

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 204**

51 Int. Cl.:

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2011 PCT/EP2011/073414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12084951**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11804675 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2654785**

54 Título: **Respuesta inmune mejorada en especies bovinas**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061426255 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2019

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**ABRAHAM, ALBERT;
KEIL, DANIEL;
NICKELL, JASON y
WEISS, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 722 204 T3

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

DESCRIPCIÓN

Respuesta inmune mejorada en especies bovinas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a un método de inmuno-activación en un miembro de la especie bovina. En particular, la presente invención incluye métodos para provocar respuestas inmunes sistémicas, no específicas y específicas de antígenos, que son útiles para la administración y protección de animales contra enfermedades infecciosas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 El ganado es una víctima primordial para muchos tipos de infecciones virales, bacterianas y parasitarias. Las prácticas modernas de producción, como el destete, el envío de ganado, las inclemencias del tiempo y las necesidades nutricionales dentro de las industrias de carne y productos lácteos también pueden servir como factores de riesgo que potencian la incidencia de la enfermedad. La enfermedad respiratoria bovina (BRD, por sus siglas en inglés) o el complejo de enfermedades respiratorias bovinas, como se lo suele denominar, se produce tanto en el ganado lechero como en el vacuno y es una de las principales causas de pérdidas económicas para la industria ganadera en todo el mundo. Estas pérdidas se deben a la morbilidad, la mortalidad, el aumento de peso reducido, los costos de tratamiento y prevención, la pérdida de producción de leche y los impactos negativos en las características de la canal.

20 Se cree que la patogenia de la BRD surge de numerosos factores estresantes ambientales y fisiológicos, mencionados anteriormente, junto con agentes infecciosos. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (anteriormente *Haemophilus somnus*) se consideran parte de la flora normal del tracto respiratorio superior bovino. A la inversa, el tracto respiratorio inferior es un entorno relativamente estéril que se mantiene mediante numerosas vías inmunológicas destinadas a prevenir la entrada de microbios. Cuando el ganado es sometido a factores estresantes ambientales y fisiológicos, las funciones inmunitarias innatas y adquiridas del animal se ven comprometidas, lo que permite que estos organismos anteriormente mencionados proliferen y a continuación colonicen el tracto respiratorio inferior. Se sabe que varios virus bovinos tienen efectos inmunosupresores en el pulmón, como el virus infeccioso de la rinotraqueitis bovina (IBRV, IBR o BHV 1), el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) y el virus de la parainfluenza tipo 3 (PI3). Sin embargo, *Mannheimia haemolytica* es, con mucho, el patógeno bacteriano más prevalente entre los casos de BRD.

30 La prevención y el tratamiento actuales de la BRD consisten en la administración de antibióticos a las poblaciones de ganado bovino a su llegada a los lotes de alimentación (es decir, la metafilaxis), la terapia con antibióticos para el ganado enfermo y la vacunación contra virus y bacterias de la BRD, incluida *M. haemolytica*.

35 Existen diferentes razones por las que los programas de vacunación y las terapias farmacéuticas actuales no resultan óptimos para controlar la BRD en el ganado actualmente. En primer lugar, el sistema de defensa del huésped desempeña un papel importante en la lucha contra las enfermedades infecciosas en el ganado. Los tratamientos convencionales incluyen la administración de antibióticos para tratar o controlar las infecciones bacterianas. Sin embargo, no hay tratamientos farmacéuticos aprobados disponibles contra las infecciones virales. Con BRD, en la mayoría de los casos no solo hay una infección bacteriana sino también una infección viral. En segundo lugar, el momento de la vacunación es a menudo subóptimo. Para que una vacuna respiratoria tenga una eficacia óptima, el producto debe administrarse 2 a 4 semanas antes del estrés o envío, y esto no suele ser posible en la producción comercial de ganado. Las vacunas se administran demasiado pronto o demasiado tarde para ser óptimamente eficaces. US 2006/223769 A1 se refiere a una vacuna y un método para la activación inmune para proteger a un mamífero de una enfermedad, incluyendo el cáncer, una enfermedad asociada con una inflamación alérgica, una enfermedad infecciosa, o un estado asociado con una actividad nociva de un auto-antígeno. WO 2005/079506 A2 se refiere a un método para la activación inmune sistémica con el fin de proteger a un mamífero de una enfermedad, incluyendo el cáncer, una enfermedad asociada con inflamación alérgica o una enfermedad infecciosa.

45 Por lo tanto, existe la necesidad de un método para estimular el sistema inmunológico y crear una respuesta ofensiva para reducir o eliminar los organismos causantes de enfermedades. Es importante que este método sea fácil de administrar, funcione solo o en combinación con vacunas o ayude a hacer que dichas vacunas sean más efectivas, tenga una duración más prolongada o no se requieran inyecciones adicionales para maximizar la inmunidad. La presente invención proporciona un método para provocar una respuesta inmune no específica de antígeno en la especie bovina que es fácil de administrar, funciona solo o en combinación con vacunas, e induce una respuesta protectora contra uno o más agentes infecciosos.

55

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El método para provocar una respuesta inmune en un miembro de la especie bovina de la presente invención incluye administrar al miembro de la especie bovina una cantidad eficaz de una composición de inmunomodulador para provocar una respuesta inmune para su utilización en el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina (BRD) provocada por *Mannheimia haemolytica* en el ganado vacuno. La composición del inmunomodulador incluye un vehículo catiónico de administración de liposomas que comprende [1-[2-[9-(Z)-octadecenoiloxi] etil]-2-[8](Z) – heptadecenil]-3 [2-hidroxi] etil] cloruro de imidazolio (DOTIM) y colesterol y una molécula de ácido nucleico, en que la molécula de ácido nucleico es un vector de plásmido de ADN no codificante aislado derivado de bacteria sin inserto genético. Además, el inmunomodulador provoca una respuesta inmune no antigénica específica que es efectiva por sí sola o mejora la operación de al menos un agente biológico, como una vacuna, cuando se administra antes de una vacuna de este tipo, coadministrada con dicha vacuna, administrada después de la vacunación, o mezclado con la vacuna.

Los métodos proporcionan nuevas estrategias de tratamiento para proteger a las especies bovinas de enfermedades infecciosas y para tratar a las poblaciones que tienen enfermedades infecciosas. Finalmente, el método de la presente invención proporciona una protección más rápida, más larga y mejor contra una enfermedad cuando el inmunomodulador se utiliza en combinación con una vacuna.

1. Composición

a. Inmunomodulador

En una forma de realización de la invención, la composición del inmunomodulador incluye un vehículo catiónico de administración de liposomas que comprende [1-[2-[9-(Z)- octadecenoiloxi] etil]-2-[8](Z) – heptadecenil]-3 [2-hidroxi] etil] cloruro de imidazolio (DOTIM) y colesterol y una molécula de ácido nucleico, en que la molécula de ácido nucleico es un vector de plásmido de ADN no codificante aislado derivado de bacteria sin inserto genético..

Un vehículo de administración de liposomas adecuado comprende una composición lipídica que es capaz de suministrar moléculas de ácido nucleico a los tejidos del sujeto tratado. Un vehículo de administración de liposomas es preferiblemente capaz de permanecer estable en un sujeto durante un tiempo suficiente para administrar una molécula de ácido nucleico y / o un agente biológico. En una forma de realización, el vehículo de administración de liposomas es estable en el sujeto receptor durante al menos aproximadamente 5 minutos. En otra forma de realización, el vehículo de administración de liposomas es estable en el sujeto receptor durante al menos aproximadamente 1 hora. En otra forma de realización más, el vehículo de administración de liposomas es estable en el sujeto receptor durante al menos aproximadamente 24 horas.

