

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 261**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/465 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2001 PCT/US2001/29620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2002 WO0224746**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2001 E 01973344 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 1320547**

54 Título: **Factor de transferencia a partir de huevos de ave**

30 Prioridad:

21.09.2000 US 667147

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

29.11.2016

73 Titular/es:

**4LIFE RESEARCH LC (100.0%)
9850 SOUTH 300 WEST
SANDY, UT 84070, US**

72 Inventor/es:

**HENNEN, WILLIAM, J. y
LISONBEE, DAVID, T.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 592 261 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

Factor de transferencia a partir de huevos de ave

Campo de la invención: La presente invención se refiere generalmente a métodos para generar el factor de transferencia de antígeno específico y composiciones que incluyen tal factor de transferencia de antígeno específico. En particular, la presente invención se refiere a métodos para generar el factor de transferencia de antígeno específico en un huésped aviario y para obtener el factor de transferencia de antígeno específico a partir de huevos.

Antecedentes de la Técnica Relacionada: Muchos patógenos mortíferos se pasan a humanos a partir del reino animal. Por ejemplo, los monos son las fuentes del virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), que provoca el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y la viruela de los monos, la cual es similar a la viruela; los mamíferos de tierra se considera que son la fuente del virus del Ébola, los murciélagos de las frutas y los cerdos son la fuente del virus de Nipah; el virus de Hendra viene de los caballos; la "Gripe de Hong Kong" originada en las gallinas; y las aves salvajes, especialmente los patos, son las fuentes de muchos de los virus de influenza mortífera. Muchas enfermedades también tienen receptáculos animales. Por medio del ejemplo, los ratones portan el virus de Ranta, las ratas portan la Plaga Negra, y los ciervos portan la enfermedad de Lyme.

El sistema inmunitario

Los sistemas inmunitarios de los vertebrados son equipados para reconocer y defender al cuerpo de los organismos patógenos invasores, tales como parásitos, bacterias, hongos y virus. Los sistemas inmunitarios de los vertebrados típicamente incluyen un componente celular y un componente no celular

El componente celular de un sistema inmunitario incluye los así llamados linfocitos, o glóbulos blancos, de los cuales existen varios tipos. Es el componente celular de un sistema inmunitario maduro que monta típicamente una respuesta primaria, no específica a patógenos invasores, al igual que implicarse en una respuesta secundaria, específica a los patógenos.

En la respuesta primaria, o inicial a una infección por un patógeno, los glóbulos blancos que se conocen como fagocitos localizan y atacan los patógenos invasores. Típicamente, un fagocito internalizará, o "comerá" un patógeno, después digerirá el patógeno. Adicionalmente, los glóbulos blancos producen y excretan químicos en respuesta a las infecciones patógenas que pretenden atacar los patógenos o ayudan en la dirección del ataque sobre los patógenos.

Solamente si una infección por los patógenos invasores continúa eludiendo, la respuesta inmunitaria primaria es una respuesta inmunitaria específica, secundaria a la necesidad del patógeno. Ya que esta respuesta inmunitaria secundaria típicamente se retarda, se conoce también como "hipersensibilidad tipo retardada". Un mamífero, por si mismo, típicamente no producirá una respuesta inmunitaria secundaria a un patógeno hasta aproximadamente siete (7) a aproximadamente catorce (14) días después de infectarse con el patógeno. La respuesta inmunitaria secundaria también se refiere como una inmunidad adquirida en los patógenos específicos. Los patógenos tienen una o más proteínas características, las cuales se denominan como "antígenos". En una respuesta inmunitaria secundaria, los glóbulos blancos conocidos como linfocitos B, o "células B", y linfocitos T o "células T", "aprenden" a reconocer uno o más de los antígenos de un patógeno. Las células B y las células T trabajan juntas para generar proteínas llamadas "anticuerpos", las cuales son específicas para uno o más de ciertos antígenos en un patógeno.

Las células T son principalmente responsables por la respuesta inmunitaria de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria en un patógeno o agente antigénico. Existen tres tipos de células T: las células auxiliares T, las células supresoras T y las células T de antígeno específico, las cuales también se denominan como linfocitos T citotóxicos (que significa "exterminio de células"), linfocitos T ("CTL"), o células citotóxicas T. Las células auxiliares T y supresoras T aunque no son específicas para ciertos antígenos, realizan las funciones de condicionamiento (por ejemplo, la inflamación que típicamente acompaña a una infección) que ayudan en la eliminación de patógenos o agentes antígenos de un huésped infectado.

Los anticuerpos, que forman solamente una parte del componente no celular de un sistema inmunitario, reconocen los antígenos específicos Y, de este modo, se dice que son "antígenos específicos". Los anticuerpos generados entonces ayudan básicamente a los glóbulos blancos a localizar y eliminar el patógeno del cuerpo. Típicamente, una vez que un glóbulo blanco ha generado un anticuerpo contra un patógeno, el glóbulo blanco y todos sus progenitores continúan produciendo el anticuerpo. Después de que se elimina una infección, un número pequeño de células T y células B que corresponde a los antígenos reconocidos se retiene en un estado de "descanso". Cuando los agentes patógenos o antígenos correspondientes nuevamente infectan al huésped, las células T y células B que "descansan" se activan y, dentro de aproximadamente cuarenta y ocho (48) horas, inducen una rápida respuesta inmunitaria. Al responder de esta manera, el sistema inmunitario monta una respuesta inmunitaria secundaria en un patógeno, se dice que el sistema inmunitario tiene una "memoria" para ese patógeno.

Se sabe que los sistemas inmunitarios de mamíferos también producen proteínas más pequeñas, conocidas como “factores de transferencia”, como parte de una respuesta inmunitaria secundaria para patógenos infecciosos. Los factores de transferencia son otra parte no celular de un sistema inmunitario de mamífero. Los factores de transferencia de antígeno específico se considera que son estructuralmente análogos a los anticuerpos, pero en una escala molecular mucho más pequeña. Ambos factores de transferencia de antígeno específico y anticuerpos incluyen los sitios de antígeno específico y ambos incluyen regiones altamente conservadas que interactúan con los sitios receptores en sus células efectoras respectivas. En el factor de transferencia y las moléculas de anticuerpo, una tercera región “enlazadora” conecta los sitios de antígeno específico y las regiones altamente conservadas.

La función del factor de transferencia en el sistema inmunitario

El factor de transferencia es un aislamiento de bajo peso molecular de linfocitos. Estrechamente, los factores de transferencia pueden tener especificidad para antígenos sencillos. Las Patentes de los Estados Unidos 5,840,700 y 5,470,835, ambas otorgadas a Kirkpatrick et al. (denominada colectivamente en lo sucesivo como las patentes “Kirkpatrick”), describen el aislamiento de los factores de transferencia que son específicos para ciertos antígenos. Más ampliamente, los factores de transferencia “específica” se han generado a partir de cultivos celulares de linfocitos monoclonales. Aún si estos factores de transferencia se generan contra un solo patógeno, tienen especificidad para una variedad de sitios antígenos de ese patógeno. De este modo, estos factores de transferencia se dice que son “patógeno específicos” en lugar de antígeno específico. Similarmente, los factores de transferencia que se obtienen de un huésped que se ha infectado con un cierto patógeno, son patógenos específicos. Aunque tales preparaciones con frecuencia se denominan en la técnica como “antígeno específicos” debido a su capacidad de producir una respuesta inmunitaria secundaria cuando está presente un antígeno particular, los factores de transferencia que tienen diferentes especificidades también pueden estar presentes. De este modo, aún las preparaciones de factor de transferencia patógeno específico así llamado “antígeno específico” pueden ser específicas para una variedad de antígenos.

Adicionalmente, se considera que los factores de transferencia de antígeno específico y patógeno específico pueden provocar que un huésped produzca una respuesta inmunitaria de hipersensibilidad tipo retardada a patógenos o antígenos por los cuales las moléculas del factor de transferencia no son específicas. El factor de transferencia “extrae” por lo menos las células T no específicas, las células inductoras T y supresoras T, para un patógeno infeccioso o agente antigénico para facilitar una respuesta inmunitaria de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria al patógeno infeccioso o agente antigénico.

Típicamente, el factor de transferencia incluye un aislamiento de proteínas obtenidas a partir de fuentes de mamíferos inmunológicamente activas y que tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 10,000 Dalton (D). Se sabe que cuando el factor de transferencia se agrega in vitro o in vivo a sistemas celulares inmunitarios de mamíferos, mejora o normaliza la respuesta del sistema inmunitario del mamífero receptor.

Los sistemas inmunitarios de recién nacidos típicamente no han desarrollado, o “madurado” lo suficiente para defender efectivamente al recién nacido de patógenos invasores. Adicionalmente, antes del nacimiento, muchos mamíferos son protegidos contra un amplio rango de patógenos por sus madres. De este modo, muchos mamíferos recién nacidos no pueden producir inmediatamente una respuesta secundaria a una variedad de patógenos. Más bien, los mamíferos recién nacidos típicamente se les da inmunidad secundaria contra patógenos por sus madres. Una forma en la cual las madres se conoce que refuerzan los sistemas inmunitarios de los recién nacidos es al proporcionar al recién nacido con un conjunto de factores de transferencia. En mamíferos, el factor de transferencia se proporciona por una madre a un recién nacido en el calostro, el cual típicamente se restituye por la leche de la madre después de un día o dos. El factor de transferencia básicamente transfiere la inmunidad específica adquirida de la madre al recién nacido (es decir, la hipersensibilidad tipo retardada). Esta inmunidad transferida típicamente condiciona las células del sistema inmunitario del recién nacido para que reaccione contra patógenos en una forma de antígeno específico, así como en una forma de antígeno o patógeno no específico, hasta que el sistema inmunitario del recién nacido sea capaz por mismo de defender al recién nacido contra patógenos. De este modo, cuando el factor de transferencia está presente, el sistema inmunitario del recién nacido se condiciona para que reaccione contra patógenos con una respuesta hipersensible, tal como aquella que ocurre con una respuesta de hipersensibilidad tipo retardada típica. Por consiguiente, se dice que el factor de transferencia “inicio de salto” la capacidad de respuesta de los sistemas inmunitarios a los patógenos.

Gran parte de la investigación que implica el factor de transferencia se ha llevado a cabo en años recientes. Actualmente, se considera que el factor de transferencia es una proteína con una longitud de aproximadamente cuarenta y cuatro (44) aminoácidos. El factor de transferencia se considera que tiene un peso molecular en el rango de aproximadamente 4,000 a aproximadamente 5,000 Dalton (D), o aproximadamente 4kD a aproximadamente 5 kD. El factor de transferencia se considera también que incluye tres fracciones funcionales: una fracción inductora; una fracción inmunosupresora; y una fracción de antígeno específico. Muchos en la técnica consideran que el factor de transferencia también incluye una porción nucleósida, que puede conectarse a la molécula proteínica o separarse de la misma, que puede mejorar la capacidad del factor de transferencia para provocar que un sistema inmunitario de mamífero produzca una respuesta inmunitaria secundaria. La porción nucleósida puede ser parte de las fracciones inductoras o supresoras del factor de transferencia.

La región de antígeno específico de los factores de transferencia de antígeno específico se considera que comprende aproximadamente ocho (8) a aproximadamente doce (12) aminoácidos. Una segunda región altamente conservada de aproximadamente diez (10) aminoácidos se considera que es una región de unión de receptor celular T de muy alta afinidad. Los aminoácidos restantes pueden servir para enlazar las dos regiones activas o pueden tener propiedades adicionales, aún no descubiertas. La región de antígeno específico de una molécula de factor de transferencia, que es análoga a la estructura de antígeno específico conocida de los anticuerpos, pero a una escala de peso molecular mucho más baja, parece que es hipervariable y se adapta para reconocer una proteína característica en uno o más patógenos. Las fracciones inductoras e inmunosupresoras se considera que imparten un factor de transferencia con su capacidad para condicionar las diversas células del sistema inmunitario para que las células sean más completamente sensibles al estímulo patógeno en su ambiente.

