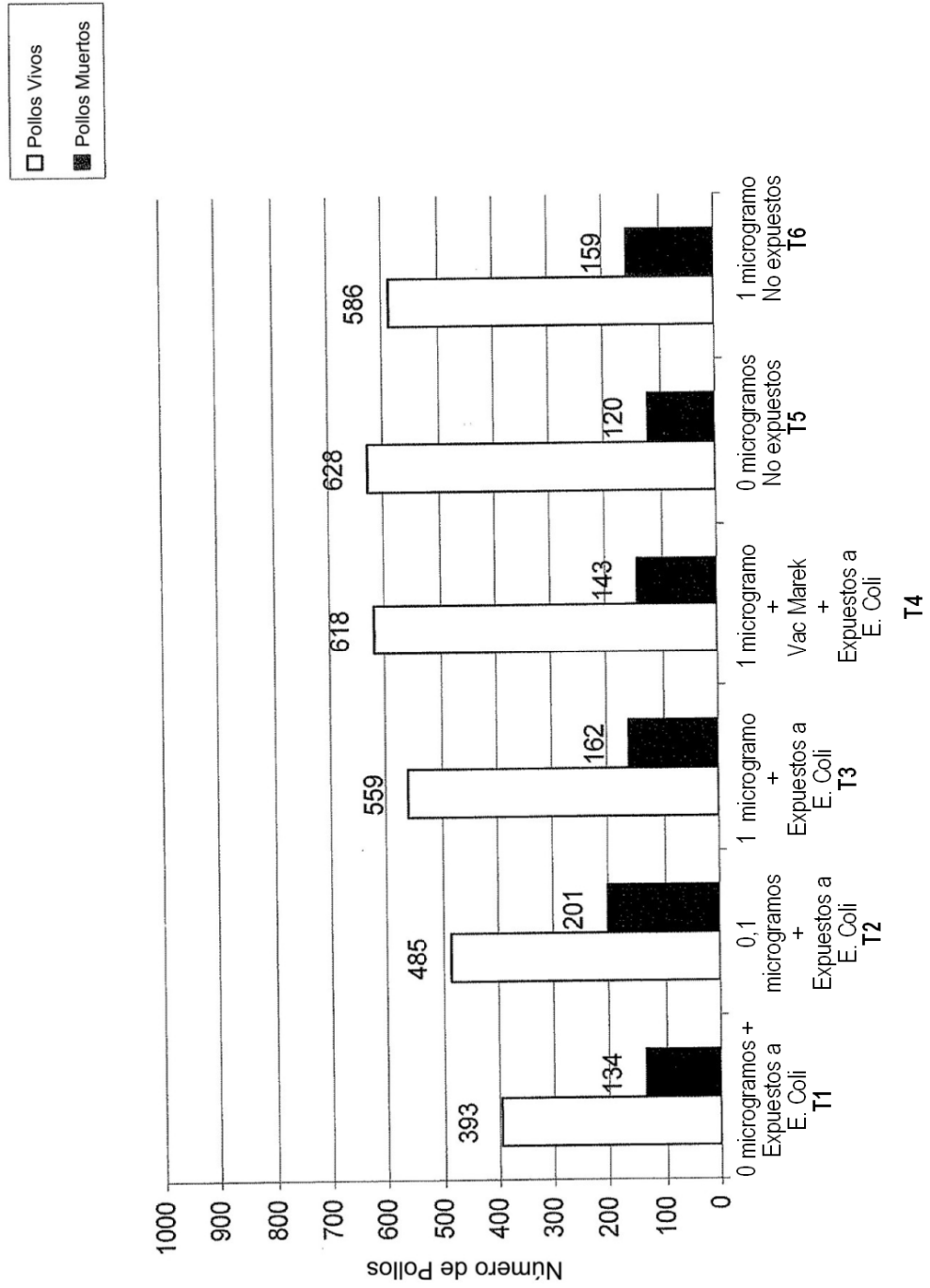


FIG 22
Porcentaje de Mortalidad (7 Días)

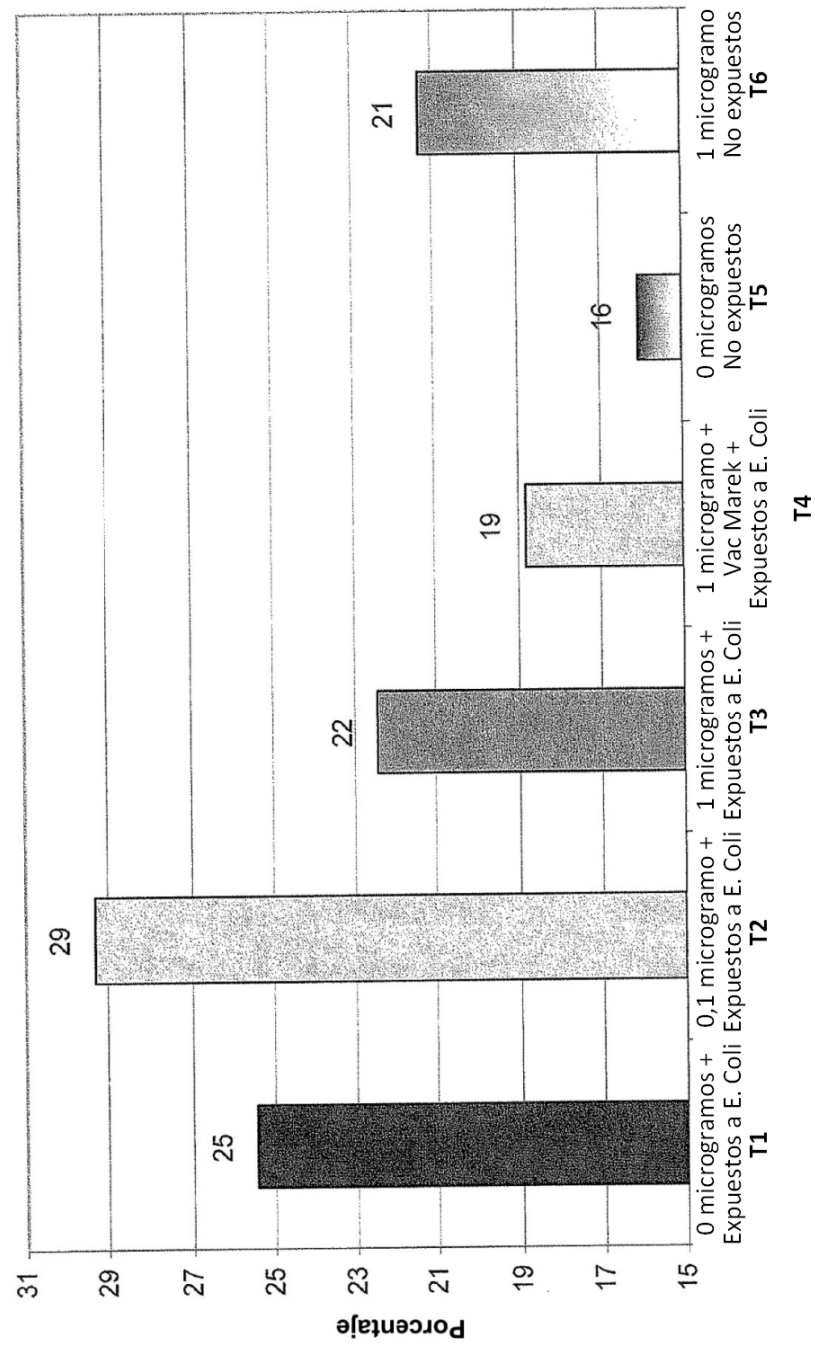


FIG. 23

Número de Aves vivas al final del estudio (7 días)