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

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

En el presente documento se describen también liposomas adecuados, que incluyen cualquier liposoma, como por ejemplo los utilizados comúnmente en, por ejemplo, métodos de administración de genes conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los vehículos de administración de liposomas comprenden lípidos de vesículas multilamelares (MLV) y lípidos extruidos. Los métodos para la preparación de MLV son bien conocidos en la técnica. Otros ejemplos son vehículos de administración de liposomas que comprenden liposomas que tienen una composición lipídica policatiónica (es decir, liposomas catiónicos) y / o liposomas que tienen una estructura de colesterol conjugado con polietilenglicol. Las composiciones de liposomas catiónicos ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, cloruro de N- [1- (2,3-dioleoiloxi) propil] -N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) y colesterol, N- [1 - (2,3 -dioleoiloxi) propil] -N, N, N-trimetilamonio cloruro (DOTAP) y colesterol, 1- [2- (oleoiloxi) etil] -2-oleil-3- (2-hidroxi) etil] imidazolinio cloruro (DOTIM) y colesterol, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y colesterol, y combinaciones de los mismos.

En el presente documento también se describe una molécula de ácido nucleico adecuada que es cualquier secuencia de ácido nucleico como por ejemplo una secuencia codificante o no codificante, y ADN o ARN. Las secuencias de ácido nucleico codificantes codifican al menos una parte de una proteína o péptido, mientras que la secuencia no codificante no codifica ninguna parte de una proteína o péptido. De acuerdo con la presente invención, los ácidos nucleicos "no codificantes" pueden incluir regiones reguladoras de una unidad de transcripción, como por ejemplo una región promotora. El término "vector vacío" se puede utilizar indistintamente con el término "no codificante", y en particular se refiere a una secuencia de ácido nucleico en ausencia de una porción codificante de proteína, como un vector plásmido sin un inserto de gen. La expresión de una proteína codificada por la molécula de ácido nucleico no es necesaria para la provocación de una respuesta inmune no específica de antígeno; por lo tanto, la molécula de ácido nucleico no necesariamente tiene que estar unida operativamente a una secuencia de control de transcripción. Sin embargo, pueden obtenerse ventajas adicionales (por ejemplo, inmunidad potenciada y específica de antígeno) incluyendo en la composición la secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica un inmunógeno y / o una citoquina.

La complejación de un liposoma con una molécula de ácido nucleico se puede lograr utilizando métodos estándar en la técnica o tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.693.086. Una concentración adecuada de una molécula de ácido nucleico para añadir a un liposoma incluye una concentración eficaz para suministrar una cantidad suficiente de molécula de ácido nucleico a un sujeto, de manera que se provoque una respuesta inmune sistémica. En una forma de realización, desde aproximadamente 0.1 µg hasta aproximadamente 10 µg de molécula de ácido nucleico se combina con aproximadamente 8 nmol de liposomas, en otra forma de realización, desde aproximadamente 0.5 µg hasta aproximadamente 5 µg de molécula de ácido nucleico se combina con aproximadamente 8 nmol de liposomas, y en otra forma de realización, aproximadamente 1.0 µg de molécula de ácido nucleico se combina con aproximadamente 8 nmol de liposomas.

En una forma de realización, la proporción de ácidos nucleicos por lípidos (µg ácido nucleico: nmol de lípidos) en una composición es al menos de aproximadamente 1:1 ácido nucleico: lípido en peso (es decir, 1 µg ácido nucleico: 1 nmol de lípido), y en otra forma de realización, al menos de aproximadamente 1:5, y en otra forma de realización más, al menos de aproximadamente 1:10, y en una forma de realización adicional al menos de aproximadamente 1:20. Las proporciones expresadas en el presente documento se basan en la cantidad de lípido catiónico en la composición, y no en la cantidad total de lípido en la composición. En otra forma de realización, la relación de ácidos nucleicos por lípidos en una composición de la invención es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:80 ácido nucleico: lípido en peso; y en otra forma de realización, de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:40 ácido nucleico: lípido en peso; y una forma de realización adicional, de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:30 ácido nucleico: lípido en peso; y en otra forma de realización más, de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 1:15 ácido nucleico: lípido en peso.

b. Agente biológico

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

Los agentes biológicos adecuados son agentes que son eficaces en la prevención o el tratamiento de enfermedades bovinas. Dichos agentes biológicos incluyen proteínas potenciadoras inmunes, inmunógenos, vacunas, antimicrobianos o cualquier combinación de los mismos. Las proteínas potenciadoras inmunes adecuadas son aquellas proteínas que se sabe que potencian la inmunidad. A modo de ejemplo no limitativo, una citoquina, que incluye una familia de proteínas, es una familia de proteínas conocida que potencia la inmunidad. Los inmunógenos adecuados son proteínas que provocan una respuesta inmunitaria humoral y / o celular de manera que la administración del inmunógeno a un sujeto aumenta una respuesta inmunitaria específica de inmunógeno contra las mismas proteínas o proteínas similares que se encuentran dentro de los tejidos del sujeto. Un inmunógeno puede incluir un antígeno patógeno expresado por una bacteria, un virus, un parásito o un hongo. Los antígenos preferentes incluyen antígenos que causan una enfermedad infecciosa en un sujeto. De acuerdo con la presente invención, un inmunógeno puede ser cualquier parte de una proteína, natural o derivada sintéticamente, que provoca una respuesta inmune humoral y / o celular. Como tal, el tamaño de un antígeno o inmunógeno puede ser tan pequeño como de aproximadamente 5 a 12 aminoácidos y tan grande como una proteína de longitud completa, incluidos los tamaños intermedios. El antígeno puede ser una proteína multimérica o una proteína de fusión. El antígeno puede ser antígenos peptídicos purificados derivados de células nativas o recombinantes. Las secuencias de ácido nucleico de las proteínas potenciadoras inmunitarias e inmunógenos están vinculadas operativamente a una secuencia de control de transcripción, de manera que el inmunógeno se expresa en un tejido de un sujeto, provocando así una respuesta inmune específica de inmunógeno en el sujeto, además de la respuesta inmune no específica.

En otra forma de realización de la invención, el agente biológico es una vacuna. La vacuna puede incluir una vacuna viva, infecciosa, viral, bacteriana o parasitaria o una vacuna muerta, inactivada, viral, bacteriana o parasitaria. En una forma de realización, una o más vacunas, vacunas virales vivas o muertas, se pueden utilizar en combinación con la composición inmunomoduladora de la presente invención. Las vacunas adecuadas incluyen las conocidas en la técnica para las especies de ganado. Las vacunas ejemplares, sin limitación, incluyen aquellas utilizadas en la técnica para la protección contra la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) (virus

herpes bovino tipo 1 (BHV1)), virus de la parainfluenza tipo 3 (PI3), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus bovino virus de la diarrea (BVDV Tipo 1 y 2), *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis* y otras enfermedades conocidas en la técnica. En una forma de realización ejemplar, se puede usar una vacuna para la protección contra *Mannheimia haemolytica* en combinación con la composición inmunomoduladora de la presente invención.

En otra forma de realización más de la invención, el agente biológico es un antimicrobiano. Los antimicrobianos adecuados incluyen: quinolonas, preferentemente fluoroquinolonas, β -lactamas y antibióticos macrólidos-estreptogramina-lincosamida (MLS).

Las quinolonas adecuadas incluyen: benfloxacin, binfloxacin, cinoxacin, ciprofloxacina, clinafloxacina, adafloxacina, enoxacin, enrofloxacin, feroxacin, gemifloxacina, ibafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, marbofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, orbifloxacina, paxulfloxacina, pradofloxacina, perfloxacina, temafloxacina, tosulfloxacina, sarafloxacina, gemifloxacina y esparfloxacina. Las fluoroquinolonas preferentes incluyen ciprofloxacina, enrofloxacin, moxifloxacina, danofloxacina y pradofloxacina. Las naitiridonas adecuadas incluyen ácido nalidíxico.

Las β -lactamas adecuadas incluyen penicilinas, como por ejemplo la penicilina benzatínica, la penicilina bencilina (penicilina V), la penicilina de procaína, meticilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flocoxacilina, temocilina, amoxicilina, co-amoxiclav (amoxicilina y ácido clavulánico), azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina; cefalosporinas, como por ejemplo cefalonio, cefalexina, cefazolina, cefapirina, cefquinoma, ceftiofur, cefalotina, cefaclor, cefuroxima, cefamandol, defotetan, cefoxitina, ceftriaxone, cefotaxima, cefpodoxima, cefixima, ceftazidima, cefepima, cefpiroma, carbapenems y penems como imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem, doripenem, monobactams como aztreonam (Azactam), tigemonam, nocardicina A, tabtoxinina-B-lactama; e inhibidores de la β -lactamasa, como por ejemplo ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam. Las β -lactamas preferidas incluyen cefalosporinas, en particular, cefazolina.