Fuentes de componentes del sistema inmunitario no celulares

Convencionalmente, el factor de transferencia se ha obtenido a partir del calostro de vacas lecheras. Mientras las vacas lecheras típicamente producen grandes cantidades de calostro y, de este modo, grandes cantidades del factor de transferencia durante un período relativamente corto de tiempo, las vacas lecheras solamente producen calostro durante aproximadamente un día o un día y medio al año. De este modo, las vacas lecheras no son una fuente constante del factor de transferencia ni una fuente eficiente del factor de transferencia.

El factor de transferencia también se ha obtenido a partir de una amplia variedad de otras fuentes de mamíferos. Por ejemplo, en la investigación del factor de transferencia, se han utilizado ratones como una fuente para el factor de transferencia. Los antígenos típicamente se introducen en forma subcutánea en los ratones, que entonces se sacrifican después de una reacción de hipersensibilidad tipo retardada contra los antígenos. El factor de transferencia entonces se obtiene a partir de células del bazo de los ratones.

Aunque diferentes mecanismos se utilizan típicamente para generar la producción de anticuerpos, la fuente original para anticuerpos también puede ser los mamíferos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse al inyectar a un ratón, conejo u otro mamífero con un antígeno, obteniendo las células productoras de anticuerpos del mamífero, después fusionando las células productoras de anticuerpos con células inmortalizadas para producir una estirpe celular hibridoma, que continuará produciendo los anticuerpos monoclonales a través de varias generaciones de células y, de este modo, durante largos períodos de tiempo.

Los anticuerpos contra los patógenos de mamíferos se han obtenido a partir de una amplia variedad de fuentes, que incluyen ratones, conejos, cerdos, vacas y otros mamíferos. Adicionalmente, los patógenos que provocan algunas enfermedades humanas, tal como el resfriado común se sabe que se originan en aves. Se ha reconocido que los sistemas inmunitarios aviares (es decir, aves) y los sistemas inmunitarios de mamíferos son muy similares, algunos investigadores se han dirigido a las aves como una fuente para generar anticuerpos.

La Patente de los Estados Unidos 5,080,895, otorgada a Tokoro, el 14 de enero de 1992 (de aquí en adelante "la Patente '895"), describe un método que incluye inyectar a gallinas con patógenos que provocan enfermedades infecciosas intestinales en mamíferos neonatos. Las gallinas entonces producen anticuerpos que son específicos para estos patógenos, los cuales están presentes en los huevos puestos por las gallinas. La Patente '895 describe composiciones que incluyen estos anticuerpos de patógeno específico y el uso de las mismas para tratar y evitar enfermedades intestinales en lechones y terneros neonatos. Adicionalmente, la Patente '895 asume que una sustancia similar al factor de transferencia de patógeno específico se pasa de una gallina a sus huevos. No obstante, la Patente '895 no describe que tal sustancia similar al factor de transferencia de hecho estuvo presente en los huevos, o que una composición libre de anticuerpos derivada de los huevos que se asumieron contenían esta sustancia similar al factor de transferencia realmente trató o evitó enfermedades intestinales en los mamíferos neonatos. De hecho, la Patente '895 describe el uso de un filtro con orificios de aproximadamente 0.45µm de diámetro para aislar el factor de transferencia de los anticuerpos. Sin embargo, en razón a que aquellos expertos en la técnica están enterados, los anticuerpos, moléculas más grandes, virus y aún algunas bacterias pasarán a través de los poros de un filtro de 0.45 µm. En realidad, no es probable que alguna de las moléculas proteínicas individuales que tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 12,000 D se separaren por dicho filtro. Sin embargo, basándose en el tamaño del poro del filtro utilizado, es más probable que ninguna de las moléculas proteínicas individuales, incluyendo anticuerpos, se eliminaran por el filtro.

Los anticuerpos de las aves que son específicos para patógenos de mamíferos también se han obtenido al introducir antígenos dentro de huevos.

El tratamiento de infecciones patógenas en mamíferos con anticuerpos de aves típicamente no es deseable, sin embargo, puesto que los sistemas inmunitarios de mamíferos probablemente responderán negativamente a grandes moléculas de anticuerpos de aves al producir una respuesta inmunitaria a los anticuerpos mismos. Adicionalmente, ya que los sistemas inmunitarios de mamíferos no reconocen los anticuerpos de aves como útiles para sus capacidades para reconocer ciertos patógenos, o las especificidades de los anticuerpos de aves para antígenos de dichos patógenos, los anticuerpos de aves aún no producen las respuestas inmunitarias deseadas en mamíferos.

No se sabe de ninguna técnica que enseñe un método para generar el factor de transferencia en una fuente no mamífera, un método eficiente para obtener el factor de transferencia de tal fuente no mamífera, tal como una fuente de ave, o un método para utilizar tal factor de transferencia para tratar o evitar infecciones por patógenos.

Descripción de la invención

5 La presente invención incluye métodos para generar y obtener el factor de transferencia en una fuente no mamífera como se define en las reivindicaciones 1, 17, y 23. Adicionalmente, las composiciones que incluyen el factor de transferencia no mamífero como se define en las reivindicaciones 24 y 25 también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Las realizaciones de la presente invención se definen en las reivindicaciones dependiente adjuntas.

10 El factor de transferencia no mamífero generado, y obtenido de acuerdo con la presente invención puede ser cualquiera de antígeno no específico o antígeno específico (es decir, configurado para enlazar o reconocer uno o más antígenos). A menos que se indique lo contrario, el término "factor de transferencia como se utiliza en la presente, incluye la definición amplia previamente discutida que incluye cada uno de los diversos tipos de factores de transferencia, incluyendo patógeno específico, antígeno específico, y factor de transferencia que no son específicos para patógenos particulares o agentes antígenos. El término "no específico" como se utiliza en la presente con respecto a los factores de transferencia, se refiere a ambos factores de transferencia que no son particulares y a mezclas específicos que incluyen factores de transferencia con diferentes especificidades de antígeno.

20 El factor de transferencia no específico incluye factor de transferencia que ya produce el animal de fuente no mamífera. Las moléculas del factor de transferencia no específico individuales que se producen por la fuente animal pueden tener especificidad para varios agentes antígenos, incluyendo patógenos, que están presentes en el ambiente de fuente animal. No obstante, para propósitos de la presente invención, el factor de transferencia que se genera solamente por una reacción de fuente animal en su ambiente se refiere como "no específico".

25 Por otro lado, el factor de transferencia de antígeno específico se genera por la exposición de un animal de fuente no mamífera a uno o más antígenos. Los antígenos de varios tipos de patógenos, que incluyen, pero no se limitan a bacterias, virus, hongos y parásitos se ha encontrado por los inventores que inducen la producción del factor de transferencia no específico en fuentes no mamíferas. El factor de transferencia de antígeno específico se ha generado por fuentes animales no mamíferas por ambos antígenos naturales (incluyendo de fuentes vivas, inactivas, y atenuadas) y antígenos sintéticos.

30 La producción de factor de transferencia en una fuente no mamífera puede inducirse al introducir una característica antigénica de un cierto patógeno en un animal de fuente no mamífera hembra. Tipos ejemplares de fuentes animales que pueden utilizarse incluyen, sin limitar el alcance de la presente invención aves, reptiles, anfibios y peces. Preferiblemente, la animal de fuente no mamífera produce huevos en una base frecuente. De este modo, para propósitos de la presente invención, las gallinas son particularmente útiles como la fuente animal no mamífera. Estas fuentes animales no mamíferas producen el factor de transferencia, que entonces aparece en los huevos de estas fuentes animales. Alternativamente, un huevo de un animal de fuente no mamífera puede exponerse al agente antigénico (por ejemplo, mediante inyección del agente antigénico en el huevo) para inducir la producción del factor de transferencia por el huevo mismo.

35 El factor de transferencia generado por un animal de fuente no mamífera o por el huevo de un animal de fuente no mamífera puede recuperarse del huevo y separarse de otros constituyentes del huevo, incluyendo proteínas de peso molecular más grandes, tales como anticuerpos. Alternativamente, el factor de transferencia puede purificarse a partir de uno o más huevos de una fuente animal no mamífera.

40 El factor de transferencia no mamífero puede entonces incorporarse en una composición o aparato para administración a un individuo mamífero o no mamífero o administrarse directamente al individuo. El factor de transferencia no mamífero o las composiciones que incluyen el factor de transferencia no mamífero pueden administrarse enteralmente (es decir, oralmente), o parenteralmente (es decir, por una ruta no oral, tal por inyección, a través de la piel, etc.) La administración de ambos factores de transferencia no mamíferos no específica y específica se ha encontrado que inician una respuesta inmunitaria específica, temprana (es decir, secundaria) en mamíferos a varios patógenos invasores. De este modo, el factor de transferencia no mamífero se ha encontrado que es útil para tratar y evitar enfermedades que pueden provocarse por estos diversos patógenos.

otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a través de la consideración de la siguiente descripción, los dibujos anexos y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

50 En los dibujos, que ilustran modalidades ejemplares de la presente invención:

La Figura 1 es una representación esquemática de un método de ejemplo para generar el factor de transferencia no mamífero en una fuente animal no mamífera;

La Figura 2 es una representación esquemática de un método de ejemplo para generar un factor de transferencia no mamífero directamente en los huevos de una fuente animal no mamífera;

La Figura 3 es una representación esquemática de un método de ejemplo para obtener el factor de transferencia no mamífero a partir de huevos; y

5 La Figura 4 es una representación esquemática de un método de ejemplo para probar la presencia del factor de transferencia en una solución y para usar el factor de transferencia para evitar la infección por patógenos o para evitar infecciones patógenas.

Mejor modo o modos para llevar a cabo la invención

10 Como se explica previamente en la presente, las madres de mamíferos pasan el factor de transferencia a sus crías recién nacidas en el calostro, que se restituye por la leche de la madre después de aproximadamente un día o dos. El factor de transferencia presente en el calostro transfiere la hipersensibilidad tipo retardada para ciertos antígenos a la cría, de este modo "iniciando por salto" la capacidad del sistema inmunitario de la cría recién nacida para responder a ciertos patógenos, si la cría se infecta con estos patógenos.

15 Durante años recientes, se ha descubierto que los sistemas inmunitarios aviares (es decir, aves) son muy similares a aquellos de mamíferos. De hecho, estudios previos de los componentes de sistemas inmunitarios se realizaron en aves. Como resultado de estos estudios previos de sistemas inmunitarios, las células B, uno de los tipos de glóbulos blancos discutidos previamente en la presente, fue de esta manera nombradas debido a su origen en la bolsa de las aves. Adicionalmente, se sabe que varios agentes infecciosos, incluyendo algunos virus que provocan el resfriado común y el virus de influenza A, se originan en aves y se pasan a los humanos.

20 Ya que algunos sistemas inmunitarios de aves portan algunas semejanzas a los sistemas inmunitarios de los mamíferos, se considera que el factor de transferencia también es un componente de los sistemas inmunitarios aviares, así como de los sistemas inmunitarios de otros vertebrados no mamíferos. Adicionalmente, se considera que aunque las madres no mamíferas no proporcionan el calostro a sus crías recién nacidas, estos animales aún pueden transferir la inmunidad a sus crías por medio del factor de transferencia. En aves y otros vertebrados que ponen huevos, la oportunidad principal de la madre para proporcionar el factor de transferencia a sus crías es en la yema del huevo, que suministra al embrión que crece los nutrientes necesarios durante el crecimiento. De este modo, se ha creído por mucho tiempo que el factor de transferencia de antígeno no específico y antígeno específico puede obtenerse de huevos.