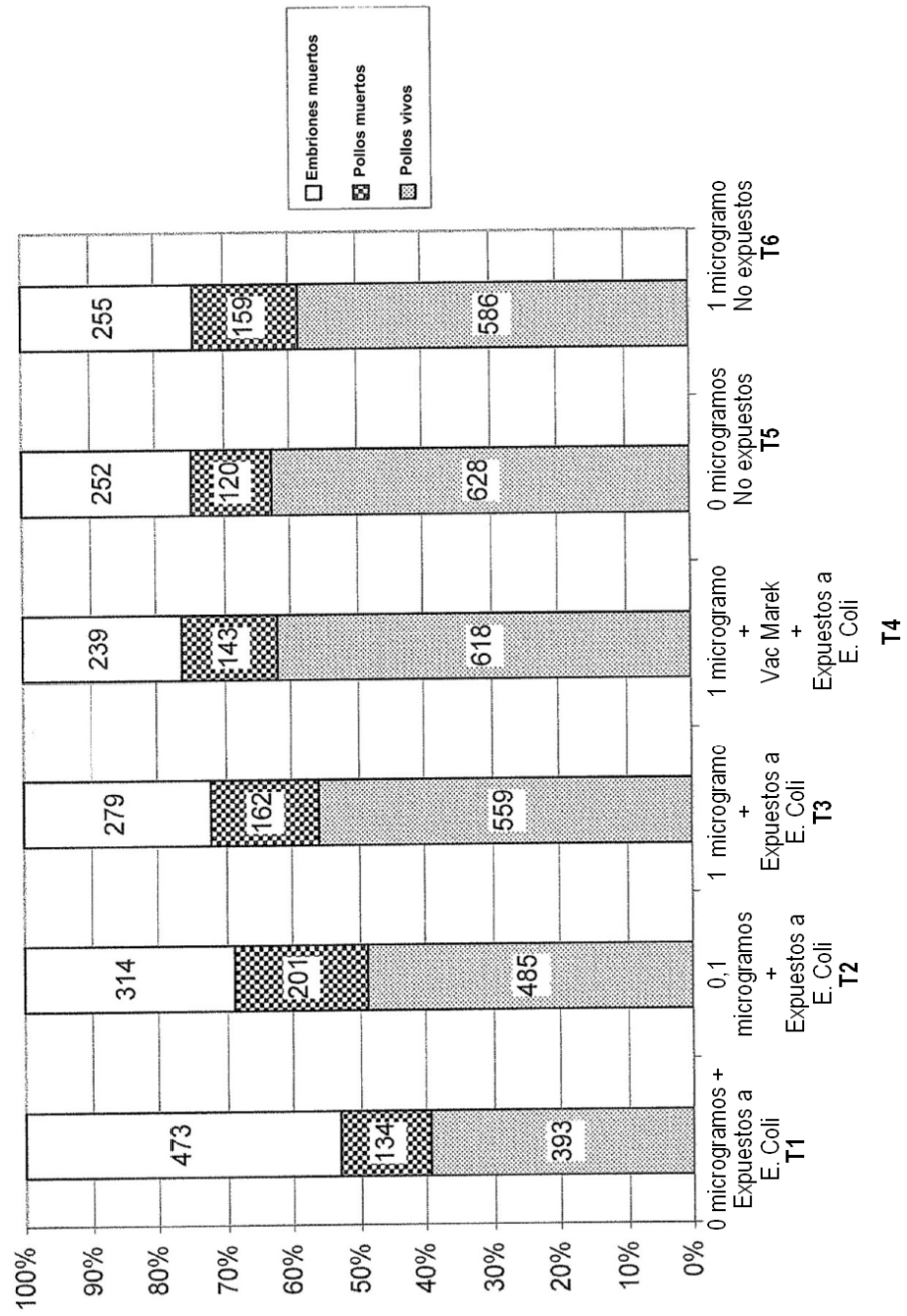


FIG. 24

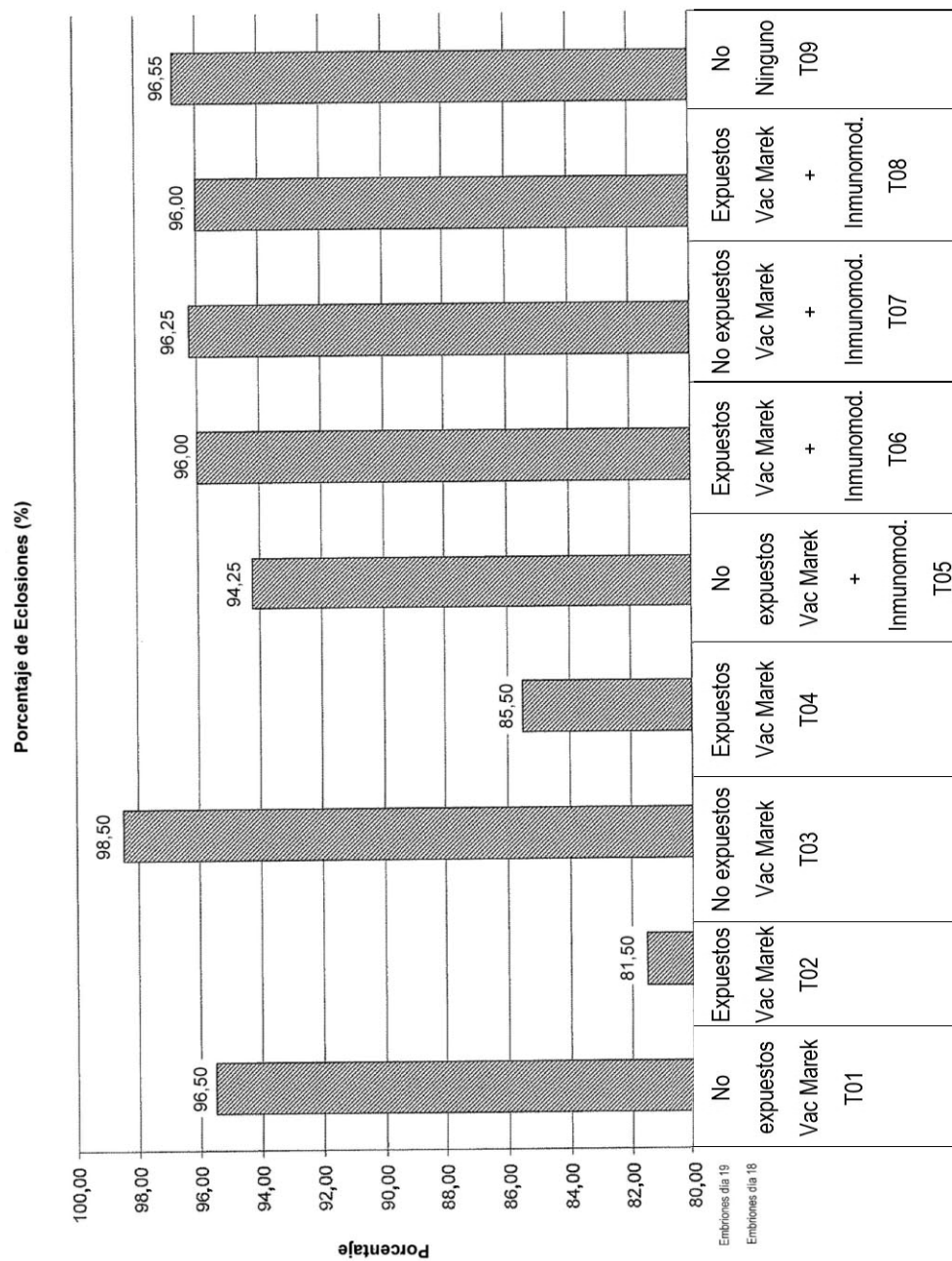


FIG. 25
Después de la Eclosión - 7º Día - No Expuestos - Mortalidad

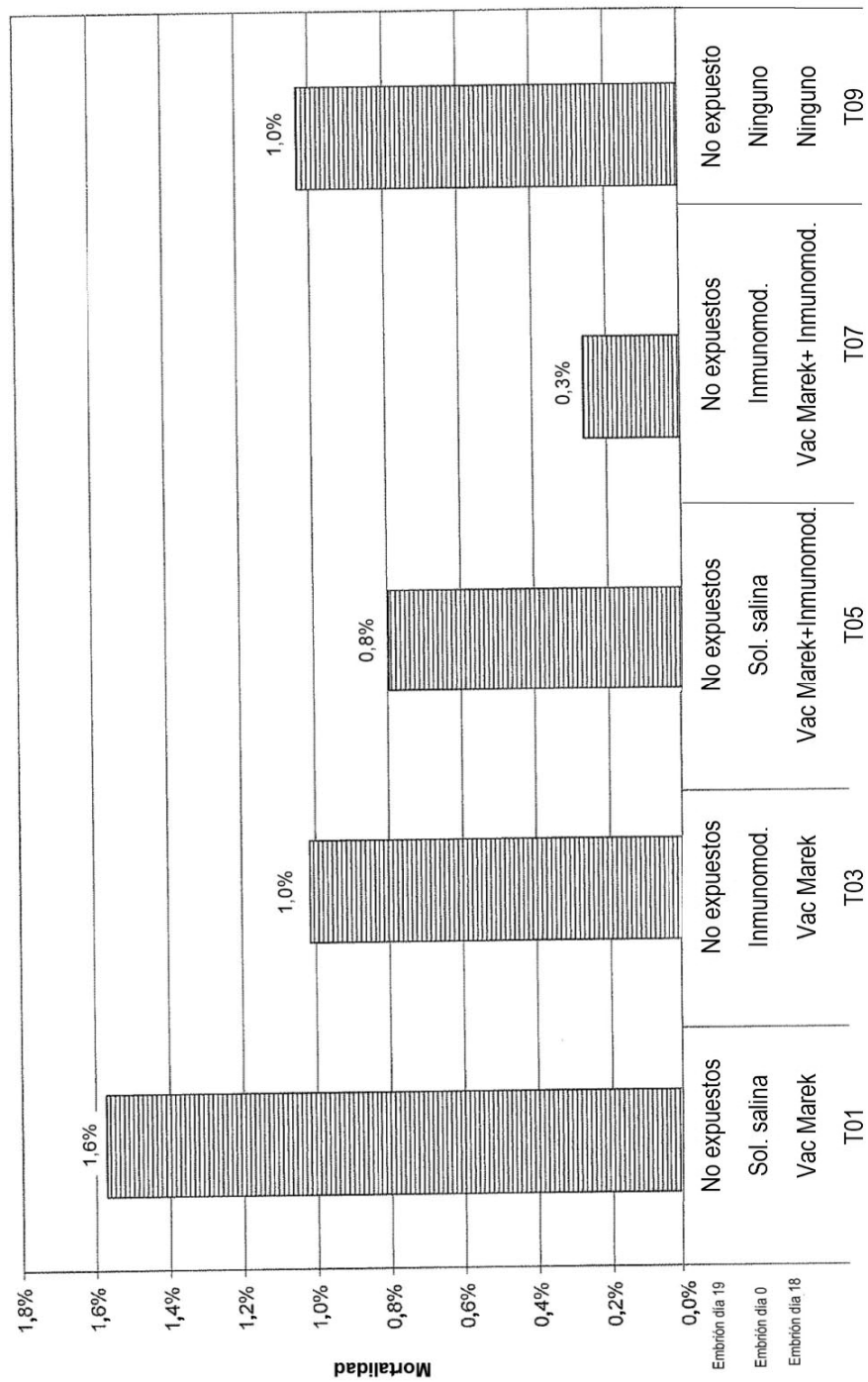


FIG. 26