Los antibióticos MLS adecuados incluyen cualquier macrólido, lincomicina, clindamicina, pirlimicina. Una lincosamida preferida es pirlimicina.

Otros antimicrobianos incluyen 2-piridonas, tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglicósidos, trimetoprim, dimetridazoles, eritromicina, framitelina, furazolidona, diversas pleuromutilinas como por ejemplo tiamulina, valnemulina, diversas estreptomycinas, clopidol, salinomicina, monensina, halofuginona, narasina, robenidina, etc

2. Métodos

a. Métodos de estimulación inmune.

En una forma de realización de la invención, se provoca una respuesta inmune en un miembro de la especie bovina administrando una cantidad eficaz de una composición inmunomoduladora al miembro de la especie bovina. La cantidad efectiva es suficiente para provocar una respuesta inmune en el miembro de la especie bovina. El inmunomodulador incluye un vehículo de administración de liposomas y una molécula de ácido nucleico.

En una forma de realización, la cantidad efectiva del inmunomodulador es de aproximadamente 1 microgramos a aproximadamente 1000 microgramos por animal. En otra forma de realización, la cantidad efectiva del inmunomodulador es de aproximadamente 5 microgramos a aproximadamente 500 microgramos por animal. En otra forma de realización más, la cantidad efectiva del inmunomodulador es de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 100 microgramos por animal. En una forma de realización adicional, la cantidad efectiva del inmunomodulador es de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 50 microgramos por animal.

En otra forma de realización de la invención, se provoca una respuesta inmunitaria en un miembro de la especie bovina administrando una cantidad eficaz de un inmunomodulador, que incluye un vehículo de administración de liposomas, una molécula de ácido nucleico aislada y un agente biológico. Se contempla que el agente biológico se puede mezclar con o coadministrar con el inmunomodulador o independientemente del mismo. La administración independiente puede ser antes o después de la administración del inmunomodulador. También se contempla que puede utilizarse más de una administración del inmunomodulador o agente biológico para extender la inmunidad potenciada. Además, se puede coadministrar más de un agente biológico con el inmunomodulador, se puede administrar antes del inmunomodulador, se puede administrar después de la administración del inmunomodulador, o simultáneamente.

b. Enfermedades

Los métodos de la invención provocan una respuesta inmune en un sujeto de manera que el sujeto está protegido de una enfermedad que es susceptible de provocar una respuesta inmune. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "protegido / a de una enfermedad" se refiere a reducir los síntomas de la enfermedad; reducir la aparición de la enfermedad, y reducir la gravedad clínica o patológica de la enfermedad o

reducir la diseminación de un patógeno que provoca una enfermedad. La protección de un sujeto puede referirse a la capacidad de una composición terapéutica de la presente invención, cuando se administra a un sujeto, para prevenir que ocurra una enfermedad, curar y / o aliviar o reducir los síntomas de la enfermedad, los signos clínicos, la patología o las causas. Los ejemplos de signos clínicos de BRD incluyen lesiones pulmonares, aumento de la temperatura, depresión (por ejemplo, anorexia, sensibilidad reducida a los estímulos externos, orejas caídas), descarga nasal y carácter respiratorio (por ejemplo, frecuencia respiratoria, esfuerzo respiratorio).

Como tal, proteger a un miembro de la especie bovina de una enfermedad incluye prevenir la aparición de la enfermedad (tratamiento profiláctico) y tratar a un miembro de la especie bovina que tiene una enfermedad (tratamiento terapéutico). En particular, la protección de un sujeto de una enfermedad se logra provocando una respuesta inmunitaria en el miembro de la especie bovina induciendo una respuesta inmunitaria beneficiosa o protectora que puede, en algunos casos, suprimir, reducir, inhibir o bloquear adicionalmente una actividad hiperactiva o una respuesta inmune perjudicial. El término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de la salud normal de un miembro de la especie bovina e incluye un estado en que están presentes los síntomas de la enfermedad, así como las condiciones en las que se ha producido una desviación (por ejemplo, infección, mutación genética, defecto genético, etc.), pero los síntomas todavía no se han manifestado.

Los métodos de la invención se pueden utilizar para la prevención de enfermedades, la estimulación de la inmunidad de las células efectoras contra enfermedades, la eliminación de enfermedades, el alivio de enfermedades y la prevención de enfermedades secundarias resultantes de la aparición de una enfermedad primaria.

La presente invención también puede mejorar la respuesta inmune adquirida del animal cuando se coadministra con una vacuna frente a la administración de la vacuna por sí misma. En general, una vez que se administra una vacuna, ésta no protege al animal inmediatamente, ya que lleva tiempo estimular la inmunidad adquirida. El término "mejorar" se refiere, en la presente invención, a la provocación de una respuesta inmune innata en el animal hasta que la vacuna comienza a proteger al animal y / o a prolongar el período de protección, a través de la inmunidad adquirida, proporcionada por la vacuna.

Los métodos de la invención incluyen administrar la composición para proteger contra la infección de una amplia variedad de patógenos. La composición administrada puede o no incluir un antígeno específico para provocar una respuesta específica. Se contempla que los métodos de la invención protegerán al sujeto receptor de enfermedades resultantes de agentes microbianos infecciosos que incluyen, sin limitación, virus, bacterias, hongos y parásitos. Las enfermedades infecciosas virales ejemplares, sin limitación, incluyen aquellas resultantes de la infección con rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) (virus del herpes bovino tipo 1 (BHV1)), virus de la parainfluenza tipo 3 (PI3), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV Tipo 1 y 2), adenovirus bovino, coronavirus bovino (BCV), calicivirus bovino, parvovirus bovino, BHV4, reovirus bovino, enterovirus bovino, rinovirus bovino, virus de fiebre catarral bovina, virus de la leucemia bovina, virus de la rabia, virus de estomatitis vesícula (VSV), lengua azul (Orbivirus), sus recombinantes y otros virus conocidos en la técnica. Las infecciones bacterianas ejemplares, sin limitación, incluyen aquellas resultantes de la infección con bacterias gram positivas o negativas y Mycobacterias como *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium colinum*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium chauveoi*, *Clostridium septicum*, *Clostridium hemolyticum*, *Clostridium tetani*, *Mannheimia haemolytica*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Histophilus somni*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus anthrax*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium spp.*, *Treponema spp.*, *Corynebacterium*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium spp.*, *Histophilus spp.*, *Moraxella spp.*, *Muellerius spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Salmonella spp.*, *Bacillus anthracis*, y otras bacterias conocidas en la técnica. Entre los hongos o infecciones de moho ejemplares, sin limitación, se incluyen los que resultan de la infección con *Actinobacterim spp.*, *Aspergillus spp.*, *E Histomonas spp.*, Y otros hongos o mohos infecciosos conocidos en la técnica. Los parásitos ejemplares incluyen, sin limitación, *Neospora spp.*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Anaplasma spp.*, *Babesia spp.*, *Chorioptes spp.*, *Cysticercus spp.*, *Dermatophilus spp.*, *Damalina bovis*, *Dictylocaulus spp.*, *Eimeria spp.*, *Eperythrozoon spp.*, *Haemonchus spp.*, *Melophagus spp.*, *Muellerius spp.*, *Nematodirus spp.*, *Oestrus spp.*, *Ostertagia spp.*, *Psoroptes spp.*, *Sarcoptes spp.*, *Se / pens spp.*, *Strongploidis spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trichuris spp.* y *Tritrichomas spp.*, *Fascioloides spp.*, *Anaplasma marginale*, y otros parásitos conocidos en la técnica.

c. Sujetos

Los métodos de la invención pueden administrarse a cualquier sujeto o miembro de la especie bovina, ya sea doméstica o salvaje. En particular, se puede administrar a aquellos sujetos que se crían comercialmente para la cría, la producción de carne o leche. Los sujetos bovinos adecuados, sin limitación, incluyen antílopes, búfalos, yaks, bovinos y bisontes. En una forma de realización, el miembro de la especie bovina es ganado bovino. Las especies de ganado incluyen, sin limitación, vacas, toros, novillos, novillas, bueyes, ganado de engorde o ganado lechero. Un experto en la materia apreciará que los métodos de la invención serán en gran medida beneficiosos para el ganado criado para la cría, la producción de carne o leche, ya que son especialmente vulnerables a la exposición ambiental a agentes infecciosos.

d. Administración

Se encuentran disponibles una variedad de rutas de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de los agentes biológicos particulares seleccionados, la edad y el estado general de salud del sujeto, la afección particular que se trata y la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de esta invención pueden ponerse en práctica utilizando cualquier modo de administración que produzca niveles efectivos de respuesta inmune sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Las composiciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica.