30 La Figura 1 ilustra esquemáticamente un método para obtener el factor de transferencia deseado de una fuente 10 no mamífera del factor de transferencia en este caso una gallina. La fuente 10 no mamífera puede exponerse a los agentes 12a antígenos ambientales o exponerse a los agentes 12b antígenos específicos. La fuente 10 no mamífera puede exponerse a los agentes 12b antígenos específicos mediante una inyección, oralmente o de otra manera, como se conoce en la técnica. La fuente 10 no mamífera puede exponerse a los agentes 12b antígenos ya sea con o sin un adyuvante presente. Tal exposición a los agentes 12b antígenos específicos puede ocurrir una vez o repetirse. Para simplicidad, los agentes 12a y 12b antígenos también se denominan en la presente como agentes 12b antígenos o simplemente como antígenos.

35 Alternativamente, con referencia a la Figura 2, un huevo 14' de un animal no mamífero puede exponerse directamente a uno o más agentes 12 antígenos, tales como por inyección o de otra manera, como se conoce en la técnica.

40 Con referencia a la Figura 3, después de que la fuente 10 no mamífera o los huevos 14' no mamíferos que se expusieron directamente a uno o más agentes 12 antígenos se les ha proporcionada una oportunidad adecuada para producir una respuesta inmunitaria de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria a los agentes 12 antígenos, los huevos 14 se recolectan. Las yemas 16 y las claras 18 de los huevos 14 entonces se separan uno del otro, y varios procesos de filtración se llevan a cabo sobre las yemas 16 para obtener una fracción 20 soluble en agua de las mismas que incluye el factor de transferencia. Las proteínas de peso molecular más grande, tales como anticuerpos, también pueden removerse de la fracción 20 soluble en agua de las yemas 16 mediante procesos conocidos, tales como por filtración sobre la base del peso molecular o al provocar que estas proteínas de peso molecular más grande se precipiten de la solución (por ejemplo, en alcohol etílico frío), luego removiendo el precipitado 21 de la fracción 20 soluble en agua (por ejemplo, por filtración) para proporcionar una solución 22 que contiene el factor de transferencia, sustancialmente libre de anticuerpos. Alternativamente, las yemas 16 y los huevos 18 no necesitan separarse.

50 Adicionalmente, el factor de transferencia no mamífero de antígeno específico presente en la fracción 20 soluble en agua de las yemas 16 o en la solución 22 puede purificarse sustancialmente a partir de otros constituyentes de la fracción 20 soluble en agua o la solución 22 por técnicas conocidas, tal como mediante el uso de penetración por gel o técnicas de cromatografía de afinidad descritas en Las Patentes de los Estados Unidos 5,840,700 y 5,470,835, ambas otorgadas a Kirkpatrick et al. (denominadas colectivamente en lo sucesivo como "las Patentes de Kirkpatrick"). La técnica descrita en las Patentes de Kirkpatrick se utiliza para aislar las biomoléculas, tales como el factor de transferencia y los anticuerpos,

de los otros constituyentes de una solución sobre la base de la especificidad de estas biomoléculas para uno o más antígenos u otros agentes aglutinantes específicos. De este modo, cuando la técnica descrita en las Patentes de Kirkpatrick se utiliza en la fracción 20 soluble en agua que contiene el factor de transferencia y anticuerpos de la yema 16 de huevo, tanto el factor de transferencia como el anticuerpo pueden aislarse del resto de la fracción 20 soluble en agua con la solución 24 resultante incluyendo el anticuerpo y el factor de transferencia. Si, por otro lado, la técnica descrita en las Patentes de Kirkpatrick se lleva a cabo sobre una solución 22 que contiene el factor de transferencia, sustancialmente libre de anticuerpos, el producto será una solución 26 sustancialmente pura del factor de transferencia específico para uno o más antígenos. Desde luego, otros métodos para obtener el factor de transferencia a partir de huevos también se encuentran dentro del alcance de la presente invención, incluyendo métodos para obtener el factor de transferencia a partir de varias preparaciones de huevo, incluyendo huevos enteros, en polvo o liofilizados o yemas de huevo.

Con referencia ahora a la Figura 4, un método de ejemplo para probar la presencia del factor de transferencia no mamífero específico para uno más antígenos en una solución, conocida como un ensayo de cojinetes de ratón, se representa esquemáticamente.

Aunque siete días (7) antes de probar la efectividad del factor de transferencia aviar para provocar que ratones produzcan una respuesta inmunitaria secundaria a un antígeno particular o patógeno para el cual fue específico el factor de transferencia aviar, se prepara una población de control positiva de seis ratones BALB/c hembras. Cada ratón 30 de la población de control positiva, que tiene de aproximadamente nueve (9) semanas a aproximadamente diez (10) semanas, se anestesió con isoflurano. Aproximadamente 0.02 ml de una mezcla de 50/50 (p/p) del adyuvante de Freund y el antígeno 36 particular contra el cual el factor de transferencia aviar a probarse es específico, se administra a cada ratón 30 por medio de dos inyecciones intramusculares, una inyección en cada lado de la base 39 de la cola 38. Ya que estas inyecciones se llevan a cabo alrededor de siete (7) días antes de llevar a cabo el ensayo de cojinetes de ratón, los ratones de la población de control positiva se les permite generar su propia respuesta de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria al antígeno 36.

Aproximadamente veinticuatro (24) horas antes de la prueba de cojinetes de ratón, los ratones de una primera población de prueba, que también incluye seis ratones BALB/c hembras que tienen aproximadamente de nueve (9) a aproximadamente diez (10) semanas (es decir, aproximadamente la misma edad que los ratones de la población de control positiva), también se anestesian con isoflurano. Aproximadamente 0.5 ml de una solución 20, 24 que incluye una preparación que contiene el factor de transferencia aviar y anticuerpo aviar, reconstituida en agua destilada, entonces se administra por inyección subcutánea en la parte posterior del cuello 40 de cada ratón 30 de la primera población de prueba. Al comparar los resultados obtenidos de estos ratones con los resultados obtenidos de los ratones de una segunda población de prueba que se ha tratado con una preparación sustancialmente libre de anticuerpos, puede determinarse las contribuciones relativas del factor de transferencia y el anticuerpo para la tumefacción. Ya que los anticuerpos no producen una respuesta inmunitaria secundaria, se consideró antes de llevar a cabo los experimentos descritos en la presente que la medida de la respuesta inmunitaria secundaria en la primera y segunda poblaciones de prueba de los ratones podría ser muy similar.

Cada ratón de la segunda población de prueba que incluye seis ratones BALB/c hembras, que tienen aproximadamente de nueve (9) a aproximadamente diez (10) semanas de edad, (es decir, aproximadamente la misma edad que los ratones de las poblaciones de control positiva y primera de prueba), también se anestesian con isoflurano. A cada uno de los seis ratones 30 se les proporciona, mediante inyección subcutánea en la parte posterior del cuello 40, aproximadamente 0.5 ml de una solución 22, 26 que incluye, reconstituida en agua destilada, una preparación del factor de transferencia aviar de antígeno específico liofilizada sin sustancialmente anticuerpos.

Una población de control negativa también incluye seis ratones BALB/c hembras de aproximadamente nueve (9) a aproximadamente diez (10) semanas de edad (es decir, aproximadamente las mismas edades que las otras poblaciones de ratones).

Para poder llevar a cabo el ensayo de cojinetes de ratón, los ratones de cada una de las cuatro poblaciones se anestesian y se miden las distancias a través de cada cojinete 32 trasero derecho más grande y el cojinete 34 derecho izquierdo más grande de cada ratón 30, tal como con un calibre de Starrett. El cojinete 32 trasero derecho entonces se inyecta subcutáneamente con una solución que contiene el antígeno 36. El cojinete 34 trasero izquierdo, el cual se utiliza como control, se inyecta con aproximadamente el mismo volumen de una solución 37 de control, tal como un diluyente de solución salina estéril, como el volumen de solución que se inyecta en el cojinete 32 trasero derecho.

Después de que ha transcurrido una cantidad suficiente de tiempo (por ejemplo, aproximadamente dieciséis (16) a aproximadamente veinticuatro (24) horas), cada ratón 30 se anestesia nuevamente y se miden las distancias a través de los cojinetes 32, 34 traseros derecho e izquierdo. Una cantidad significativa de tumefacción, determinada por un incremento en las distancias a través de un cojinete 32 trasero derecho del ratón 30, es indicativa de la ocurrencia de una reacción de hipersensibilidad tipo retardada en ese cojinete 32.

Desde luego, diferentes soluciones 24, 26 que incluyen los factores de transferencia con especificidades para diferentes antígenos pueden probarse en diferentes pruebas de ratones para detectar cualquier diferencia en las capacidades de

estas soluciones para transferir la inmunidad de hipersensibilidad tipo retardada a los ratones. Adicionalmente, los resultados para cada solución pueden compararse con aquellos obtenidos a partir de las poblaciones de control positiva y de control negativa de los ratones 30. Si se presenta una tumefacción significativa en los cojinetes 34 traseros derechos de los ratones 30 a los cuales se administró una solución sustancialmente libre de anticuerpos tal como la solución 22 o la solución 26 de la Figura 3, la hipersensibilidad tipo retardada que provoca tal tumefacción se atribuye al factor de transferencia administrado.

Los siguientes ejemplos solamente son ilustrativos de las modalidades del método para generar y obtener el factor de transferencia que incorpora las enseñanzas de la presente invención:

EJEMPLO 1

El factor de transferencia específico para el Virus de Newcastle se generó al exponer a pollitos de un día de edad a una fuerte aspersión de la vacuna de bronquitis infecciosa /Virus de Newcastle (IBNC), como se conoce en la técnica, en cero (0) días, cuarenta y dos (42) días y ochenta y cuatro (84) días. Se recolectaron huevos puestos por estas cinco gallinas en aproximadamente ciento setenta y cinco (175) días después de la primera inyección de la vacuna de IBNC.

EJEMPLO 2

Las yemas de una primera prueba de los huevos que contienen el factor de transferencia de antígeno específico generados en el EJEMPLO 1 se separaron de las claras, diluidas aproximadamente seis (6), a aproximadamente nueve (9) veces en volumen, en agua desionizada (es decir, aproximadamente una (1) parte de la clara de huevo mezclada con aproximadamente cinco (5) partes de agua a aproximadamente ocho (8) partes de agua) y se congelaron. La capa de lípido de estas yemas de huevo congeladas se separó mecánicamente de la fracción soluble en agua de las yemas de huevo. Esta fracción soluble en agua entonces se dejó descongelar a temperatura de aproximadamente 4° C a aproximadamente 6° C y el vacío se filtró mediante el uso de un papel de filtro cualitativo de Whatman utilizando un embudo de Büchner de porcelana de 55 mm de diámetro. El producto filtrado entonces se filtró al vacío a través de un filtro de microfibras de vidrio, nuevamente utilizando un embudo de Büchner de 55 mm de diámetro.

Una tercera filtración entonces se llevó a cabo para recolectar las proteínas y para remover los lípidos y lipoproteínas de la solución. La tercera filtración se efectuó por medio de una membrana hidrófila de DURAPORE (RTM). La fracción que contenía la proteína, que incluyó tanto al factor de transferencia como el anticuerpo específico para el patógeno de bronquitis infecciosa y el virus de Newcastle se recolectó, congeló y liofilizó, o se secó por congelamiento, como se conoce en la técnica.

EJEMPLO 3

Las fracciones solubles en agua de las preparaciones de yema diluida de una segunda muestra de los huevos recolectados en el EJEMPLO 1 se separaron nuevamente en forma mecánica de las porciones de lípidos de las mismas y se filtraron, como se explicó anteriormente en el EJEMPLO 2.

De acuerdo con el método descrito en la Patente de los Estados Unidos 4,180,627, la cual se expidió a Klesius et al., un volumen adecuado de alcohol etílico (EtOH), o etanol, se agregó a la fracción que contenía proteína para diluir el alcohol etílico a una concentración de aproximadamente 60% del volumen total de la solución de fracción de alcohol-proteína. Esta solución entonces se enfrió a una temperatura de aproximadamente 4 a aproximadamente 6° C durante un período largo suficiente de tiempo (por ejemplo, durante la noche, o por aproximadamente 10-12 horas) para proteínas de peso molecular más grande, incluyendo anticuerpos, presentes en la solución para precipitarse a partir de la solución. Proteínas de peso molecular más pequeño (por ejemplo, proteínas que tienen pesos moleculares de aproximadamente 8,000 D o menos), que incluyen cualquier factor de transferencia a partir de las yemas de huevo permanecieron en la solución.