Tras eclosión - 7 días - Expuestos - Mortalidad

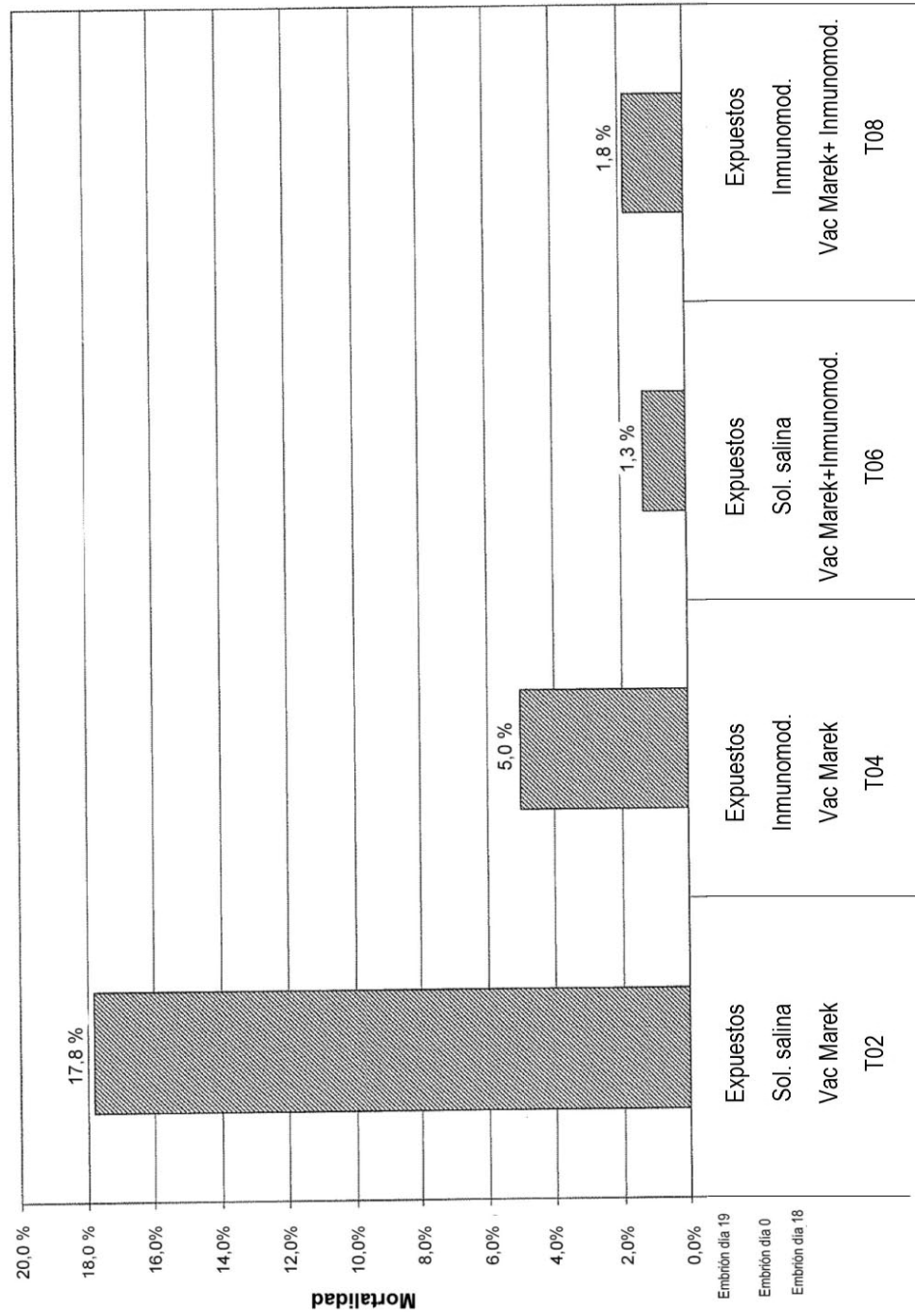


FIG. 27

Después de Eclosión - 7 días - Mortalidad

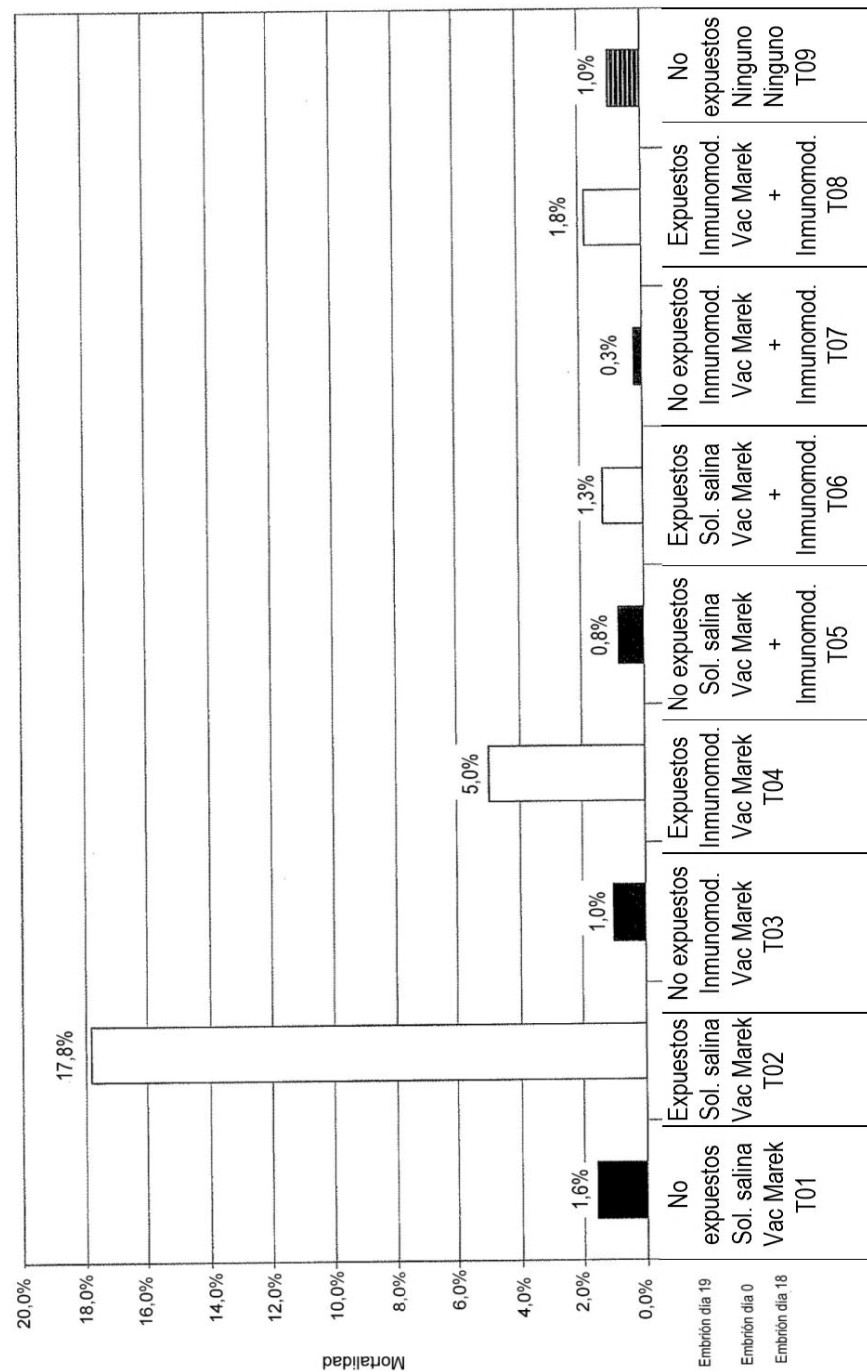


FIG. 28

Después de eclosión - 7 días - Vivos