La vacunación de la especie bovina se puede realizar a cualquier edad. La vacuna se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, por vía subcutánea, por pulverización / aerosol, por vía oral, intraocular, intratraqueal, intranasal o por otros métodos conocidos en la técnica. Además, se contempla que los métodos de la invención pueden utilizarse en base a programas de vacunación rutinarios. El inmunomodulador también se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular, por vía subcutánea, por pulverización, por vía oral, intraocular, intratraqueal, nasal o por otros métodos conocidos en la técnica. En una forma de realización, el inmunomodulador se administra por vía subcutánea. En otra forma de realización, el inmunomodulador se administra por vía intramuscular. En otra forma de realización más, el inmunomodulador se administra como un aerosol. En una forma de realización adicional, el inmunomodulador se administra por vía oral.

En una forma de realización, el inmunomodulador se administra solo al animal antes de la exposición (o infección). En otra forma de realización, el inmunomodulador se administra solo al animal después de la exposición (o infección). En otra forma de realización más, el inmunomodulador se administra solo al animal al mismo tiempo que la exposición (o infección). En una forma de realización adicional, la composición del inmunomodulador se coadministra al mismo tiempo que la vacunación antes de la exposición. En otra forma de realización adicional, la composición inmunomoduladora se coadministra al mismo tiempo que la vacunación al mismo tiempo que la exposición (o infección). La administración conjunta puede incluir la administración de la vacuna y el inmunomodulador en la misma ubicación general en el animal en dos sitios diferentes uno al lado del otro (por ejemplo, inyecciones una junto a la otra en el cuello del animal), en lados opuestos del animal en la misma ubicación general (es decir, uno en cada lado del cuello), o en diferentes ubicaciones del mismo animal.

En otra forma de realización, la composición inmunomoduladora se administra antes de la vacunación y la exposición. En una forma de realización adicional, la composición inmunomoduladora se administra después de la vacunación pero antes de la exposición. En una forma de realización adicional, la composición inmunomoduladora se administra después de la exposición a un animal que ha sido vacunado antes de la exposición (o infección).

En una forma de realización, el inmunomodulador se administra desde aproximadamente 1 a aproximadamente 14 días antes de la exposición o desde aproximadamente 1 a aproximadamente 14 días después de la exposición. En otra forma de realización, el inmunomodulador se administra desde aproximadamente 1 a aproximadamente 7 días antes de la exposición o desde aproximadamente 1 a aproximadamente 7 días después de la exposición. En otra forma de realización más, el inmunomodulador se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días antes de la exposición o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días después de la exposición.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación prolongada, liberación retardada o liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de las composiciones, por lo tanto, aumentando la conveniencia. Muchos tipos de sistemas de administración de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas basados en polímeros, como poli (lactida-glicolida), copoloxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5,075,109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras como mono-di y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas sylvatic; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; tabletas de comprimidos que utilizan aglutinantes convencionales y excipientes; implantes parcialmente fundidos; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de erosión en los que un agente de la invención está contenido en una forma dentro de una matriz como las descritas en las patentes de EE. UU. Nos. 4,452,775, 4,675,189 y 5,736,152, y sistemas difusionales en los que se impregna un componente activo a una velocidad controlada de un polímero tal como se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 3,854,480, 5,133,974 y 5,407,686. Además, se pueden utilizar sistemas de suministro de equipos basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

Dado que se podrían realizar varios cambios en la composición, los productos y los métodos anteriores sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y en los ejemplos que figuran a continuación, se interprete como ilustrativa y no en un sentido limitante.

DEFINICIONES

5 El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad efectiva de inmunomodulador para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa es la cantidad necesaria para causar el desarrollo de una respuesta inmune al exponerse al microbio, lo que causa una reducción en la cantidad de microbio dentro del sujeto y, preferentemente, para la erradicación del microbio. La cantidad efectiva para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se trata, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad efectiva de inmunomodulador sin necesidad de experimentación indebida.

10 El término "citocina" se refiere a una familia de proteínas que mejora el sistema inmunológico. La familia de citoquinas incluye factor de crecimiento hematopoyético, interleucinas, interferones, moléculas de superfamilia de inmunoglobulinas, moléculas de familia de factor de necrosis tumoral y quimiocinas (es decir, proteínas que regulan la migración y activación de las células, particularmente células fagocíticas). Las citoquinas ejemplares incluyen, sin limitación, interleucina-2 (IL-2), interleucina -12 (IL12), interleuquina-15 (IL-15), interleuquina-18 (IL-18), interferón-a (IFN α) e interferón - γ (IFN γ).

El término "obtener" se puede usar indistintamente con los términos activar, estimular, generar o regular.

20 El término "provocar una respuesta inmune" en un sujeto se refiere a controlar o influir específicamente en la actividad de la respuesta inmune, y puede incluir la activación de una respuesta inmune, regular la respuesta inmune, mejorar la respuesta inmune y / o alterar una respuesta inmune (como por ejemplo provocando un tipo de respuesta inmune que a su vez cambia el tipo prevalente de respuesta inmune en un sujeto de una que es dañina o ineficaz a una que es beneficiosa o protectora).

25 El término "unido operativamente" se refiere a unir una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de transcripción de manera tal que la molécula pueda expresarse cuando se transfecta (es decir, se transforma, se transduce o se transfecta) en una célula huésped. Las secuencias de control transcripcional son secuencias que controlan el inicio, el alargamiento y la terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, como por ejemplo secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Los expertos en la técnica conocen una variedad de dichas secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de transcripción preferentes incluyen aquellas que funcionan en células de aves, peces, mamíferos, bacterias, plantas e insectos.

30 Si bien puede utilizarse cualquier secuencia de control de la transcripción con la invención, las secuencias pueden incluir secuencias de control de la transcripción que se producen naturalmente asociadas naturalmente con una secuencia que codifica un inmunógeno o una proteína estimulante inmune.

35 Los términos "molécula de ácido nucleico" y "secuencia de ácido nucleico" se pueden usar de manera intercambiable e incluyen ADN, ARN o derivados de ADN o ARN. Los términos también incluyen oligonucleótidos y secuencias más grandes, que incluyen tanto moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína o un fragmento de la misma, como moléculas de ácido nucleico que comprenden regiones reguladoras, intrones u otros ADN o ARN no codificantes. Habitualmente, un oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 nucleótidos, y más habitualmente, tiene una longitud de al menos aproximadamente 5 nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede derivarse de cualquier fuente, incluidas fuentes de mamíferos, peces, bacterias, insectos, virus, plantas o sintéticas. Una molécula de ácido nucleico puede producirse mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica, como la tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación, clonación) o síntesis química. Las moléculas de ácido nucleico incluyen moléculas de ácido nucleico natural y homólogos de las mismas, que incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas naturales y moléculas de ácido nucleico modificadas en las que se han insertado, eliminado, sustituido o invertido los nucleótidos de tal manera que dichas modificaciones no interfieren sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico para codificar un inmunógeno o proteína estimulante inmune útil en los métodos de la presente invención. Se puede producir un homólogo de ácido nucleico utilizando varios métodos conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989).

50 Los expertos en la técnica conocen técnicas para detectar la inmunogenicidad, como la inmunogenicidad del antígeno patógeno o la actividad de citoquinas, e incluyen una variedad de ensayos in vitro e in vivo.

EJEMPLOS

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

55 Ejemplo 1. Evaluación del ganado que recibe un inmunomodulador de ADN antes o después de desarrollar una enfermedad respiratoria natural bovina.