El precipitado que contenía la proteína de peso molecular más grande entonces se retiró de la solución al filtrar la solución a través de un filtro de microfibras de vidrio de Whatman en un embudo de Büchner de 55 mm de diámetro'. CELITE®, una diatomita o tierra diatomácea, auxiliar de filtración disponible de Celite Corporation de Lompoc, California, se utilizó para evitar que el precipitado tapara el filtro durante la filtración de la solución. Esta solución libre de precipitado sustancialmente entonces se recolectó, congeló y liofilizó como se conoce en la técnica.

EJEMPLO 4

Cada ratón de una población de prueba que incluyó tres ratones BALB/c, tiene una edad en el rango de aproximadamente nueve (9) a aproximadamente diez (10) semanas, se probó para determinar si el factor de transferencia aviar específico-IBNV podría impartir una respuesta inmunitaria, de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria temprana a los ratones. Cada ratón se anestesió con isoflurano. Las distancias a través de los cojinetes más largos de ambas patas traseras izquierda y derecha de cada ratón entonces se midieron con un calibre de Starrett. A cada ratón entonces se le dio una

ES 2 592 261 T3

inyección subcutánea en la parte posterior del cuello de aproximadamente 0.5 ml de una solución que incluyó aproximadamente 16% en peso del factor de transferencia aviar específico-IBNV reconstituida en agua destilada.

5 Después de aproximadamente veinticuatro (24) horas, cada uno de los ratones nuevamente se anestesió con isoflurano. Aproximadamente 0.01 ml de un diluyente de solución salina estéril entonces se inyectó en el cojinete más largo de la pata trasera del ratón, cuyo cojinete sirvió como control, mientras el cojinete más largo de la pata trasera derecha de cada ratón se inyectó con aproximadamente 0.01 ml de una solución que incluye aproximadamente 10,000 dosis de la vacuna de Newcastle-Bronquitis reconstituida en aproximadamente 250 ml de agua destilada.

10 Antes de que hubieran transcurrido otras veinticuatro (24) horas, uno de los ratones (Ratón #1) murió. Los dos ratones restantes nuevamente se anestesiaron con isoflurano y se midieron los cojinetes más largos de sus patas traseras nuevamente. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 1

Virus Newcastle – Población de Prueba			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra	Final	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2150		
pata derecha (Prueba)	2151		
Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2180	2350	50
pata derecha (Prueba)	2165	2440	85
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2145	2160	15
pata derecha (Prueba)	2110	2200	90

15 El incremento más grande en tamaño, o tumefacción, del cojinete derecho (incrementos de 85 μm y 90 μm) sobre aquel del cojinete izquierdo (incrementos de 50 μm y 15 μm respectivamente), indica que la solución que contiene el factor de transferencia aviar específico IBNV indujo una reacción de hipersensibilidad tipo retardada en la pata derecha del Ratón #2 y el Ratón #3 dentro de aproximadamente veinticuatro horas después de la introducción de la vacuna de Newcastle-Bronquitis.

20 En los ejemplos restantes, sustancialmente los mismos métodos que aquellos descritos en los EJEMPLOS 1-3 se utilizaron para generar los factores de transferencia aviares específicos para diferentes tipos de antígenos, incluyen sarampión, paperas, rubéola, Hepatitis B, virus de EpsteinBarr (EBV), y *H. pylori*.

25 La efectividad de cada uno de estos diversos tipos de factores de transferencia de aves de antígeno específico en inducir las respuestas inmunitarias de hipersensibilidad de tipo retardada o secundaria temprana en mamíferos entonces se probó por medio de los ensayos de cojinetes de ratones. Cada tipo de factor de transferencia aviar de antígeno específico se probó utilizando cuatro poblaciones diferentes de ratones, incluyendo una población de control positiva, una primera población de prueba, una segunda población de prueba, y una población de control negativa, las cuales se prepararon como se describió anteriormente en la presente con referencia a la Figura 4. El ensayo de cojinetes de ratón para cada tipo de factor de transferencia de antígeno específico se llevó a cabo de acuerdo con las enseñanzas de Petersen EA, Greenberg LE, Manzara T y Kirkpatrick CH, "MURINE TRANSFER FACTOR", r. Description of the model and evidence for specificity, *J. Immunol.*, 126: 2480-84 (1981), En cada ensayo de cojinete de ratón, cuatro poblaciones de ratones se prepararon en la forma descrita en referencia a la Figura 4.

30

ES 2 592 261 T3

5 Al llevar a cabo los diversos ensayos de cojinetes de ratones en cada una de las poblaciones de control positiva, de primera y segunda prueba, y de control negativa, cada ratón se anestesió con isoflurano, el cojinete más largo del cojinete trasero izquierdo de cada ratón, el cual sirvió como control, se inyectó con aproximadamente 0.01 ml de un diluyente de solución salina estéril, y el cojinete más largo de la pata trasera derecha de cada ratón se inyectó con aproximadamente 0.01 ml de una solución que incluye el antígeno o patógeno para el cual fue específico el factor de transferencia aviar.

Aproximadamente dieciséis (16) a aproximadamente veinticuatro (24) horas después de las inyecciones de cojinetes traseros, cada uno de los ratones de las poblaciones de control positiva, prueba, y de control negativa se anestesió nuevamente con isoflurano y los tamaños de los cojinetes traseros izquierdo y derecho de cada uno de los ratones se midió nuevamente, por ejemplo, con un Calibre de Starrett.

10 EJEMPLO 5

15 Al utilizar los mismos procedimientos descritos en los EJEMPLOS 1-3, el factor de transferencia aviar y los anticuerpos de aves específicos para la vacuna de sarampión, paperas y rubéola (MMR) se generaron en gallinas. Cada gallina recibió una dosis de la vacuna de Merck MMR II, como se describe en el EJEMPLO 1 en 150 días, 163 días, 190 días, 221 días y 249 días. Los huevos se recolectaron de estas gallinas justo después de la tercera inoculación – cierto tiempo en el período de aproximadamente el día 192 a aproximadamente el día 223 y se preparó como se describe en el EJEMPLO 1. Esto se hizo en este EJEMPLO y en los siguientes EJEMPLOS para asegurar que un alto nivel del factor de transferencia estuviera presente en los huevos. Se considera que el factor de transferencia se presentará en los huevos aproximadamente siete (7) días después de la primera inoculación.

20 Una población de control positiva de ratones se preparó aproximadamente siete (7) días antes del inicio del ensayo de cojinete de ratón al inyectar a cada ratón de la población de control positiva con la vacuna de Merck MMR II, como se describió anteriormente en la presente en referencia a la Figura 4.

25 Una solución que contiene el anticuerpo aviar y el factor de transferencia aviar específico para la vacuna de MMR se hizo al reconstituirse en agua destilada una preparación liofilizada similar a la descrita en el EJEMPLO 2 a una concentración de aproximadamente 8% en peso. Este factor de transferencia - y la solución que contiene el anticuerpo - se administró a la primera población de prueba de ratones en la forma descrita en referencia a la Figura 4.

El factor de transferencia aviar liofilizado específico para sarampión, paperas y rubéola, preparado por un método similar al descrito en el EJEMPLO 3, se reconstituyó en agua destilada a una concentración de aproximadamente 8% en peso. Este factor de transferencia aviar específico MMR reconstituido entonces se administró a una segunda población de prueba de ratones en la forma descrita previamente en la presente en referencia a la Figura 4.

30 Aproximadamente 0.1 ml de una dosis de la Vacuna de Merck MMR II entonces se administró al cojinete más largo de la pata trasera derecha de cada ratón de cada una de las poblaciones de control positiva, primera prueba, segunda prueba, y de control negativa, mientras sustancialmente la misma cantidad de diluyente de solución salina estéril se administró al cojinete más largo de la pata trasera izquierda de cada ratón, como se describe en referencia a la Figura 4.

35 Aproximadamente dieciséis (16) a aproximadamente veinticuatro (24) horas más tarde, los ratones se anestesiaron nuevamente y los tamaños de los cojinetes más largos de ambas patas traseras de cada ratón se midieron, como se describió previamente. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 2

Vacuna de MMR-Primera Población de Prueba (Anticuerpo y Factor de Transferencia Administrados)			
Tamaño de cojinete (µm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2235.20	76.20
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2387.60	254.00

ES 2 592 261 T3

Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2159.00	25.40 5
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2184.40	0.80
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2159.00	0.00
Pata derecha (Prueba)	2159.00	2184.40	25.40
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2209.80	2235.20	25.40
Pata derecha (Prueba)	2286.00	2311.40	25.40
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2184.40	2184.40	0.00
Pata derecha (Prueba)	2209.80	2260.60	50.80
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2260.60	2336.80	76.20
Pata derecha (Prueba)	2235.20	2438.40	203.20

Los datos para el Ratón #6 pueden haber sido inexactos puesto que las costras de las marcas de mordidas estuvieron presentes en uno o ambos cojinetes traseros de este ratón al momento de que se tomaron las segundas medidas (es decir, en aproximadamente dieciséis (16) a aproximadamente veinticuatro (24) horas). No obstante, con la excepción del Ratón #4, cada uno de los ratones restantes de la primera población de prueba mostró mayor tumefacción al momento de que se tomaron las segundas medidas de los cojinetes en las patas que se inyectaron con la vacuna de MMR II que en los cojinetes que se inyectaron con la solución de control. En el Ratón #4, la cantidad de tumefacción fue aproximadamente la misma en ambos cojinetes izquierdo y derecho.

Generalmente, como puede observarse a partir de los datos de la Tabla 2, los cojinetes más largos de la pata derecha de la primera población de prueba de ratones representados mostraron un promedio de aproximadamente 67.73 μm más tumefacción que la cantidad de tumefacción del cojinete más largo de la pata izquierda de estos ratones.

TABLA 3

Vacuna de MMR-Segunda Población de Prueba (Solamente Factor de Transferencia Administrado)			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1	2082.80	2133.60	50.80
Pata izquierda (Control) Pata derecha (Prueba)	2108.20	2235.20	127.00

ES 2 592 261 T3

Ratón #2	2336.80	2387.60	50.80
Pata izquierda (Control) Pata derecha (Prueba)	2387.60	2641.60	254.00
Ratón #3	2184.40	2184.40	0.00
Pata izquierda (Control) Pata derecha (Prueba)	2184.40	2311.40	127.00
Ratón #4	2133.60	2133.60	0.00
Pata izquierda (control) Pata derecha (Prueba)	2133.60	2133.60	0.00
Ratón #5	2082.80	2540.00	457.20
Pata izquierda (Control) Pata derecha (Prueba)	2108.20	2235.20	127.00
Ratón #6	2260.60	2286.00	25.40
Pata izquierda (Control) Pata derecha (Prueba)	2286.00	2362.20	76.20

5

10

En razón a que las costras de las marcas de mordida estaban visibles en los cojinetes del Ratón #2 y el Ratón #5 en aproximadamente veinticuatro horas después de la inyección de antígeno y la muestra, los datos de estos ratones pueden haber sido inexactos. Adicionalmente, el cojinete más largo de la pata izquierda del Ratón #5 se hinchó más de tres veces tanto como el cojinete correspondiente en la pata izquierda del Ratón #5 y varias veces más que la tumefacción que ocurrió en cualquiera de los cojinetes de los otros ratones probados. Por consiguiente, los datos de tumefacción obtenidos del Ratón #5 también se omitieron ya que esta tumefacción en el cojinete de la pata izquierda fue excesiva. Ningún incremento de la tumefacción en cualquier cojinete que se midió en el Ratón #4. No obstante cada uno del Ratón #1, Ratón #3 y Ratón #6, mostró mayor tumefacción en el cojinete (derecho) que se inyectó con la solución que contiene el factor de transferencia, sustancialmente libre de anticuerpos, que en el cojinete (izquierdo) que se inyectó con la solución de control.