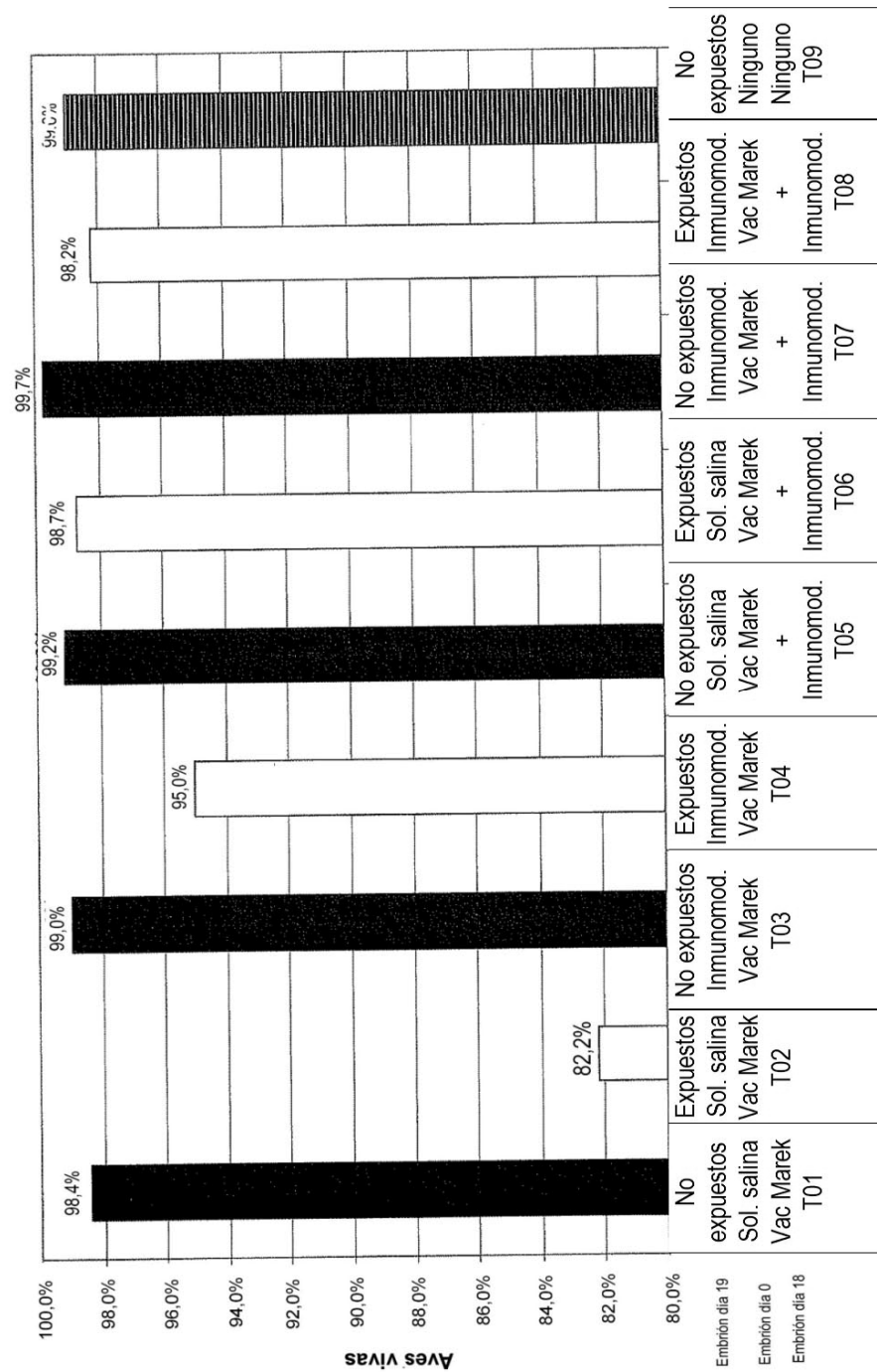


FIG. 29

Después de la puesta (N = 400) - 7 días - Vivos

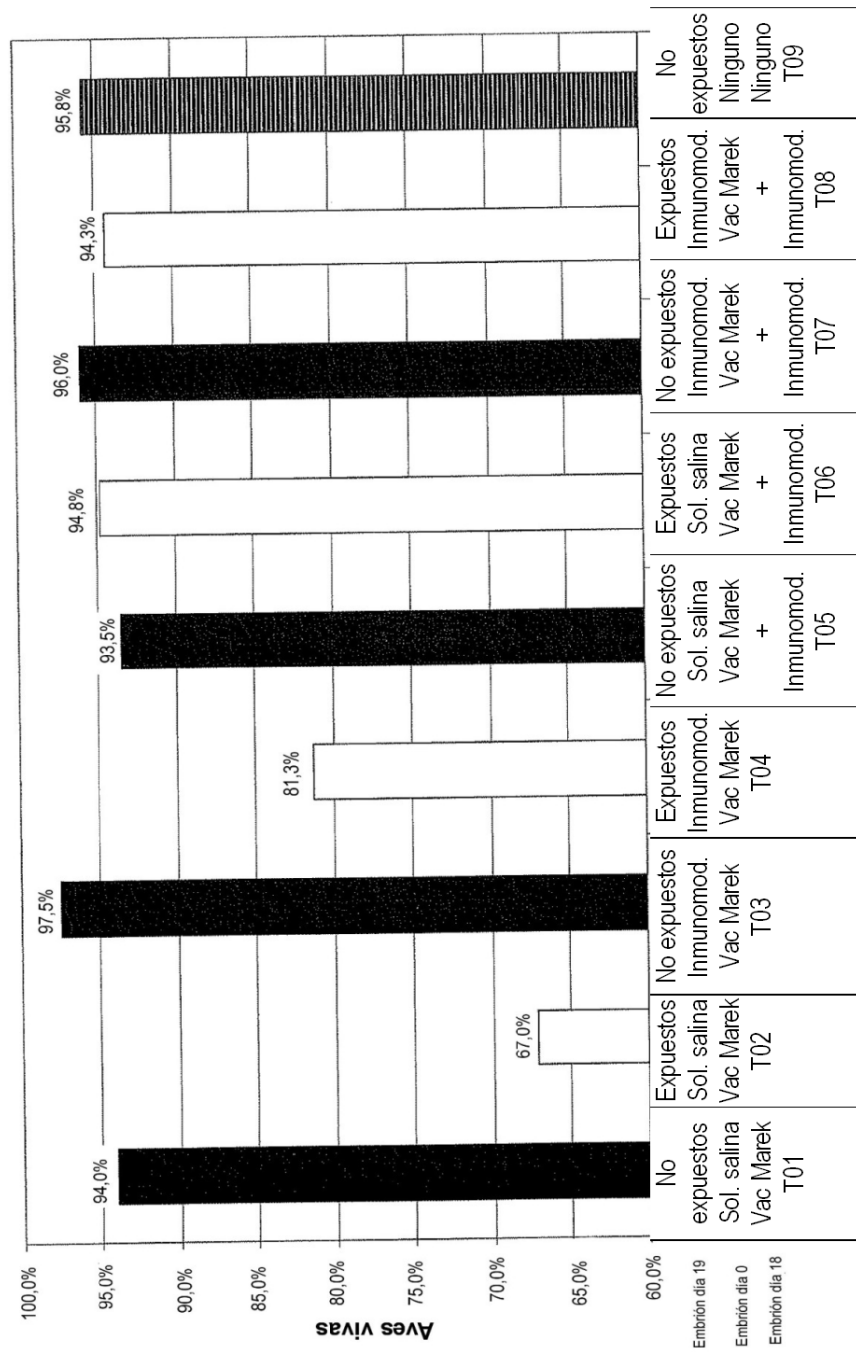


FIG. 30

Mortalidad Semanal
(muerte de pollos acumulada hasta días 7 y 14)