El propósito de este estudio fue determinar la eficacia del inmunomodulador de ADN administrado a los terneros antes y después del desarrollo de casos naturales de BRD.

Inmunomodulador

5 El inmunomodulador utilizado en este estudio fue una composición que comprende un lípido catiónico y un ADN no codificante. Los componentes lipídicos inmunomoduladores sintéticos [1- [2- [9- (Z) -octadecenoyloxi]] - 2- [8] (Z) -heptadecenil] -3- [hidroxietil] imidazolinio cloruro (DOTIM) y un colesterol lipídico neutro sintético fueron formulados para producir liposomas de aproximadamente 200 nm de diámetro (Ver, Patente de los Estados Unidos 6,693,086). El componente de ADN era un plásmido de ADN no codificante de 4242 pares de bases producido en E. coli, que, al estar cargado negativamente, se asocia con los liposomas cargados positivamente (catiónicos) (Ver, Patente de los Estados Unidos 6,693,086).

Animales de Estudio

15 84 terneros Holstein en edad de destete se seleccionaron de un hato sin un historial actual de enfermedades respiratorias. Cada ternero se evaluó inicialmente y se determinó que gozaba de buena salud. Los 84 terneros se dividieron en siete grupos de tratamiento de 12 terneros cada uno. Solo se incluyeron en el estudio los animales no vacunados contra Mannheimia haemolytica. Ninguno de los animales había recibido un agente antimicrobiano en los 30 días anteriores a la administración del inmunomodulador de ADN.

20 A los grupos de tratamiento se les administraron dosis variables del inmunomodulador de ADN descrito anteriormente en el día del tratamiento tal como se indica en la Tabla 1 .1 a continuación. El esquema de dilución del inmunomodulador de ADN se proporciona en la Tabla 1.2. El inmunomodulador de ADN se administró por vía intramuscular y craneal en el hombro izquierdo, ventral al ligamento nucal y caudodorsal en el surco yugular de los terneros.

Tal como se menciona más adelante, el Día de tratamiento -1 se refiere a la fecha de inicio del estudio después de la selección inicial en la que se evaluó a los terneros y se determinó que eran adecuados para el estudio. El Día de Tratamiento 0 es un día posterior al Día -1, y así sucesivamente.

25 Tabla 1 .1. Planificación de Administración de Inmunomodulador

Número de Tratamiento	Dosis de Inmunomodulador de ADN (µg)	Día de Administración de Inmunomodulador	Animales por Grupo de Tratamiento
1	500	-1	12
2	200	-1	12
3	50	-1	12
4	500	0	12
5	200	0	12
6	50	0	12
7	0 (Control)	NA	12

30 Se observó que una gran proporción de los terneros experimentaban niveles variables de BRD en la mañana del día 0. En el Día 5, se observó que todos los terneros que quedaban en la población del estudio cumplían con la definición de caso de morbilidad por BRD. El ganado solo se eliminó de la población del estudio si se indicó la eutanasia debido a una BRD grave. No se observaron otras enfermedades infecciosas / no infecciosas y, por lo tanto, fue necesario eliminarlas en este estudio.

Evaluación

35 En los Días 1 a 5 del estudio, se evaluaron diversos indicadores de salud de los terneros. Por ejemplo, se determinaron la temperatura rectal y el peso promedio diario para cada uno de los terneros por día a lo largo del estudio. Los animales se evaluaron aproximadamente a la misma hora cada día (+/- 3 horas) desde el Día 1 hasta el Día 5. Se analizaron los promedios de las temperaturas rectales y el aumento de peso diario promedio de acuerdo con la dosis de inmunomodulador administrada. En el día 5, todos los terneros fueron sacrificados y necropsiados. Los resultados de las lesiones pulmonares se determinaron (según el grado de consolidación pulmonar estimado por inspección visual y palpación manual) para cada ternero individual en el momento de la necropsia.

Se analizaron los resultados de lesión pulmonar con respecto a la dosis de inmunomodulador administrado. Los resultados generales de las lesiones pulmonares para cada día de administración fueron de aproximadamente 11% y 14% para el Día -1 y el Día 0, respectivamente. Se expusieron resultados de lesiones pulmonares de 11.2%, 9.0%, 10.8% y 19.9% para 500, 200, 50 y grupos de control negativo, respectivamente. La mayor diferencia entre el grupo de control y un grupo tratado (200 µg) fue aproximadamente una reducción del 11%.

Las estimaciones ajustadas por modelo reflejan los promedios sin procesar que se ajustan para todas las covariables del modelo estadístico (es decir, dosis, día y dosis por día), así como para el estable en el que se alojaron los terneros durante todo el estudio. Por lo tanto, las estimaciones ajustadas por el modelo pueden mostrar diferencias en comparación con los promedios sin procesar.

También se realizaron bacteriología (cultivos de pulmón) y virología (frotis nasales) posteriores. De los terneros restantes (69) que se sacrificaron el Día 5, se encontró que un 11.6% presentaban virus de herpes bovino tipo 1 (BHV-1) en las secreciones nasales. Con respecto a los cultivos de pulmón de todos los animales del estudio, el 41% fue positivo para Mh, el 31,3% fue positivo para *Pasteurella multocida* (Pm), el 10.8% fue positivo para Mh y Pm, y no se aisló *Histophilus somni* en toda la población estudiada. En este estudio no se realizaron cultivos para *Mycoplasma bovis*.

Resultados

En este estudio, la dosis del inmunomodulador de ADN (es decir, 500 µg, 200 µg y 50 µg) permitió una reducción significativa en los resultados de las lesiones pulmonares en comparación con el control negativo ($P = 0.1284$). Sin embargo, el día de la administración del inmunomodulador de ADN (es decir, el Día -1 o 0) no se asoció significativamente con los resultados de las lesiones pulmonares. No se observaron diferencias estadísticas en los resultados de lesiones pulmonares entre los grupos de dosis de inmunomodulador de ADN. La temperatura rectal tendió a asociarse significativamente con la dosis de inmunomodulador de ADN ($P = 0.1190$), pero no se asoció con el día de la administración. No se observaron diferencias obvias entre la dosis del inmunomodulador de ADN y el control negativo con respecto al aumento de peso diario promedio.

Se produjo una fuerte tendencia a que el inmunomodulador de ADN redujera las lesiones pulmonares en comparación con el control negativo, lo que demuestra que este producto tiene el potencial de proteger el tejido pulmonar durante un brote de BRD. En este estudio, el día de la administración del tratamiento no se asoció con las lesiones pulmonares, lo que indica que no importa si el ganado recibió el inmunomodulador de ADN un día antes o el mismo día en que se presentaron los signos clínicos asociados con la BRD. Este resultado es importante ya que el tiempo de exposición a los patógenos BRD generalmente se desconoce entre los sistemas de producción habituales y se complica aún más por el impacto de diversos factores estresantes experimentados por el ganado en toda la cadena de producción. Por lo tanto, proporcionar a los productores un producto que ofrezca flexibilidad en el momento de la administración, en relación con la aparición de BRD, es de extremo valor en las industrias de carne y lácteos.

Ejemplo 2. Evaluación del ganado que recibe un inmunomodulador de ADN simultáneamente o un día después de una exposición experimental con *Mannheimia haemolytica*

El propósito de este estudio fue determinar la eficacia del inmunomodulador de ADN administrado a terneros simultáneamente o un día después de una exposición experimental con *Mannheimia haemolytica*.

Inmunomodulador

El inmunomodulador utilizado en este estudio fue la composición descrita anteriormente en el Ejemplo 1.

Animales de Estudio

84 terneros Holstein en edad de destete y con un peso promedio de aproximadamente 300 lb (136 kg) se seleccionaron de un hato sin un historial actual de enfermedades respiratorias. Cada ternero se evaluó inicialmente y se determinó que gozaba de buena salud. Los 84 terneros se dividieron en siete grupos de tratamiento de 12 terneros cada uno. Solo se incluyeron en el estudio los animales no vacunados contra *Mannheimia haemolytica*. Ninguno de los animales había recibido un agente antimicrobiano en los 30 días anteriores a la administración del inmunomodulador de ADN. Los grupos de tratamiento recibieron dosis variables del inmunomodulador de ADN el día del tratamiento, tal como se indica en la Tabla 2.1 a continuación.