Basándose en los datos presentados en la TABLA 3, en promedio, los cojinetes más largos en la pata derecha de los Ratones #1, 3 y 6 se hincharon aproximadamente 91.4 μm . más que los cojinetes más largos en la pata izquierda de estos ratones.

15

TABLA 4

Vacuna de MMR-Control Positivo			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2184.40	2235.20	50.80
Pata derecha (Prueba)	2184.40	2260.60	76.20

ES 2 592 261 T3

Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2184.40	2209.80	25.40
Pata derecha (Prueba)	2184.40	2209.80	225.40
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2006.60	2133.60	127.00
Pata derecha (Prueba)	1981.20	2108.20	127.00
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2184.40	50.80
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2260.60	127.00
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2108.20	2133.60	25.40
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2286.00	177.80
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2082.80	2133.60	50.80
Pata derecha (Prueba)	2057.40	2209.80	152.40

5 Mientras el Ratón #2 y el Ratón #3 de la población de control positiva mostraron ambos sustancialmente la misma cantidad de tumefacción en los cojinetes más largos de ambas patas traseras izquierda y derecha, cada uno de los otros ratones tuvo una cantidad mayor de tumefacción en los cojinetes más largos de sus patas traseras derechas, y de este modo, desplegaron una respuesta inmunitaria secundaria a la vacuna de MMR que se introdujo en los cojinetes más largos de sus patas traseras derechas, que la cantidad de tumefacción en los cojinetes más largos de las patas traseras izquierda de estos ratones, que se hincharon mucho menos.

10 Basándose en los datos en la TABLA 4, es evidente que la cantidad promedio de tumefacción en los cojinetes más largos de la pata trasera derecha de estos ratones fue de aproximadamente 59.27 μm . mayor que la tumefacción de los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones.

TABLA 5

Vacuna de MMR-Control Negativo			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra	Final	Diferencia
	(0 horas)	(24 horas)	
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2159.00	0.00
Pata derecha (Prueba)	2159.00	2209.80	50.80

ES 2 592 261 T3

Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2159.00	0.00
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2133.60	25.40
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2133.60	0.00
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2108.20	2133.60	25.40
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2108.20	0.00
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2057.40	2057.40	0.00
Pata derecha (Prueba)	2032.00	2032.00	0.00
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2082.80	2133.60	50.80
Pata derecha (Prueba)	2032.00	2082.80	50.80

5 Dos de los ratones, el Ratón #3 y Ratón #5, de la población de control negativa no mostraron tumefacción en el cojinete más largo de sus patas traseras. Los cojinetes más largos en ambas patas traseras del Ratón #6 se hincharon en aproximadamente la misma cantidad. Mientras los cojinetes más largos en la pata trasera izquierda del Ratón #1 y Ratón #4 no se hincharon y los cojinetes en las patas traseras derechas de estos dos ratones ligeramente se hincharon. El cojinete más largo en la pata trasera derecha del Ratón #4 no se hinchó y el cojinete trasero izquierdo más largo solamente se hinchó ligeramente. De hecho, la cantidad promedio de tumefacción en los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de estos ratones solamente fue de aproximadamente 8.47 μm mayor que la cantidad de tumefacción medida en los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de la población de control negativa de los ratones. De acuerdo con lo anterior, los datos en la TABLA 5 indican que los ratones de la población de control negativa no produjeron una respuesta inmunitaria secundaria a la vacuna de MMR.

15 Colectivamente, los datos de las TABLAS 2-5 indican que una respuesta inmunitaria de hipersensibilidad de tipo retardada o secundaria ocurrió en la mayor parte de los ratones en cada una de la primera población de prueba, la segunda población de prueba y la población de control positiva, mientras ninguna respuesta inmunitaria secundaria pareció estar presente en la población de control negativa. Por consiguiente, los datos en las TABLAS 2 Y 3 indican que el factor de transferencia aviar específico para la vacuna de MMR así como el anticuerpo aviar específico para la vacuna de MMR son capaces de inducir una respuesta inmunitaria secundaria temprana en mamíferos.

EJEMPLO 6

20 Repitiendo los procedimientos descritos previamente en los EJEMPLOS 1-3, factor de transferencia aviar y los anticuerpos de aves específicos para el virus de Hepatitis B se generaron por el uso de la vacuna de antígeno de Hepatitis B sintética vendida bajo el nombre comercial ENGERIX-B. Cada gallina recibió una dosis de la vacuna de Hepatitis B, como se describe en EJEMPLO 1, en 150 días, 163 días, 190 días, 221 días y 249 días. Los huevos se recolectaron de estas gallinas algunas veces en el período de aproximadamente el día 193 y aproximadamente el día 223, como se describe en el EJEMPLO 1 anterior, y se preparó como se describe en el EJEMPLO 1.

25 Una población de control positiva de ratones se preparó aproximadamente siete (7) días antes de llevar a cabo el ensayo de cojinetes de ratón al inyectar a cada ratón de la población de control positiva con la vacuna de Hepatitis B sintética, ENGERIX-B en la forma descrita en la referencia de la Figura 4.

ES 2 592 261 T3

Una primera solución, que incluyó tanto el anticuerpo aviar como el factor de transferencia aviar que fueron específicos para la vacuna de Hepatitis B, se hizo al reconstituirse en agua destilada una preparación liofilizada similar a la descrita en el EJEMPLO 2 a una concentración de aproximadamente 16% en peso. Este factor de transferencia y la solución que contiene el anticuerpo se administró a una primera población de prueba de ratones en la forma descrita en referencia a la Figura 4.

Adicionalmente, el factor de transferencia aviar liofilizado específico para la vacuna de Hepatitis B, el cual se preparó en una forma similar a la descrita en el EJEMPLO 3, se reconstituyó en agua destilada a una concentración de aproximadamente 16% en peso. La solución que contiene el factor de transferencia reconstituido entonces se administró a cada uno de los ratones de una segunda población de prueba, como se explicó previamente en la presente en referencia a la Figura 4.

En el momento apropiado, la vacuna de Hepatitis B sintética se administró al cojinete más largo de las patas derechas de cada ratón de cada una de las poblaciones de control positiva, primera prueba, segunda prueba y de control negativa, como se describió anteriormente en la presente en referencia a la Figura 4. El cojinete más largo de la pata izquierda de cada ratón de las cuatro poblaciones se inyectó sustancialmente en forma concurrente con la misma cantidad de diluyente de solución salina estéril, también como se describió anteriormente aquí.

Aproximadamente dieciséis (16) a aproximadamente veinticuatro (24) horas más tarde, cada uno de los ratones de las cuatro poblaciones se anestesió nuevamente y los tamaños de los cojinetes más largos de ambas patas traseras de cada ratón se midieron nuevamente, como se describió anteriormente aquí. Los resultados se muestran en la siguiente:

TABLA 6

Vacuna de Hepatitis B - Primera Población de Prueba (Anticuerpo y Factor de Transferencia Administrados)			
	Tamaño de cojinete (μm):		
	Antes de Inyección de Muestra	Final	Diferencia
	(0 horas)	(24 horas)	
Ratón #1			
Pata izquierda Control)	2032.00	2108.20	76.20
Pata derecha (Prueba)	2032.00	2082.80	50.80
Ratón #2			
Pata izquierda Control)	2260.60	2362.20	101.60
Pata derecha (Prueba)	2209.80	2336.80	27:00
Ratón #3			
Pata izquierda Control)	2159.00	2184.40	25.40
Pata derecha (Prueba)	2159.00	2235.20	76.20
Ratón #4			
Pata izquierda Control)	2108.20	2184.40	76.20
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2260.60	152.40
Ratón #5			
Pata izquierda Control)	1930.40	2032.00	101.60
Pata derecha (Prueba)	1930.40	2108.20	177.80

ES 2 592 261 T3

Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2184.40	2184.40	0.00
Pata derecha (Prueba)	2184.40	2235.20	50.80

5

Cada uno de los ratones de la primera población de prueba, con excepción del Ratón #1, mostraron mayor tumefacción en el cojinete más largo de la pata trasera derecha. En promedio, los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de los ratones de la primera población de prueba estuvieron aproximadamente 42.17 μm más hinchados que los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones. De este modo, los datos de la TABLA 6 indican el factor de transferencia aviar en la preparación que incluyó el factor de transferencia y el anticuerpo específicos para la vacuna de Hepatitis B sintética que indujeron una respuesta inmunitaria secundaria temprana en cada uno de estos ratones.

TABLA 7

Vacuna de Hepatitis B - Segunda Población de Prueba (Solamente el Factor de Transferencia Administrado)			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	1981.20	2032.00	50.80
Pata derecha (Prueba)	2006.60	2159.00	152.40
Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	1981.20	1981.20	0.00
Pata derecha (Prueba)	1981.20	2006.60	25.40
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2006.60	2032.00	25.40
Pata derecha (Prueba)	2032.00	2082.80	50.80
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	1955.80	2133.60	177.80
Pata derecha (Prueba)	1981.20	2108.20	127.00
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	1930.40	2006.60	76.20
Pata derecha (Prueba)	1930.40	2057.40	127.00

ES 2 592 261 T3

Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2032.00	2057.40	25.40
Pata derecha (Prueba)	2006.60	2108.20	101.60

En promedio, los cojinetes más largos en las patas traseras derechas de la segunda población de prueba de ratones estuvieron aproximadamente 38.10 μm más hinchados que los cojinetes más largos en las patas traseras derechas de estos ratones. Con la excepción del Ratón #4, los datos de la TABLA 7 ilustran que la administración del factor de transferencia aviar específico para la vacuna de Hepatitis B indujo una respuesta inmunitaria, de hipersensibilidad de tipo retardada o secundaria temprana en los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de cada ratón.

TABLA 8

Vacuna de Hepatitis B - Control Positivo			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2108.20	2133.60	25.40
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2159.00	50.80
Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2032.00	2082.80	50.80
Pata derecha (Prueba)	2006.60	2108.20	101.60
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	1854.20	1930.40	76.20
Pata derecha (Prueba)	1879.60	2032.00	152.40
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2006.60	2108.20	101.60
Pata derecha (Prueba)	2057.40	2209.80	152.40
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2159.00	25.40
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2159.00	25.40
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2006.60	2133.60	127.00
Pata derecha (Prueba)	2006.60	2184.40	177.80

En la población de control positiva de los ratones, solamente el Ratón #5 no produjo una respuesta inmunitaria secundaria a la vacuna de Hepatitis B sintética. Los cojinetes más largos en las patas traseras derechas de cada uno de los otros ratones de la población de control positiva mostraron un promedio de aproximadamente 42.33 μm de tumefacción incrementada sobre los cojinetes más largos en las patas traseras izquierdas de estos ratones.

5

TABLA 9

Vacuna de Hepatitis B - Control Negativo			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2159.00	0.00
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2133.60	0.00
Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2057.40	2057.40	0.00
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2082.80	0.00
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2006.60	2032.00	25.40
Pata derecha (Prueba)	1955.80	2032.00	72.60
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2057.40	2082.80	25.40
Pata derecha (Prueba)	2057.40	2108.20	50.80
Ratón #5.			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2159.00	25.40
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2082.80	2133.60	50.80
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2133.60	50.80

Tres ratones de la población de control negativa mostraron sustancialmente la misma cantidad de tumefacción en los cojinetes más largos de ambas patas traseras izquierda y derecha. De los tres ratones restantes, solamente el ratón #3 mostró una cantidad significativamente mayor de tumefacción en el cojinete más largo de su pata trasera derecha que en su pata trasera izquierda. En promedio, la diferencia en tumefacción entre los cojinetes más largos en las patas traseras derecha e izquierda de los ratones de la población de control negativo solamente fue de aproximadamente 16.33 μm .

10

Colectivamente, los datos presentados en las TABLAS 6-9 indican el resultado del EJEMPLO 6 para ser aquel del anticuerpo aviar y el factor de transferencia aviar específicos para la vacuna de Hepatitis B sintética que provocan que los mamíferos produzcan una respuesta inmunitaria secundaria temprana al antígeno de la vacuna de Hepatitis B sintética que también se presenta por el virus de la Hepatitis B.