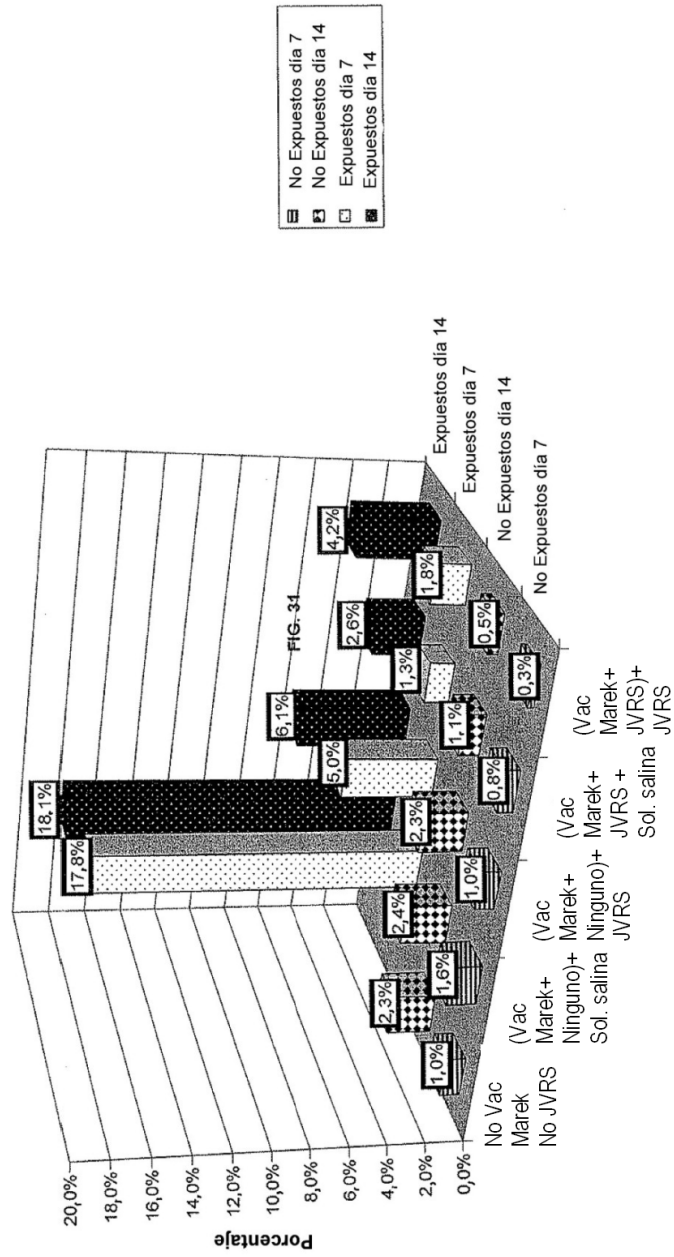


FIG. 31

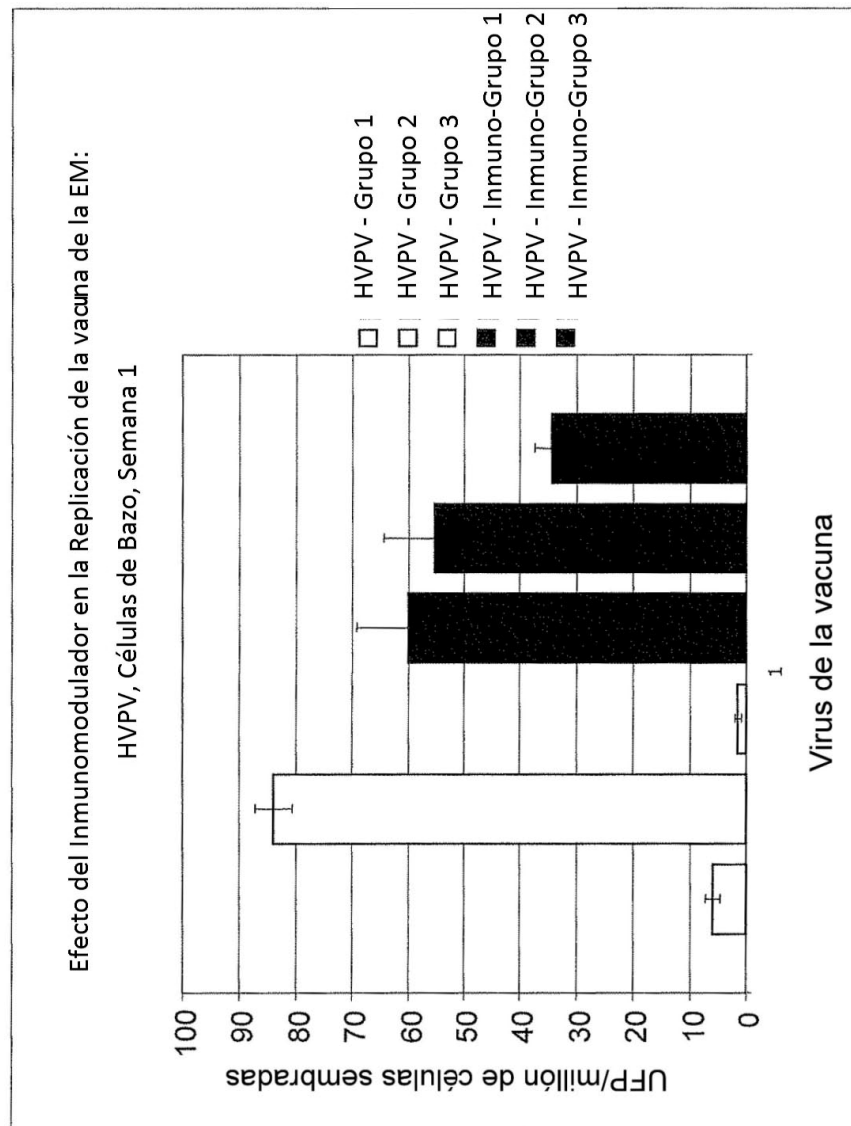


FIG. 32

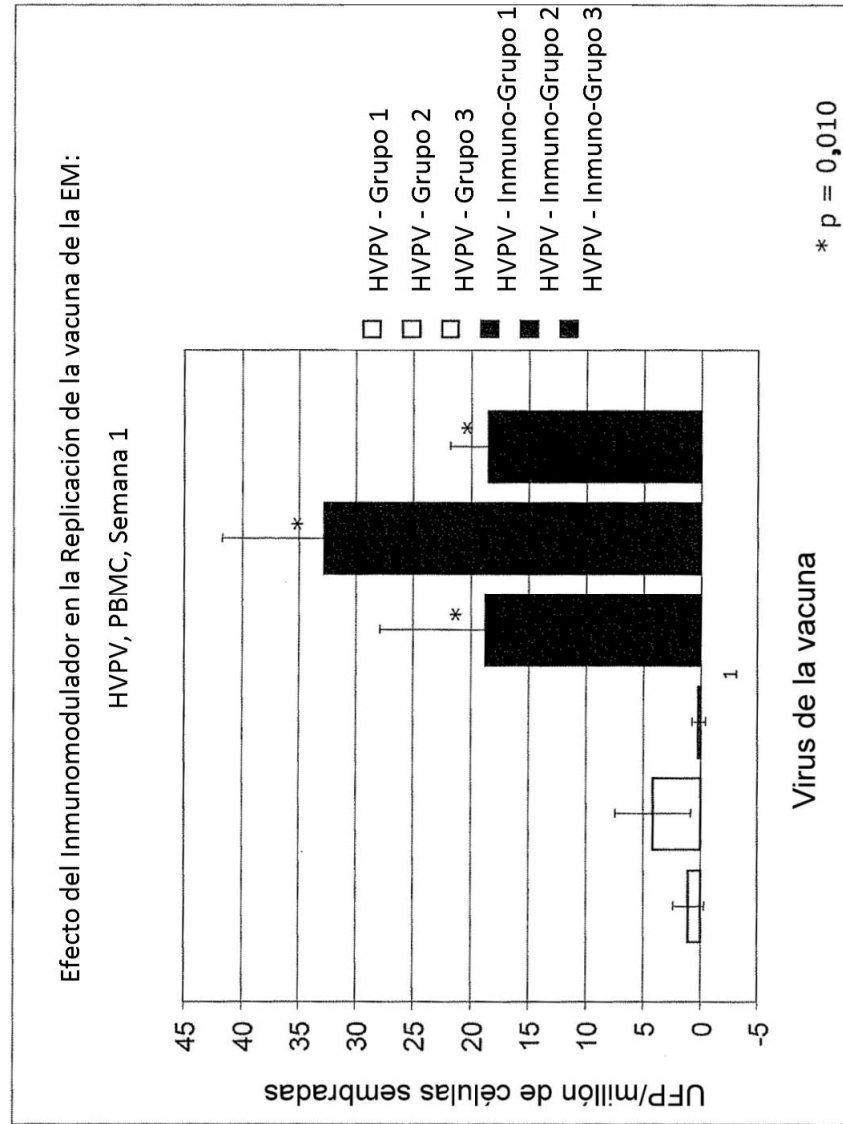


FIG. 33

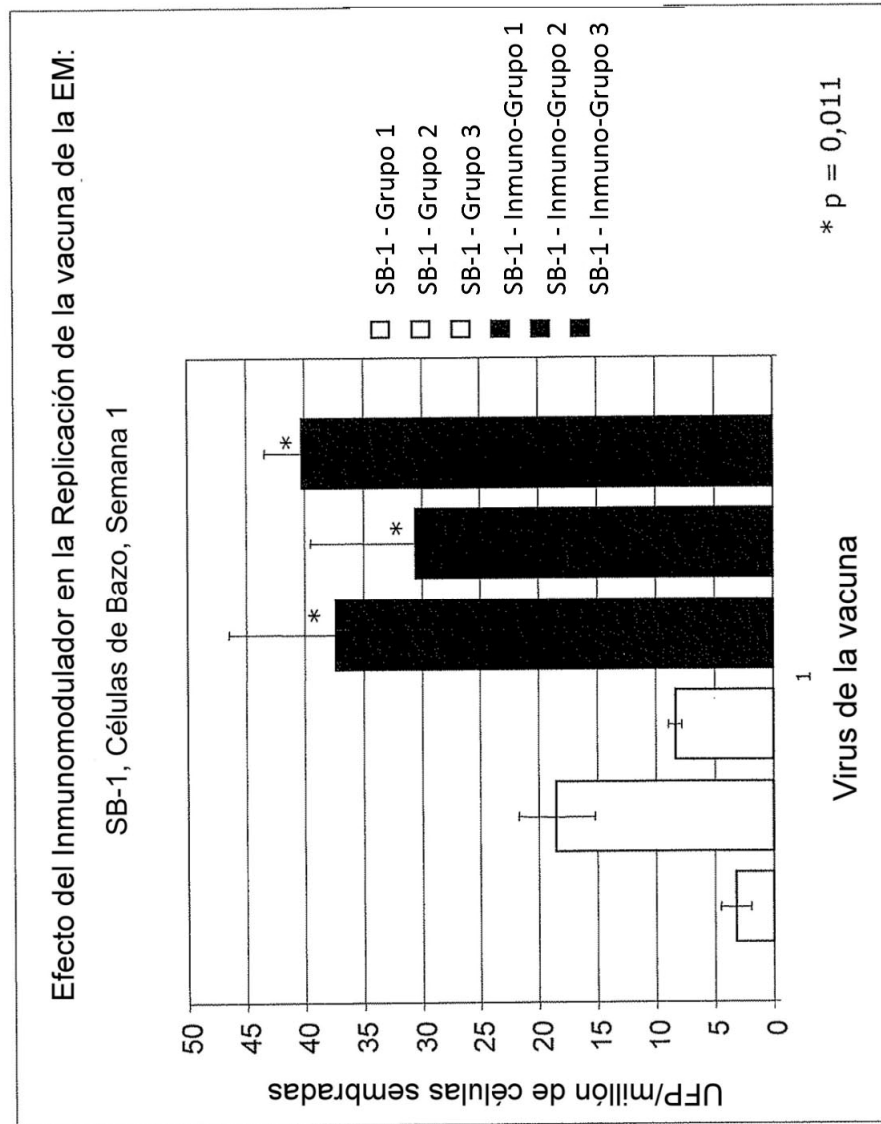


FIG. 34

Efecto del Inmunomodulador en la Replicación de la vacuna de la EM:

SB-1, PBMC, 1 Semana

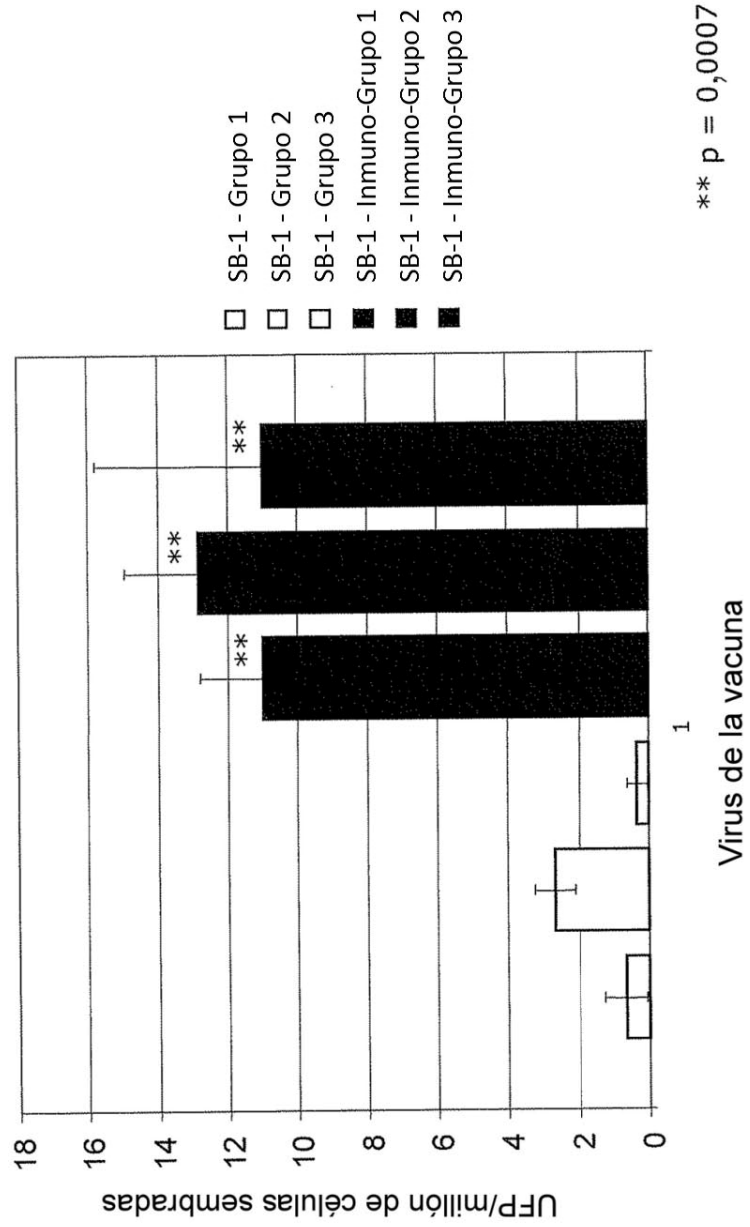


FIG. 35

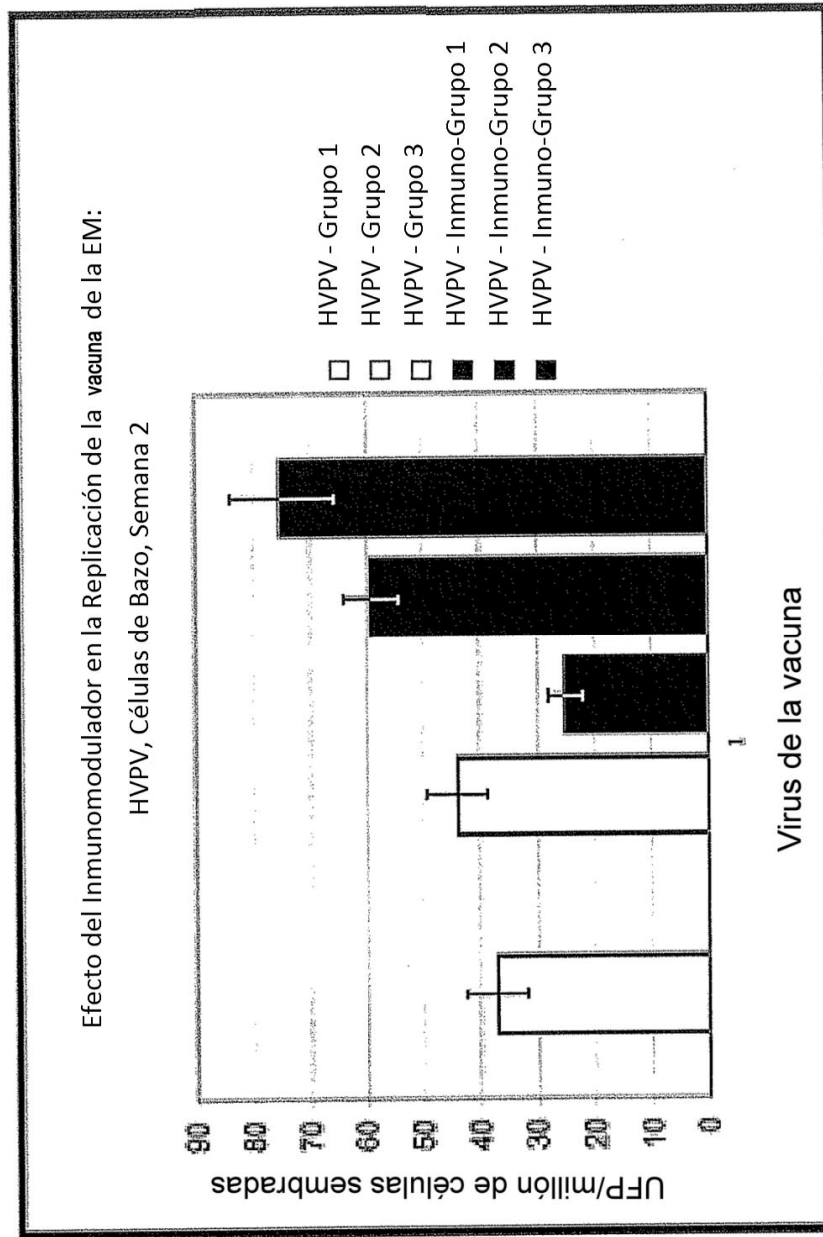


FIG. 36

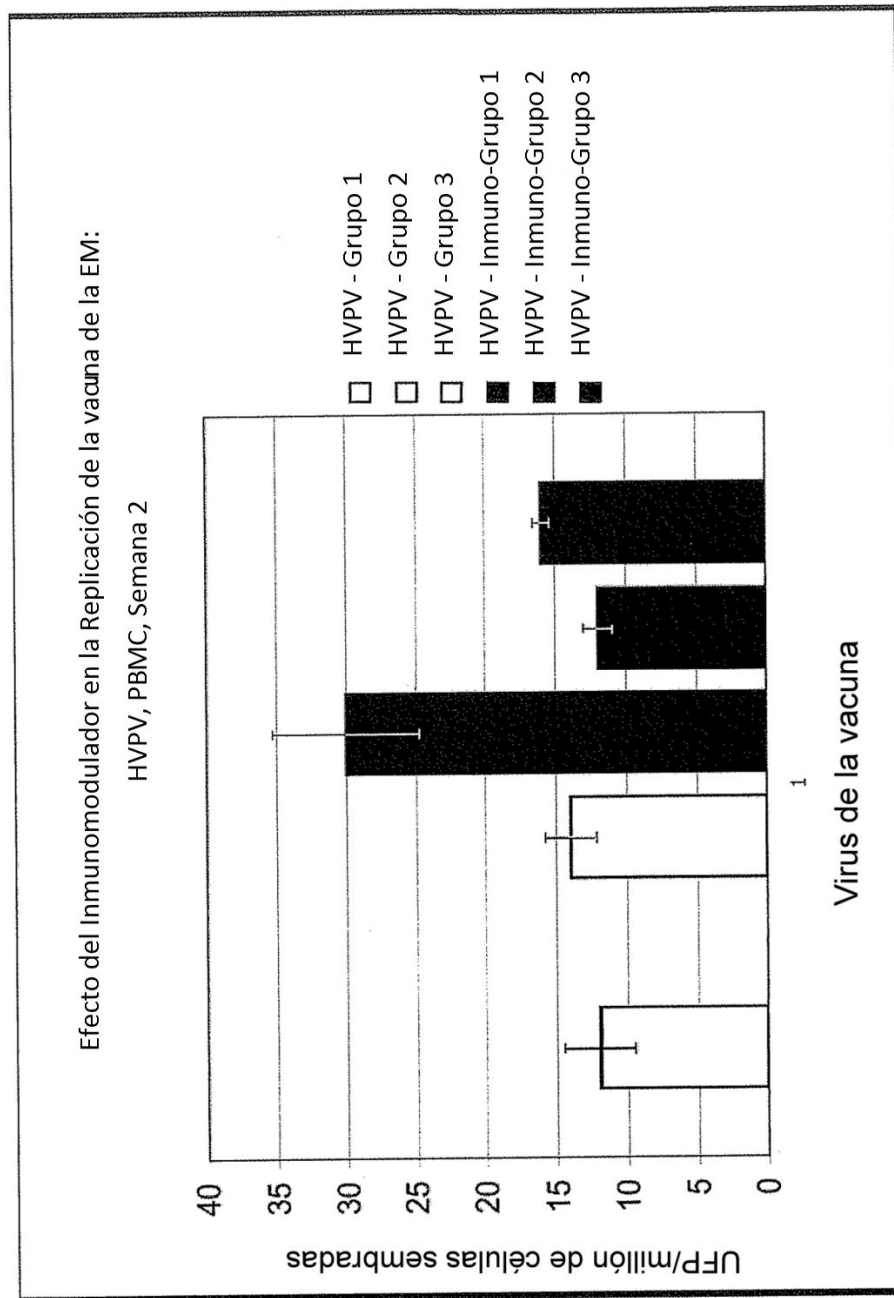