El esquema de dilución del inmunomodulador de ADN se proporciona en la Tabla 2.2. El inmunomodulador de ADN se administró por vía intramuscular y craneal en el hombro izquierdo, ventral al ligamento nucal y caudodorsal en el surco yugular de los terneros.

Tal como se menciona más adelante, el Día de tratamiento 0 se refiere a la fecha de inicio del estudio después de la selección inicial en la que se evaluó a los terneros y se determinó que estaban en buen estado de salud. El Día de Tratamiento 1 es un día posterior al día 0, y así sucesivamente.

Tabla 2.1. Planificación de Administración de Inmunomodulador y Exposición a Mh

Número de Tratamiento	Dosis de Inmunomodulador de ADN (μg)	Día de Administración de Inmunomodulador	Día de Administración de Exposición a Mh	Animales por Grupo de Tratamiento
1	500	0	0	12
2	200	0	0	12
3	50	0	0	12
4	500	1	0	12
5	200	1	0	12
6	50	1	0	12
7	0 (Control)	NA	0	12

Exposición experimental

- 5 En el día 0, los terneros fueron expuestos a un total de 3.12×10^7 unidades formadoras de colonias (CFU) de *Mannheimia haemolytica*. El inóculo se administró por vía respiratoria. En el día 3, se observó que todos los terneros en la población de estudio cumplían con la definición de caso de morbilidad por BRD. El promedio de día de aparición fue un día.

Evaluación

- 10 Al igual que en el ejemplo anterior, en los días 1 a 5 del estudio, se evaluaron varios indicadores de salud de los terneros. La temperatura rectal y el peso promedio diario se determinaron para cada uno de los terneros por día a lo largo del estudio. Los animales fueron evaluados aproximadamente a la misma hora cada día. Se analizaron los promedios de las temperaturas rectales y el aumento de peso diario promedio con respecto a la dosis de inmunomodulador administrado.
- 15 En el Día 5, todos los terneros fueron sacrificados y necropsiados. Se determinaron los resultados de lesión pulmonar para cada ternero individual en el momento de la necropsia de acuerdo con la fórmula descrita en el Ejemplo 1.

Se analizaron los resultados de lesión pulmonar ajustados por el modelo con respecto a la dosis de inmunomodulador administrada.

20 Resultados

- 25 En este estudio, la dosis del inmunomodulador de ADN (es decir, 500 μg , 200 μg y 50 μg) redujo significativamente los resultados de las lesiones pulmonares en comparación con el control negativo. Sin embargo, las dosis más bajas (200 μg y 50 μg) superaron la dosis de 500 μg en la reducción de lesiones pulmonares. El día de la administración del inmunomodulador de ADN (es decir, el Día 0 o 1) no se asoció significativamente con los resultados de las lesiones pulmonares. No se observaron diferencias estadísticas en los resultados de lesiones pulmonares entre los grupos de dosis de inmunomodulador de ADN. La temperatura rectal se redujo significativamente en los terneros a los que se administró el inmunomodulador de ADN en comparación con el control negativo, pero no se asoció con la dosis. No se observaron diferencias obvias entre la dosis del inmunomodulador de ADN y el control negativo con respecto al aumento de peso diario promedio.
- 30 Se produjo una fuerte tendencia a que el inmunomodulador de ADN redujera las lesiones pulmonares en comparación con el control negativo, lo que demuestra que este producto tiene el potencial de proteger el tejido pulmonar durante un brote de BRD. En este estudio, el día de la administración del tratamiento no se asoció con lesiones pulmonares, lo que indica que no importó si el ganado recibió el inmunomodulador de ADN un día antes, o el mismo día, el inicio de los signos clínicos asociados con BRD. Este resultado es importante ya que el tiempo de exposición a los patógenos de BRD es generalmente desconocido entre los sistemas de producción habituales y se complica aún más por el impacto de diversos factores estresantes experimentados por el ganado en toda la cadena de producción. Por lo tanto, proporcionar a los productores un producto que ofrezca flexibilidad en el tiempo de administración, en relación con la aparición de BRD, es de gran valor en las industrias de carne y lácteos.

40

Ejemplo 3. Evaluación del ganado que recibió un inmunomodulador de ADN dos días antes o simultáneamente con una exposición experimental con *Mannheimia haemolytica*

El propósito de este estudio fue determinar la eficacia del inmunomodulador de ADN administrado a los terneros dos días antes o simultáneamente con una exposición experimental con *Mannheimia haemolytica*.

5 Inmunomodulador

El inmunomodulador utilizado en este estudio fue la composición descrita anteriormente en el Ejemplo 1.

Animales de Estudio

10 96 terneros Holstein con un promedio de peso de alrededor de 800-1000 lbs (363-454 kg) fueron seleccionados de un hato sin un historial actual de enfermedades respiratorias. Cada ternero se evaluó inicialmente y se determinó que gozaba de buena salud. Los 96 terneros se dividieron en ocho grupos de tratamiento de 12 terneros cada uno. Solo se incluyeron en el estudio los animales no vacunados contra *Mannheimia haemolytica*. Ninguno de los animales había recibido un agente antimicrobiano en los 30 días anteriores a la administración del inmunomodulador de ADN. A los grupos de tratamiento se les administraron dosis variables del inmunomodulador de ADN el día del tratamiento tal como se indica en la Tabla 3.1 a continuación. El esquema de dilución del inmunomodulador de ADN se proporciona en la Tabla 3.2. El inmunomodulador de ADN se administró por vía intramuscular y craneal en el hombro izquierdo, ventral al ligamento nugal y caudo-dorsal al surco yugular de los terneros.

15 Tal como se indica más adelante, el Día de tratamiento -2 se refiere a la fecha de inicio del estudio cuando se administró el inmunomodulador a los Grupos de tratamiento 1-3. El día de Tratamiento 0 es dos días después del día -2, y así sucesivamente.

Tabla 3.1. Planificación de Administración de Inmunomodulador y Exposición a Mh

Número de Tratamiento	Dosis de Inmunomodulador de ADN (µg)	Día de Administración de Inmunomodulador	Día de Administración de Exposición de Mh	Animales por Grupo de Tratamiento
1	200	-2	0	12
2	50	-2	0	12
3	25	-2	0	12
4	200	0	0	12
5	50	0	0	12
6	25	0	0	12
7	0 (Control)	-2	0	12
8	0 (Control)	0	0	12

Exposición experimental

25 En el día 0, los terneros fueron expuestos a un total de 1.9×10^{10} CFU. El inóculo se administró por vía respiratoria.

Evaluación

30 Al igual que en los ejemplos anteriores, en los días 1 a 5 del estudio, se evaluaron varios indicadores de salud de los terneros. En el Día 5, todos los terneros fueron sacrificados y necropsiados. Se determinaron los resultados de lesión pulmonar para cada ternero individual en el momento de la necropsia.

Se analizaron los resultados de lesión pulmonar ajustados por el modelo con respecto a la dosis de inmunomodulador administrada, así como los resultados de lesión pulmonar ajustados por el modelo con respecto al día de administración del inmunomodulador.

Resultados

35 En este estudio, la dosis del inmunomodulador de ADN (es decir, 200 µg, 50 µg y 25 µg) redujo significativamente los resultados de las lesiones pulmonares en comparación con los controles negativos. Sin

embargo, no se observaron diferencias estadísticas en los resultados de lesión pulmonar entre los grupos de dosis de inmunomodulador de ADN. El día de la administración del inmunomodulador de ADN (es decir, Los Días -2 y 0) se asoció significativamente con los resultados de lesiones pulmonares. Se observó una reducción significativa en las lesiones pulmonares cuando se administró el inmunomodulador en el día 0 en comparación con el Día -2.

Ejemplo 4. Coadministración de exposición a Mh de inmunomodulador y vacuna de Mh muerta.

El propósito de este estudio fue determinar la eficacia del inmunomodulador de ADN coadministrado con la vacuna de Mh muerta a los terneros sometidos a una exposición experimental con *Mannheimia haemolytica*.

Inmunomodulador

El inmunomodulador utilizado en este estudio fue la composición descrita anteriormente en el Ejemplo 1.