5 EJEMPLO 7

10 Nuevamente empleando sustancialmente los mismos procedimientos representados en lo anterior en los EJEMPLOS 1-3, el factor de transferencia aviar y el anticuerpo aviar específicos para la bacteria de H. pylori se generaron en gallinas. Cada una de las gallinas se inyectó con el antígeno de H. pylori EIA, en una forma similar a la descrita en el EJEMPLO 1 en el día 150, día 163, día 190, día 221 y día 249. los huevos se recolectaron de estas gallinas durante el período de aproximadamente el día 193 a aproximadamente el día 223, como se describe en el EJEMPLO 1, y se preparó, como se describe en el EJEMPLO 1.

Como en los EJEMPLOS previos, una población de control positiva de ratones se preparó aproximadamente siete (7) días antes de llevar a cabo el ensayo de cojinete de ratón al inyectar a cada uno de los ratones de la población de control positiva con el antígeno recombinante o sintético de H. pylori EIA, como se describe en referencia a la Figura 4.

15 Una solución que incluye tanto el anticuerpo aviar como el factor de transferencia aviar específicos para el antígeno de H. pylori EIA se hizo al reconstituirse en agua destilada una preparación liofilizada que incluye el anticuerpo aviar y el factor de transferencia aviar, similares a la preparación descrita en lo anterior en el EJEMPLO 2, a una concentración de aproximadamente 16% en peso. Esta solución se administró a una primera población de prueba de ratones, como se describió anteriormente en la presente en referencia a la Figura 4.

20 Una solución sustancialmente libre de anticuerpos, que incluye el factor de transferencia aviar específico para H. pylori se preparó al reconstituirse una preparación liofilizada, obtenida en una forma similar a la descrita en el EJEMPLO 3, en agua destilada a una concentración de aproximadamente 16% en peso. Esta solución que contiene el factor de transferencia aviar sustancialmente libre de anticuerpos entonces se administró a cada uno de los ratones de una segunda población de prueba, como se describió anteriormente en la presente en referencia a la Figura 4.

25 El cojinete más largo de la pata derecha de cada ratón de cada una de las poblaciones de control positiva, primera prueba, segunda prueba, y de control negativa, se infectó con el antígeno de H. pylori EIA, mientras la misma cantidad de diluyente de solución salina estéril se administró al cojinete más largo de la pata izquierda de cada uno de estos ratones en la forma detallada previamente en la presente en referencia a la Figura 4.

30 En el momento apropiado, aproximadamente dieciséis (16) a aproximadamente veinticuatro (24) horas después de la infección de los cojinetes más largos de las patas derechas de los ratones con H. pylori, los ratones se anestesiaron nuevamente y los cojinetes más largos de ambas patas traseras de cada ratón se midieron, como se describió anteriormente en la presente. Los resultados se muestran en la siguiente:

TABLA 10

H. pylori - Primera Población de Prueba (Anticuerpo y Factor de Transferencia Administrados)			
Tamaño de cojinete (µm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (control)	1955.80	1981.20	25.40
Pata derecha (Prueba)	1930.40	1955.80	25.40

ES 2 592 261 T3

Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2260.60	152.40
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2082.80	2082.80	0.00
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2133.60	25.40
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2082.80	2184.40	101.60
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2286.00	203.20
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2108.20	2133.60	25.40
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2133.60	0.00
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	1955.80	2032.00	76.20
Pata derecha (Prueba)	1930.40	2108.20	177.80

5 Los datos de la TABLA 10 y, particularmente aquellos del Ratón #2, Ratón #4 y Ratón #6, indican que la administración de la solución que contiene el anticuerpo aviar y el factor de transferencia aviar específicos para *H. pylori* indujeron una respuesta inmunitaria secundaria temprana en los ratones de la primera población de prueba. Mientras el Ratón #1 mostró sustancialmente iguales cantidades de tumefacción en los cojinetes más largos de ambas patas traseras izquierda y derecha, el Ratón #3 mostró ligeramente mayor tumefacción en el cojinete más largo de su pata trasera derecha que en la de su pata trasera izquierda y el Ratón #5 mostró una cantidad ligeramente mayor de tumefacción en el cojinete más largo de su pata trasera izquierda que en el cojinete más largo de su pata trasera derecha. En promedio, los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de los ratones de la primera población de prueba, estuvieron aproximadamente 59.27 μm más hinchados que los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones.

TABLA 11

H. pylori - Segunda Población de Prueba (Solamente el Factor de Transferencia Administrado)			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2235.20	2235.20	0.00
Pata derecha (Prueba)	2184.40	2209.80	25.40

ES 2 592 261 T3

Ratón #2			
Pata izquierda (control)	2006.60	2006.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2006.60	2032.00	25.40
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2082.80	2184.40	101.60
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2209.80	76.20
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2159.00	25.40
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2184.40	25.40
Pata derecha (Prueba)	2159.00	2235.20	76.20
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2057.40	2082.80	25.40
Pata derecha (Prueba)	2032.00	2260.60	228.60

5 Los resultados mostrados en la TABLA 11 fueron similares a aquellos en la TABLA 10. Dos de los ratones, el Ratón #5 y el Ratón #6, mostraron mucha más tumefacción en los cojinetes más largos de sus patas traseras derechas que en los cojinetes más largos de sus patas traseras izquierdas. Mientras la cantidad de tumefacción en los cojinetes más largos de las patas traseras derechas del Ratón #1, Ratón #2 y Ratón #4 fue mayor que la de los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones, la diferencia solamente fue ligera. El Ratón #3 realmente mostró una cantidad ligeramente mayor de tumefacción en el cojinete más largo de su pata trasera izquierda que en el cojinete más largo de su pata trasera derecha. No obstante, ya que la tumefacción promedio en los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de estos ratones es, en promedio, aproximadamente 50.80 μm . mayor que la de los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones, los datos de la TABLA 11 indican que el factor de transferencia aviar específico para *H. pylori* provocó la tumefacción incrementada.

10

TABLA 12

H. pylori - Control Positivo			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra	Final	Diferencia
	(0 horas)	(24 horas)	
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2184.40	76.20

ES 2 592 261 T3

Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2209.80	76.20
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2032.00	2108.20	76.20
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2209.80	127.00
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	1981.20	2082.80	101.60
Pata derecha (Prueba)	1879.60	2133.60	254.00
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2159.00	25.40 1
Pata derecha (Prueba)	2184.40	2336.80	52.40
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2260.60	177.80

5 Cada uno de los ratones de la población de control positiva en el EJEMPLO 7 produjo en la respuesta inmunitaria de hipersensibilidad de tipo retardada a *H. pylori*, como se indica por las diferencias significativas en la cantidad de tumefacción en los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de estos ratones con relación a la de los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones. En promedio, la diferencia en tumefacción fue de aproximadamente 110.07 μm .

TABLA 13

H. pylori - Control Negativo			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2006.60	2082.80	76.20
Pata derecha (Prueba)	2514.60	2514.60	0.00
Ratón #2			
Pata izquierda control)	2032.00	2082.80	50.80
Pata derecha (Prueba)	2032.00	2133.60	101.60

Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2082.80	2108.20	25.40
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2108.20	25.40
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2006.60	2032.00	25.40
Pata derecha (Prueba)	1955.80	2032.00	76.20
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	1930.40	1981.20	50.80
Pata derecha (Prueba)	1955.80	2006.60	50.80
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2159.00	25.40
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2159.00	25.40

5 Como se indica por los datos de la TABLA 13, la cantidad de tumefacción de los cojinetes más largos de ambas patas traseras izquierda y derecha del Ratón #3, Ratón #5 y Ratón #6, sustancialmente fueron las mismas. Mientras la cantidad de tumefacción en el cojinete más largo de la pata trasera derecha del Ratón #2 fue mayor que la cantidad de tumefacción en el cojinete más largo de la pata trasera izquierda de este ratón, el cojinete más largo de la pata trasera izquierda del Ratón #1 estuvo significativamente más hinchado que el cojinete más largo de la pata trasera derecha del Ratón #1. El cojinete más largo de la pata trasera derecha del Ratón #4 solamente estuvo ligeramente más hinchado que el cojinete más largo de la pata trasera izquierda del Ratón #4. La diferencia promedio en tumefacción de los cojinetes más largos de las patas traseras derecha e izquierda de los ratones de la población de control negativa solamente fue de aproximadamente 4.23 μm .

Los datos de las TABLAS 10-13 indican que el factor de transferencia aviar específico para *H. pylori* facilita una respuesta inmunitaria secundaria temprana en mamíferos.

EJEMPLO 8

15 Nuevamente, empleando sustancialmente los mismos procedimientos descritos en la presente en los EJEMPLOS 1-3, el factor de transferencia aviar y el anticuerpo aviar específicos para el antígeno de EBNA-1, un antígeno nuclear recombinante del virus de Epstein-Barr (EBV), se generaron en gallinas. Cada gallina recibió una dosis de EBNA-1, tal como se describe en el EJEMPLO 1, en 150 días, 163 días, 190 días y 249 días. Los huevos se recolectaron de estas gallinas durante el período de aproximadamente el día 193 a aproximadamente el día 223, como se describió anteriormente en el EJEMPLO 1, y se preparó como se describió anteriormente en el EJEMPLO 1.

20 Una solución con tanto el anticuerpo aviar como el factor de transferencia aviar específicos para EBNA-1 se formó al reconstituirse en agua destilada en una preparación liofilizada similar a la descrita en el EJEMPLO 2. La preparación liofilizada que incluye el anticuerpo aviar y el factor de transferencia aviar específicos para el antígeno de EBNA-1 se diluyó a una concentración de aproximadamente 16% en peso. Esta solución entonces se administró a una primera población de prueba de ratones en la forma descrita en referencia a la Figura 4.

25 Adicionalmente, una solución que contiene el factor de transferencia aviar específico para EBNA-1, con sustancialmente ningún anticuerpo aviar específico para EBNA-1, también se reconstituyó en agua destilada a una concentración de aproximadamente 16% en peso. Esta solución se administró a los ratones de una segunda población de prueba en la forma descrita previamente en la presente en referencia a la Figura 4.

30 Una población de control positiva de ratones se preparó al inyectar a los ratones con EBNA-1 aproximadamente siete (7) días antes de llevar a cabo el ensayo de cojinetes de ratón.

ES 2 592 261 T3

5

El antígeno de EBNA-1 recombinante entonces se administró al cojinete más largo de la pata trasera derecha de cada ratón de cada una de las cuatro poblaciones, que incluye una primera población de prueba, una segunda población de prueba, una población de control positiva y una población de control negativa. Sustancialmente la misma cantidad de diluyente de solución salina estéril se administró al cojinete más largo de la pata trasera izquierda de cada ratón. El método de administración se llevó a cabo en la misma forma que se describe previamente en la presente.