FIG. 37

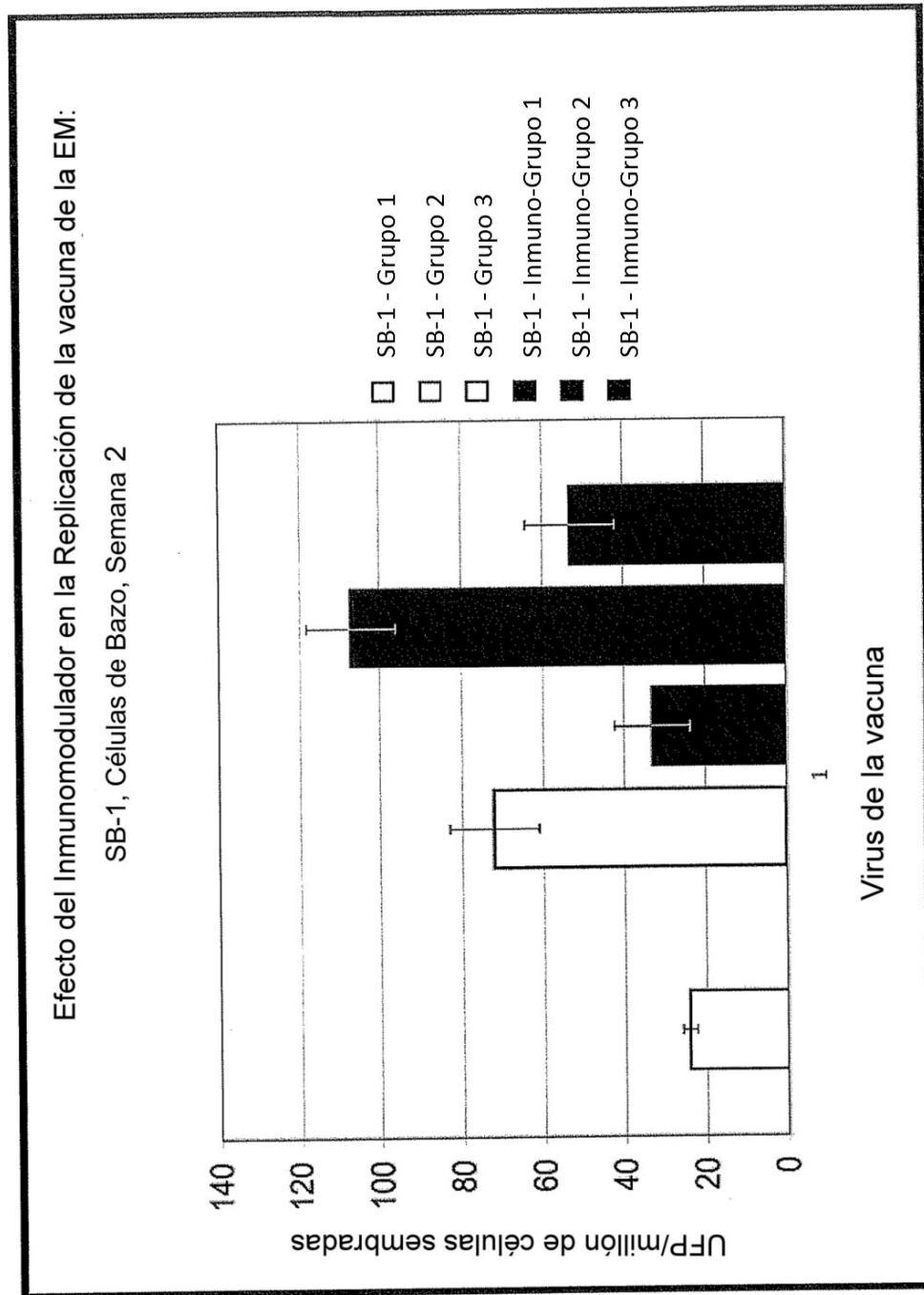


FIG. 38

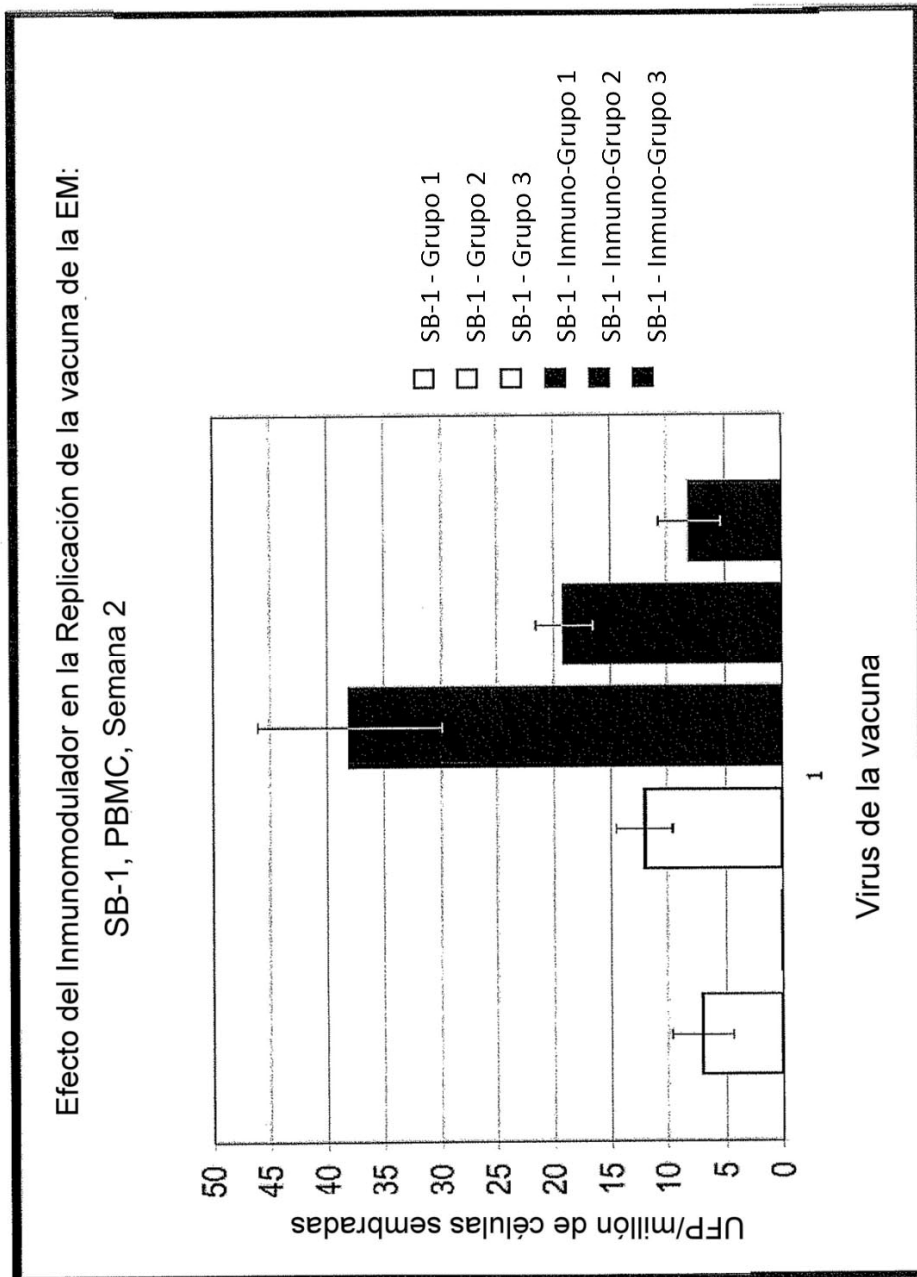


FIG. 39

Sacculitis Aérea