Animales de Estudio

81 terneros Holstein, de 12 semanas de edad, fueron seleccionados de una manada sin un historial actual de enfermedades respiratorias. Se evaluó cada ternero de forma individual y se determinó que gozaba de buena salud. Solo se incluyeron en el estudio los animales no vacunados contra *Mannheimia haemolytica*. Ninguno de los animales había recibido un agente antimicrobiano en los 30 días anteriores a la administración del inóculo.

Infeción y Exposición Experimental

La exposición, o infección experimental, incluyó la exposición a un inóculo de *Mannheimia haemolytica*. Los organismos se utilizaron a una concentración de 1.7×10^8 por animal para el primer inóculo y 2.4×10^{10} por animal para el segundo inóculo. Los animales también fueron expuestos por medio de un vaporizador por otra vía respiratoria. La concentración de los organismos en el inóculo de pulverización fue de 1.9×10^{10} por animal.

La eficacia del inmunomodulador, tal como se ha descrito anteriormente, administrado a los terneros seguido por la exposición a *Mannheimia haemolytica* fue determinada por los doce grupos de tratamiento tal como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 4.3. Grupos de Tratamiento de Estudio.

Grupo	Dosis Objetivo	Días de Tratamiento		Número de Animales
		Días	Contacto	
T1	Vacuna MH muerta (aceite) (SC)	0	X	7
T2	Vacuna MH muerta (aceite) (SC) + Inmunomodulador 500 µg (SC)	0	X	7
T3	Vacuna MH muerta (aceite) (SC)	7	X	6
T4	Vacuna MH muerta (aceite) (SC) + Inmunomodulador 500 µg (SC)	7	X	7
T5	Inmunomodulador 500 µg (SC)	7	X	7
T6	Inmunomodulador 500 µg (SC)	13	X	7
T7	Inmunomodulador 500 µg (IM)	13	X	7
T8	Inmunomodulador 500 µg (SC)	15*	X	7
T9	Control NC	NA	NA	7
T10	Control CC	NA	X	5
T11	Control SE	NA	X	7
T12	Vacuna MH muerta (acuosa) + Inmunomodulador 500 µg (SC)	0	X	7

Aceite MH = vacuna de <i>Mannheimia haemolytica</i> (Pulmo-Guard © P MM)	MH
acuoso = vacuna de <i>Mannheimia haemolytica</i> (One Shot®)	NC =
No mezclado y no pulverizado (para patología general)	CC =
Contacto y pulverizado	SE =
Utilizado como exposición de Sembradora (Exposición intratraqueal)	
Todos los animales, excepto SE y NC fueron sometidos a rociado	
SC = Vía de inyección subcutánea	
IM = Vía de inyección intramuscular	
NA = No aplicable	
* Los animales en el grupo T8 serán tratados después de la exposición intranasal	

5 En el Día 0 del estudio, a todos los animales de los grupos T1, T2 y T12 se les administró el inmunomodulador por vía subcutánea. El inmunomodulador se administró subcutáneamente en el día 7 a los grupos T3, T4 y T5. El inmunomodulador se administró por vía subcutánea en el día 13 al grupo T6 y por vía intramuscular a T7. El inmunomodulador se administró por vía subcutánea en el día 15 al grupo T8.

Todos los animales que recibieron la vacuna fueron vacunados de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta. El inmunomodulador y la vacuna se administraron casi juntos cerca de un ganglio linfático (cuello): dos inyecciones (una para la vacuna y la otra para el inmunomodulador). Todos los animales que recibieron la vía de inyección subcutánea fueron inyectados cerca de un ganglio linfático en la región subescapular.

10 En el Día 10 del estudio, todos los terneros de T11 fueron transportados fuera del sitio en un remolque de carga durante aproximadamente 24 horas para estresar a los terneros. En el día 11 del estudio, se administraron 20 ml de un inóculo que contenía *Mannheimia haemolytica* de manera transtraqueal a todos los animales de T11, seguido 4 horas después de 25 ml de inóculo. En el día 14 del estudio, todos los grupos, excepto T9, se mezclaron y se transportaron fuera del sitio en un remolque de ganado durante aproximadamente 24 horas para
15 estresar a los terneros. Todos los animales, excepto en el grupo NC, se mezclaron en un corral grande durante 12 a 16 horas en el Día 14 del Estudio y a continuación se devolvieron a sus corrales separados (cada animal tenía un corral separado). En el Día 15 del estudio, se administró 20 ml. de *Mannheimia haemolytica* por otra vía respiratoria a todos los grupos, excepto T9 y T11. Los animales fueron observados diariamente durante todo el estudio para detectar anomalías clínicas y la mortalidad. Todos los animales fueron negativos o tuvieron títulos
20 bajos en la selección antes de la compra de los animales. Los animales tenían títulos altos antes del tratamiento, lo que indica que los animales se convirtieron serológicamente a *Mannheimia haemolytica* antes de recibir el tratamiento.

Resultados

Los animales del grupo T8 tenían lesiones pulmonares significativamente más bajas.

25 El estudio sugiere que hay una aparición de la protección temprana (día 7) con o sin vacuna (grupos T4 y T5 en comparación con T3).

Ejemplo 5. Evaluación de la inmunidad adquirida en el ganado vacuno vacunado con vacuna comercial viva cuando se administra junto con un inmunomodulador de ADN

30 El propósito de este estudio fue determinar si la administración conjunta del inmunomodulador de ADN aumentaba la inmunidad adquirida producida por las vacunas víricas vivas modificadas (MLV).

Inmunomodulador

El inmunomodulador utilizado en este estudio fue la composición descrita anteriormente en el Ejemplo 1.

Animales de Estudio

35 72 terneros Holstein en edad de destete fueron seleccionados de un hato sin un historial actual de enfermedades respiratorias. Los 72 terneros se dividieron en seis grupos de tratamiento de 12 terneros cada uno. Se evaluó cada ternero individualmente y se determinó que gozaba de buena salud. Todos los terneros estaban libres de anticuerpos séricos contra BHV-1, BVDV tipos 1 y 2 y BRSV. Además, se encontró que todos los terneros presentaron resultados negativos en relación a anticuerpos séricos para PI-3. Posteriormente se determinó que
40 los terneros presentaron resultados negativos para la infección persistente por el virus de la diarrea viral bovina por inmunohistoquímica.

A los grupos de tratamiento se les administró la vacuna y dosis variables del inmunomodulador de ADN por vía intramuscular el día del tratamiento tal como se indica en la Tabla 5.1 a continuación. El esquema de dilución del inmunomodulador de ADN se proporciona en la Tabla 5.2. En el Día 0 del estudio, a todos los animales de los

grupos T1-T4 se les administró el inmunomodulador. Todos los animales que recibieron la vacuna fueron vacunados de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta. El inmunomodulador y la vacuna se administraron lo más cerca posible del cráneo al frente del hombro: dos inyecciones (una para la vacuna y la otra para el inmunomodulador).

5

Tabla 5.1. Planificación de Administración de Inmunomodulador y Vacuna

Grupo	Dosis Objetivo	Días de Administración de Vacuna y / o Inmunomodulador	Número de Animales
T1	MLV + Inmunomodulador (500 µg) IM	0	12
T2	MLV + Inmunomodulador (200 µg) IM	0	12
T3	MLV + Inmunomodulador (100 µg) IM	0	12
T4	MLV + Inmunomodulador (50 µg) IM	0	12
T5	MLV	0	12
T6	Sin tratamiento	NA	12
M = vacuna hemolítica <i>Mannheimia haemolytica</i> (Bovi-shield®) – vacuna respiratoria viral de 4 vías modificada en vivo IM = Vía de inyección intramuscular			

MLV = vacuna contra la enfermedad de *Mannheimia haemolytica* (Bovi-shield ©) - vacuna respiratoria viral de 4 vías viva modificada

10

IM = Vía de inyección intramuscular

Evaluación

Las pruebas inmunológicas se realizaron en muestras recolectadas de especímenes hematológicos apropiados de los terneros en los Días 0, 13, 28, 27, 34 y 41. Se realizaron mediciones de inmunidad mediada por células (CMI) para cada espécimen. Los patógenos objetivo para este estudio fueron BHV-1, BVDV 1 y 2, y BRSV. Los laboratorios utilizaron procedimientos y métodos estandarizados tal como resultó apropiado para los patógenos objetivo previamente especificados.