Aproximadamente dieciséis (16) a aproximadamente veinticuatro (24) horas más tarde, los ratones se anestesiaron nuevamente y los tamaños de los cojinetes más largos de ambas patas traseras de cada ratón se midieron, como se describe previamente. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 14

EBV EBNA-1 - Primera Población de Prueba (Anticuerpo y Factor de Transferencia Administrados)			
Tamaño de cojinete (µm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2032.00	2057.40	25.40
Pata derecha (Prueba)	2032.00	2057.40	25.40
Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2159.00	0.00
Pata derecha (Prueba)	2159.00	2184.40	25.40
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2159.00	0.00
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2286.00	152.40
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2108.20	2108.20	0.00
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2209.80	101.60
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2108.20	2235.20	127.00
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2260.60	177.80
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	1981.20	2032.00	50.80
Pata derecha (Prueba)	1981.20	2032.00	50.80

10

En la TABLA 14, se observa que tres de los ratones mostraron una tumefacción significativamente mayor en los cojinetes más largos de sus patas traseras derechas que en los cojinetes más largos de sus patas traseras izquierdas. Mientras el

ES 2 592 261 T3

5 Ratón #2 también tuvo una mayor cantidad de tumefacción en el cojinete más largo de su pata trasera derecha que en el
 10 cojinete más largo de su pata trasera izquierda, la diferencia solamente fue ligera. Dos de los ratones, el Ratón #1 y el
 Ratón #6, tuvieron sustancialmente la misma cantidad de tumefacción en los cojinetes más largos de ambas de sus patas
 traseras izquierda y derecha. No obstante, ya que la cantidad de tumefacción de los cojinetes más largos de la patas
 traseras derechas de los ratones de la primera población de prueba excedieron la de los cojinetes más largos de las patas
 traseras izquierdas de estos ratones por un promedio de aproximadamente 55.03 μm , los datos presentados en la TABLA
 14 tienden a mostrar que el factor de transferencia aviar en la solución que contiene el anticuerpo aviar y el factor de
 transferencia específicos para EBNA-1 provocaron que los ratones de la primera población de prueba produjeran una
 respuesta inmunitaria secundaria temprana a EBNA-1 recombinante. Como se conoce en la técnica; los anticuerpos son
 pasivos con respecto a las respuestas inmunitarias secundarias y típicamente contribuyen muy poco a la tumefacción.

TABLA 15

EBV EBNA-1 - Segunda Población de Prueba (Solamente el Factor de Transferencia Administrado)			
	Tamaño de cojinete (μm):		
	Antes de Inyección de Muestra	Final	Diferencia
	(0 horas)	(24 horas)	
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2159.00	25.40
Pata derecha (Prueba)	2108.20	2159.00	50.80
Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2006.60	2032.00	25.40
Pata derecha (Prueba)	1955.80	1955.80	0.00
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2032.00	2133.60	101.60
Pata derecha (Prueba)	2006.60	2159.00	152.40
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2108.20	2133.60	25.40
Pata derecha (Prueba)	2159.00	2159.00	0.00
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2184.40	2209.80	25.40
Pata derecha (Prueba)	2159.00	2260.60	101.60
Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2057.40	2108.20	50.80
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2133.60	50.80

ES 2 592 261 T3

Los ratones de la segunda población de prueba, que se trataron con la solución que contiene el factor de transferencia aviar también mostraron una respuesta inmunitaria secundaria temprana a EBNA-1 recombinante. Este resultado fue particularmente evidente en el Ratón #3 y el Ratón #5, que mostraron una tumefacción significativamente mayor en los cojinetes más largos de sus patas traseras derechas que las medidas en los cojinetes más largos de sus patas traseras izquierdas. Mientras la cantidad de tumefacción en el cojinete más largo de las patas traseras derechas del Ratón #1 también fue mayor que la cantidad de tumefacción en el cojinete más largo de la pata trasera izquierda del Ratón #1, la diferencia parece ser ligera. Adicionalmente, mientras el Ratón #2 y el Ratón #4 desplegaron una mayor cantidad de tumefacción en los cojinetes más largos de sus patas traseras izquierdas, las cantidades de tumefacción medidas en los mismos solamente fueron ligeramente mayores que las medidas en los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de estos ratones. En promedio, los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de estos ratones fueron de aproximadamente 16.93 μm mayor que las medidas en los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones.

Se considera que el factor de transferencia específico para EBNA-1 pudo haberse estabilizado cuando se aisló del anticuerpo correspondiente, resultando en la respuesta inmunitaria secundaria medida más baja en la segunda población de prueba con relación a la respuesta inmunitaria secundaria general medida en la primera población de prueba de ratones.

TABLA 16

EBV EBNA-1 Control Positivo			
Tamaño de cojinete (μm):			
	Antes de Inyección de Muestra (0 horas)	Final (24 horas)	Diferencia
Ratón #1			
Pata izquierda (Control)	2209.80	2209.80	0.00
Pata derecha (Prueba)	2235.20	2286.00	50.80
Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2184.40	2184.40	0.00
Pata derecha (Prueba)	2209.80	2260.60	50.80
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2159.00	7
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2209.80	6.20
Ratón #4			
Pata izquierda (Control)	2159.00	2336.80	177.80
Pata derecha (Prueba)	2133.60	2362.20	228.60
Ratón #5			
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)	2082.80	2260.60	177.80

ES 2 592 261 T3

Ratón #6			
Pata izquierda (Control)	2082.80	2082.80	0.00
Pata derecha (Prueba)	2057.40	2209.80	152.40

5 Como se indica por las cantidades mayores de tumefacción en los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de cada ratón de la población de control positiva que la de los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones, los seis ratones de la población de control positiva mostraron una respuesta inmunitaria de hipersensibilidad tipo retardada al antígeno de EBNA-1 recombinante. La cantidad medida de tumefacción en los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de cada uno de estos ratones fue, en promedio, aproximadamente 93.13 μm mayor que la cantidad medida de tumefacción en los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones.

TABLA 17

EBV EBNA - 1 Control Negativo			
	Tamaño de cojinete (μm):		
	Antes de Inyección de Muestra	Final	Diferencia
	(0 horas)	(24 horas)	
Ratón #1	2133.60	2184.40	50.80
Pata izquierda (Control)	2082.80	2133.60	50.80
Pata derecha (Prueba)			
Ratón #2	2133.60	2133.60	0.00
Pata izquierda (Control)	2159.00	2184.40	25.40
Pata derecha (Prueba)			
Ratón #3	2108.20	2108.20	0.00
Pata izquierda (Control)	2133.60	2133.60	0.00
Pata derecha (Prueba)			
Ratón #4	2082.80	2133.60	50.80
Pata izquierda (Control)	2159.00	2159.00	0.00
Pata derecha (Prueba)			
Ratón #5	2057.40	2082.80	25.40
Pata izquierda (Control)	1955.80	1981.20	25.40
Pata derecha (Prueba)			

ES 2 592 261 T3

Ratón #6	2108.20	2133.60	25.40
Pata izquierda (Control)	2108.20	2133.60	25.40
Pata derecha (Prueba)			

En la población de control negativa, solamente dos de los ratones, el Ratón #2 y el Ratón #4, mostraron cantidades diferentes de tumefacción en los cojinetes más largos de sus patas traseras. Mientras la cantidad de tumefacción en el cojinete más largo de las patas traseras derechas del Ratón #2 fue mayor que la mostrada en el cojinete más largo de las patas traseras izquierdas, el cojinete más largo de la pata trasera izquierda del Ratón #4 estuvo más hinchado que el cojinete más largo de la pata trasera derecha del Ratón #4. De hecho, en promedio, los cojinetes más largos de las patas traseras derechas de los ratones de la población de control negativa estuvieron aproximadamente 4.23 μm menos hinchados que los cojinetes más largos de las patas traseras izquierdas de estos ratones.

Nuevamente, los datos de las TABLAS 14-17 ilustran que el factor de transferencia aviar específico para EBNA- 1, provoca que los mamíferos produzcan una respuesta inmunitaria secundaria temprana (es decir, dentro de aproximadamente veinticuatro (24) horas cuando se compara con el período de tiempo típico de siete (7) a catorce (14) días que toma un mamífero para producir una respuesta inmunitaria secundaria por sí mismo) a EBNA-1 y virus y otros patógenos que presentan este antígeno.

Los EJEMPLOS anteriores ilustran que, por medio del contraste con el período de tiempo de siete (7) a catorce (14) días que típicamente toma un mamífero para producir una respuesta inmunitaria secundaria a un patógeno o agente antigénico por sí mismo, cuando un factor de transferencia aviar que incorpora las enseñanzas de la presente invención se ha administrado, el huésped mamífero puede provocar una respuesta inmunitaria secundaria dentro veinticuatro (24) horas.

Las similitudes de las diferencias entre las medidas tomadas en los cojinetes de prueba y control de cada ratón en el primer y segundo grupos de prueba de cada ensayo indican que la respuesta inmunitaria de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria, fue producida principalmente por el factor de transferencia, no por el anticuerpo, el cual es pasivo con respecto a las respuestas inmunitarias secundarias y que típicamente contribuye muy poco a la tumefacción.

Es evidente a partir de los EJEMPLOS 1-8 y los datos generados por éstos que el factor de transferencia aviar tiene la capacidad de generar una respuesta inmunitaria secundaria temprana en mamíferos. Como lo reconocería fácilmente un experto en la técnica, el factor de transferencia aviar también puede generar una respuesta inmunitaria secundaria temprana en varios tipos de aves, así como también en reptiles, anfibios y otras especies de animales no mamíferas.

Conforme el factor de transferencia aviar inicia una reacción inmunitaria de hipersensibilidad tipo retardada temprana en ratones, es razonable para aquellos con experiencia en la técnica asumir que el factor de transferencia tiene el mismo efecto en otros mamíferos, incluyendo humanos.

Aunque el factor de transferencia se administró a ratones en los EJEMPLOS precedentes por medio de inyección, también se encuentra dentro del alcance de la presente invención administrar el factor de transferencia aviar a mamíferos por otras rutas. Por ejemplo, el factor de transferencia aviar puede administrarse oralmente, por inyección parenteral, o por métodos parenterales diferentes a inyección, tal como transdérmicamente, o a través de la piel mediante aerosol por los pulmones, o por otros métodos conocidos en la técnica. La administración oral y el factor de transferencia aviar a mamíferos son apoyados por el hecho de que las madres de mamíferos suministran el factor de transferencia a sus crías recién nacidas por medio del calostro, el cual ingieren oralmente los recién nacidos. El factor de transferencia sobrevive a las condiciones del estómago y el intestino delgado, donde el factor de transferencia se absorbe en el torrente sanguíneo del recién nacido mamífero. De este modo, el factor de transferencia se sabe que sobrevive a los tractos intestinales de mamíferos. La capacidad del factor de transferencia para soportar las condiciones de los tractos digestivos de mamíferos se demostró en Kirkpatrick CH, "Activities and characteristics of transfer factors", *Biotherapy*, 9:13-16 (1996).

Aunque la descripción anterior contiene muchos ejemplos específicos, éstos no deben tomarse como limitantes del alcance de la presente invención; el alcance de la invención se indica y limita solo por las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

1. Un método para obtener el factor de transferencia, que comprende:

exponer de forma no invasiva un animal de fuente no mamífera a por lo menos un agente antigénico de un patógeno de mamífero que provocará que dicho animal de fuente no mamífera produzca una respuesta inmunitaria mediada por células T;

permitir que dicho animal de fuente no mamífera produzca dicha respuesta inmunitaria mediada por células T para dicho por lo menos un agente antigénico;

recolectar por lo menos un huevo de dicho animal de fuente no mamífera después de dicha respuesta inmunitaria mediada por células T, dicho por lo menos un huevo que incluye el factor de transferencia que transfiere inmunidad celular a un mamífero in vivo y que incluye moléculas del factor de transferencia que tienen pesos moleculares de 4,000 Da a 5,000 Da; y

recolectar dichas moléculas de factores de transferencia de dicho por lo menos un huevo.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicional y sustancialmente purificar el factor de transferencia de proteínas o péptidos que tienen pesos moleculares de más de 8,000 Da.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha exposición no invasiva de dicho animal de fuente no mamífera comprende exponer un animal de fuente aviar a dicho por lo menos un agente antigénico.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la exposición no invasiva de dicho animal de fuente aviar comprende exponer una gallina a por lo menos un agente antigénico.

5. El método de una de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera al Virus de Newcastle o un antígeno del Virus de Newcastle.

6. El método de una de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera a por lo menos uno de virus del sarampión, virus de las paperas y virus de la rubéola o un antígeno de por lo menos uno de virus del sarampión, virus de las paperas, y virus de la rubéola.

7. El método de una de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera al virus de la hepatitis B o un antígeno del virus de la hepatitis B.

8. El método de una de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera a un antígeno del Virus Epstein-Barr.

9. El método de la reivindicación 8, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera a un antígeno recombinante del Virus de Epstein-Barr.