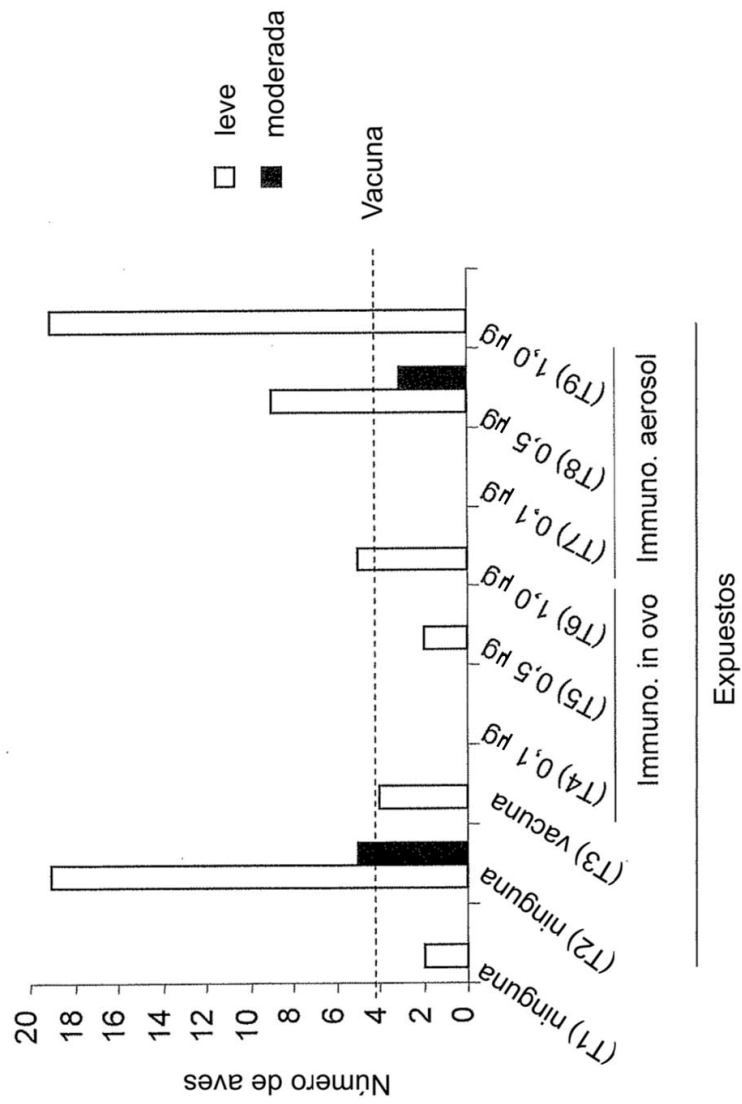


FIG. 40

ELISA día 26

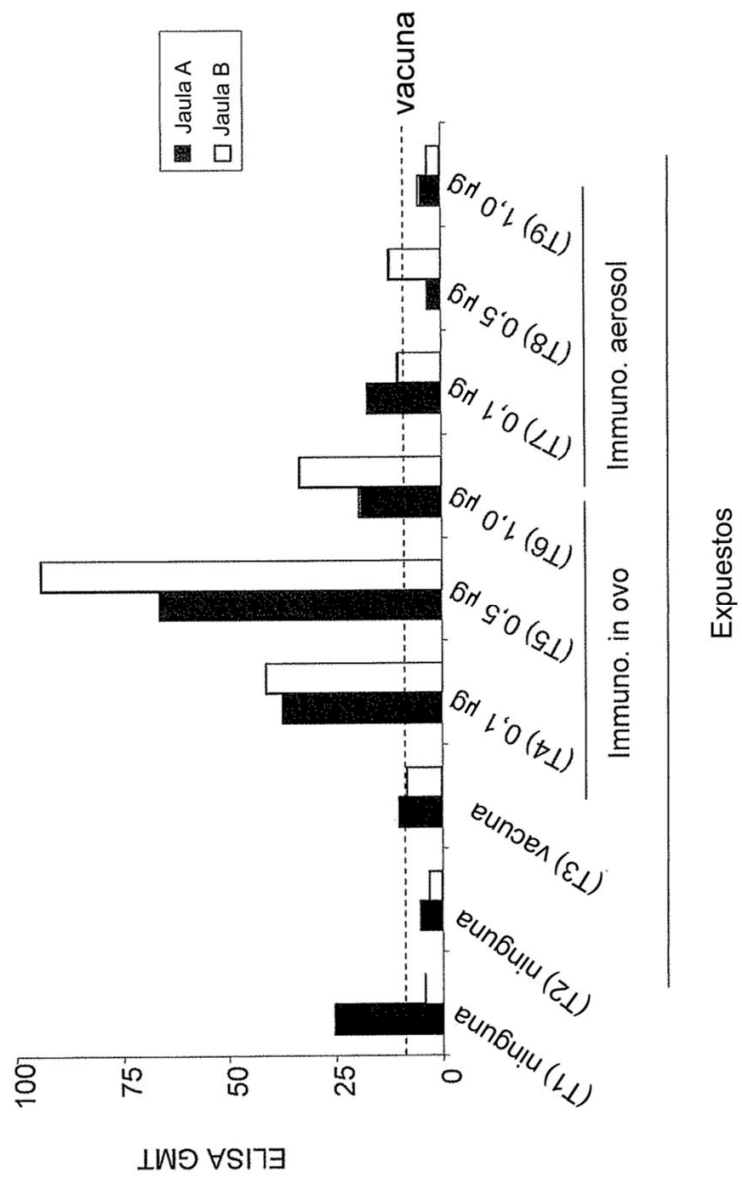


FIG. 41

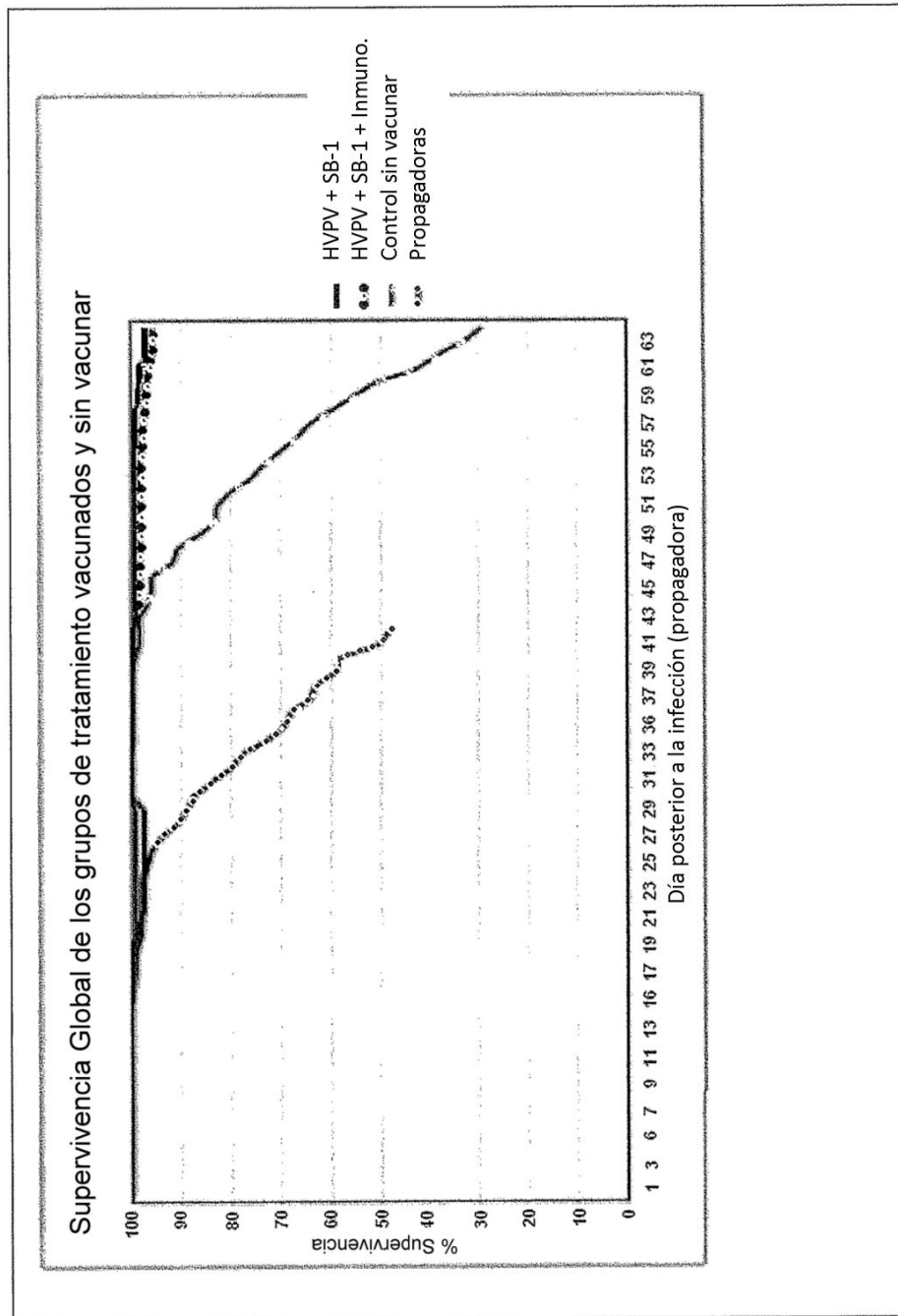


FIG. 42