10. El método de una de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera a un antígeno de H. pylori.

11. El método de la reivindicación 10, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera a un antígeno de H. pylori sintético.

12. El método de una de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera sustancialmente en forma concurrente a una pluralidad de antígenos.

13. El método de una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha exposición no invasiva comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera a por lo menos uno de un virus vivo, un virus atenuado, un virus muerto, un antígeno recombinante y un antígeno natural.

14. El método de una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha recolección de dicho por lo menos un huevo se efectúa por lo menos siete días después de exposición.

15. El método de una de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha recolección de dichas moléculas de factor de transferencia además comprende recolectar una fracción soluble en agua de una yema de dicho por lo menos un huevo.

16. El método de la reivindicación 15, que comprende adicionalmente retirar sustancialmente todos los anticuerpos de dicha fracción soluble en agua de dicho por lo menos un huevo.

17. Un método para obtener el factor de transferencia, que comprende:

exponer no invasivamente un animal de fuente no mamífera a por lo menos un agente antigénico para provocar que dicho animal de fuente no mamífera produzca una respuesta inmunitaria secundaria a un patógeno;

permitir que dicho animal de fuente no mamífera produzca una respuesta inmunitaria secundaria a dicho por lo menos a un agente antigénico, dicha respuesta inmunitaria secundaria resulta en la generación del factor de transferencia específico para dicho patógeno; y

después de dicha respuesta inmunitaria secundaria, recolectar el factor de transferencia específico para dicho patógeno a partir de por lo menos un huevo de dicho animal de fuente no mamífera, que incluye moléculas del factor de transferencia que tienen pesos moleculares de 4,000 Da a 5,000 Da.

18. El método de la reivindicación 17, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera a por lo menos un agente antigénico de un patógeno sistémico.

19. El método de la reivindicación 17 o 18, en el que dicha recolección incluye purificar sustancialmente dicho factor de transferencia a partir de otras proteínas o péptidos de dicho por lo menos un huevo que tiene pesos moleculares de más de 8,000 Da.

20. El método de la reivindicación 19, en el que dicha purificación comprende sustancialmente provocar que otras proteínas o péptidos se precipiten de la solución.

21. El método de la reivindicación 17 o 18, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera a por lo menos un agente antigénico que provoque que dicho animal de fuente no mamífera produzca una respuesta inmunitaria secundaria contra por lo menos uno del virus de rubéola, el virus de sarampión, virus de paperas, virus de hepatitis B, Virus de Newcastle y el Virus de Epstein-Barr.

22. El método de la reivindicación 17 o 18, que incluye exponer dicho animal de fuente no mamífera a por lo menos una de una vacuna de MMR, una vacuna de virus Newcastle, una vacuna de virus de Epstein-Barr recombinante, un antígeno del virus de Epstein-Barr sustancialmente purificado y una vacuna contra la hepatitis B recombinante.

23. Un método para obtener el factor de transferencia, que comprende:

exponer un huevo a por lo menos un agente antigénico que haga que dicho huevo provoque una respuesta inmunitaria mediada por células T;

permitir que dicho huevo produzca dicha respuesta inmunitaria mediada por células T a dicho por lo menos un agente antigénico, dicha respuesta inmunitaria mediada por células T resulta en la generación del factor de transferencia específico para dicho por lo menos un agente antigénico; y

después dicha respuesta inmunitaria secundaria, que recoge por lo menos el factor de transferencia que transfiere inmunidad celular a un mamífero in vivo y que es específico para dicho por lo menos un agente antigénico, incluye moléculas de factor de transferencia que tienen pesos moleculares de 4,000 Da a 5,000 Da, de dicho huevo.

24. Una composición para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, causada por patógenos invasores, al provocar una respuesta inmunitaria secundaria en un mamífero, que comprende:

un portador;

una yema de huevo o una fracción de yema de huevo; y

por lo menos un tipo de factor de transferencia derivado de huevo, que incluye moléculas de factor de transferencia que tienen pesos moleculares de 4,000 Da a 5,000 Da, que se puede obtener mediante un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 23 y se presentan en una concentración mayor que aquella presente en un huevo.

25. Una composición para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, causada por patógenos invasores, al provocar una respuesta inmunitaria secundaria en un mamífero, que comprende:

un portador; y

una yema de huevo o una fracción de yema de huevo que comprende por lo menos un tipo de factor de transferencia, que incluye moléculas de factor de transferencia que tienen pesos moleculares de 4,000 Da a 5,000 Da, obtenido por el método que comprende:

- 5 exponer en forma no invasiva un animal de fuente no mamífera a por lo menos un agente antigénico que causa que dicho animal de fuente no mamífera provoque una respuesta inmunitaria mediada por células T;
- permitir que dicho animal de fuente no mamífera provoque una respuesta inmunitaria mediada por células T a dicho por lo menos un agente antigénico; y
- 10 recolectar por lo menos un huevo de dicho animal de fuente no mamífera luego de dicha respuesta inmunitaria mediada por células T, dicho por lo menos un huevo incluye un factor de transferencia que transfiere inmunidad celular a un mamífero in vivo
26. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha yema de huevo o fracción de yema de huevo comprende un filtrado de una fracción soluble en agua de una yema de huevo que carece sustancialmente de proteínas y péptidos que tienen pesos moleculares de más de 8,000 Da.
- 15 27. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 25 o reivindicación 26, en el que dicha yema de huevo o fracción de yema de huevo comprende una yema o una fracción de yema de un huevo aviar.
28. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicha yema de huevo o fracción de yema de huevo comprende una yema de huevo o una fracción de la yema de un huevo de gallina.
29. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 25-28, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera al Virus de Newcastle o un antígeno del virus de Newcastle.
- 20 30. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 25-28, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera a por lo menos uno de virus del sarampión, virus de las paperas, y virus de la rubéola o a un antígeno de por lo menos uno del virus del sarampión, virus de las paperas, y virus de la rubéola.
31. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 25-28, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera al virus de la hepatitis B o un antígeno del virus de la hepatitis B.
- 25 32. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 25-28, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera a un antígeno del virus de Epstein-Barr.
33. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 32, en el que dicha exposición comprende exponer dichos animales de fuente no mamífera a un antígeno recombinante del virus de Epstein-Barr.
- 30 34. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 25-28, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera a un antígeno de *H. pylori*.
- 35 35. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 34, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera a un antígeno sintético de *H. pylori*.
36. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 25-28, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera sustancialmente al mismo tiempo a una pluralidad de antígenos.
37. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 25-36, en el que dicha exposición comprende exponer dicho animal de fuente no mamífera a por lo menos uno de un virus vivo, un virus atenuado, un virus muerto, un antígeno recombinante, y un antígeno natural.
38. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 25-37, en el que dicha recolección de dicho por lo menos un huevo se efectúa al menos siete días después de dicha exposición.
- 40 39. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 25-38, que comprende adicionalmente recolectar una fracción soluble en agua de una yema de dicho por lo menos un huevo.
40. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 39, en el que dichas yemas de huevo o fracción de yema de huevo está sustancialmente libre de anticuerpos a partir de una fracción soluble en agua de dicho por lo menos un huevo.

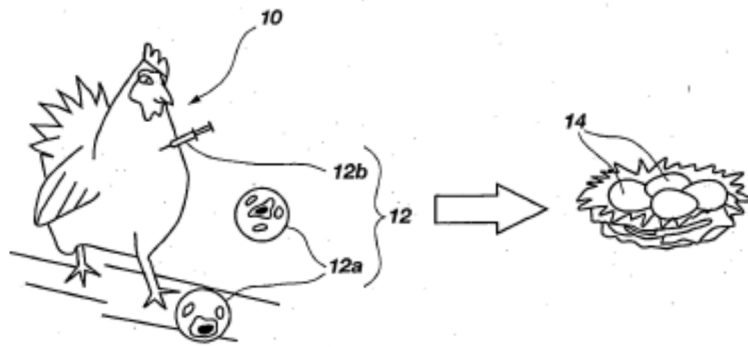


Fig. 1

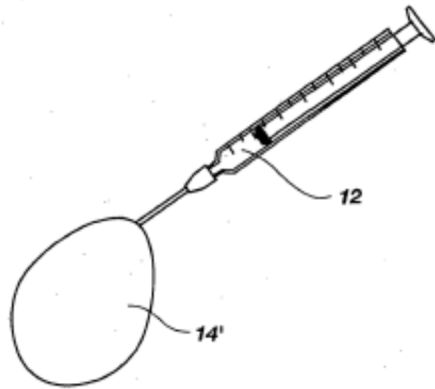


Fig. 2

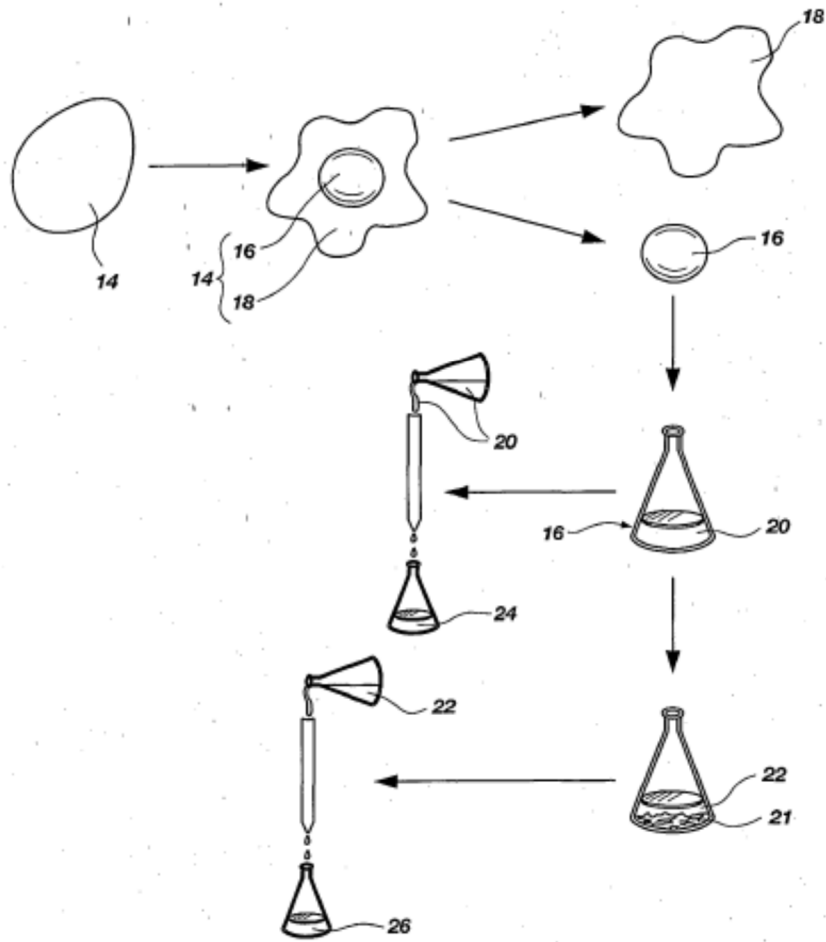


Fig. 3

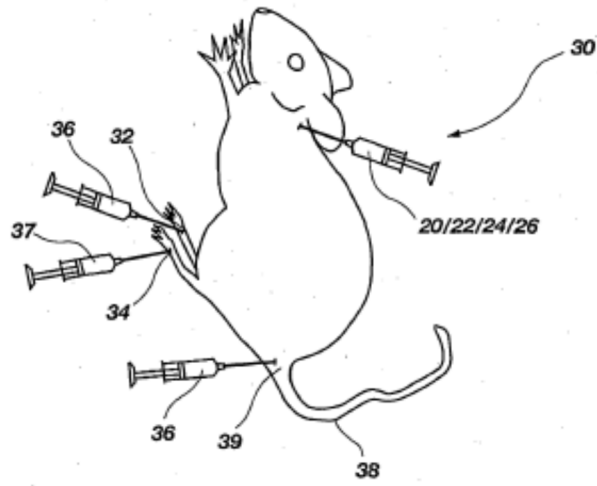


Fig. 4