15

Resultados

Se determinaron los datos ajustados por modelo para los resultados de CMI en cada Día de recolección de muestras entre todos los grupos de tratamiento. En todos los grupos de tratamiento, tipos de células y antígenos, no se detectaron diferencias estadísticas ($P > 0,10$) cuando se compararon los grupos de tratamiento con inmunomoduladores de ADN - combinaciones de vacunas LV con bovinos que recibieron solo la vacuna MLV. En particular, se analizaron las mediciones del índice de expresión de CD25 EI en los cinco tipos de células para cada uno de los 6 grupos de tratamiento, las mediciones del índice de expresión de IFN γ en los cinco tipos de células para cada uno de los 6 grupos de tratamiento, las mediciones del índice de expresión de IL-4 en los cinco tipos de células para cada uno de los 6 grupos de tratamiento. Se produjeron estimaciones para cada uno de los 4 patógenos virales de BRD. Para estas evaluaciones estadísticas, todas las comparaciones se realizaron con el grupo de tratamiento "MLV solamente".

20

25

Se detectaron interacciones estadísticamente significativas ($P < 0.10$) de tratamiento x Día para BVDV 1 (Días 28 y 35) y BVDV 2 (Día 42). No se detectaron hallazgos significativos ($P > 0.10$) para BHV-1 en ninguno de los puntos de tiempo enumerados. Los datos de BRSV se eliminaron del análisis debido a la observación de la seroconversión de anticuerpos dentro del grupo de tratamiento de control negativo. Debe tenerse en cuenta que, para todas las evaluaciones estadísticas, se hicieron todas las comparaciones con el grupo de tratamiento "MLV solamente".

30

Los pesos individuales de los animales también se recogieron durante el estudio. No se detectaron hallazgos significativos ($P > 0,10$) en los grupos de tratamiento en comparación con el grupo de MLV solamente.

35

En resumen, el inmunomodulador de ADN no mejoró el CMI cuando se administró junto con una vacuna de MLV en comparación con la administración única de la vacuna MLV. Sin embargo, 500 µg del inmunomodulador de ADN pueden aumentar la inmunidad humoral cuando se coadministran con una vacuna de MLV (específicamente BVDV). Sin embargo, debe observarse que, a pesar de la falta de una mejora constante en la inmunidad adquirida, la administración conjunta del inmunomodulador de ADN, en dosis de 500 µg, 200 µg, 100 µg y 50 µg, no afectó los efectos inmunológicos positivos inducidos por la vacuna de MLV. Además, el rendimiento (por ejemplo, ADG) no se vio afectado negativamente por la administración del inmunomodulador de ADN.

Ejemplo 6. Evaluación de la inmunidad adquirida en el ganado vacuno vacunado con vacuna comercial cuando se administra de forma conjunta con un inmunomodulador de ADN

El propósito de este estudio fue determinar si la administración conjunta del inmunomodulador de ADN aumentaba la inmunidad adquirida producida por las vacunas que contienen antígenos inactivados.

Inmunomodulador

El inmunomodulador utilizado en este estudio fue la composición descrita anteriormente en el Ejemplo 1.

Animales de estudio

48 hembras Holstein de terneras de 3 a 5 meses de edad fueron seleccionadas de una manada sin un historial actual de enfermedades respiratorias. Los 48 bovinos fueron divididos en seis grupos de tratamiento de 8 animales cada uno. Cada animal individual fue evaluado y se determinó que gozaba de buena salud. Todos los animales estaban libres de anticuerpos séricos contra BHV-1, BVDV tipos 1 y 2. También se determinó que los animales eran negativos para la infección persistente por el virus de la diarrea vírica bovina por PCR. Los animales no se seleccionaron en títulos de SNT contra el virus BRS y el virus PI3.

A los grupos de tratamiento se les administró la vacuna y dosis variables del inmunomodulador de ADN por vía intramuscular el día del tratamiento como se indica en la Tabla 5.1 a continuación. La vacuna contenía BHV1 y BVDV tipo 1 y 2 como antígenos inactivados, y virus PI3 y virus BRS vivos modificados. El inmunomodulador y la vacuna se administraron por separado en el mismo lado del cráneo del animal al frente del hombro, o por separado en el lado opuesto del animal en la misma región, o se mezclaron en una jeringa. El esquema de dilución del inmunomodulador de ADN se proporciona en la Tabla 5.2.

Tabla 6.1. Planificación de Administración de Inmunomodulador y Vacuna

Grupo	Dosis Objetivo	Días de Administración de Vacuna y / o Inmunomodulador	Número de Animales
T1	Placebo (Dextrosa al 5%)	0	8
T2	Vacuna + Dextrosa IM, por separado	0	8
T3	Vacuna + Inmunomodulador (20 µg) IM, mezclado	0	8
T4	Vacuna + Inmunomodulador (200 µg) IM, mezclado	0	8
T5	Vacuna + Inmunomodulador (20 µg) IM, mismo lado, por separado	0	8
T6	Vacuna + Inmunomodulador (20 µg) IM, lado opuesto, por separado	0	8
Vacuna = vacuna respiratoria viral combinada viva de 4 vías (inactivada y modificada viva) (Rispoval®) IM = Vía de inyección intramuscular			

Evaluación

Las pruebas inmunológicas se realizaron en muestras recolectadas de especímenes hematológicos apropiados del ganado en los Días 0, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20, 23 y 27. Los patógenos objetivo para este estudio fueron BHV-1, BVDV 1 y 2. Para información también se determinaron los títulos de anticuerpos contra el virus BRS y el

virus PI3. Los laboratorios utilizaron Pruebas de Neutralización de Suero (SNT) estandarizadas como procedimientos para los patógenos objetivo previamente especificados.

Resultados

5 Se detectaron interacciones estadísticamente significativas ($P < 0.010$) tratamiento x Día para BHV1 (Día 27). No se detectaron hallazgos significativos ($P > 0,10$) para todos los demás puntos de tiempo para BHV1 y para BVDV tipo 1 en 2 en ninguno de los puntos de tiempo enumerados. Los resultados de los títulos de BRSV y PI3 no se evaluaron más a fondo porque los animales no eran serológicamente negativos al comienzo del estudio. Por lo tanto, no se pudo verificar un efecto del tratamiento. Debe tenerse en cuenta que, para todas las evaluaciones estadísticas, todas las comparaciones se realizaron con el grupo de tratamiento "Vacuna y Dextrosa al 5%".

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunomoduladora, en que la composición inmunomoduladora comprende:
 - a. un vehículo de liberación de liposomas catiónicos que comprende [1- [2- [9- (Z) - octadecenoyloxi]] etil - 2- [8] (Z) -heptadecenil] -3- [2-hidroxietyl] imidazolinio cloruro (DOTIM) y colesterol; y
 - b. una molécula de ácido nucleico, en que la molécula de ácido nucleico es un vector de plásmido de ADN no codificado aislado derivado de bacterias sin un injerto genético.

para su utilización en el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina (BRD) provocada por la *Mannheimia haemolytica* en el ganado vacuno.
2. La composición para su utilización de la reivindicación 1, en que el vehículo de administración de liposomas comprende lípidos seleccionados del grupo que consiste en lípidos de vesículas multilamelares y lípidos extruidos.
3. La composición para su utilización de las reivindicaciones 1 a 2, en que las señales clínicas de lesiones en el pulmón y / o aumento de temperatura se reducen.
4. La composición para su utilización de las reivindicaciones 1 a 3, para administración seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, por pulverización / aerosol, oral, intraocular, intratraqueal e intranasal.
5. La composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 4, en que la composición del inmunomodulador se administra de forma subcutánea al ganado.
6. La composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 4, en que la composición del inmunomodulador se administra de forma intramuscular al ganado.
7. La composición para su utilización de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en que la composición comprende además un agente biológico que se selecciona del grupo que consiste en proteínas potenciadoras del sistema inmune, inmunógenos, vacunas, antimicrobianos y cualquier combinación de los mismos.
8. La composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 1 en que la composición inmunomoduladora comprende de 0.1 µg a 10 µg de vector de plásmido de ADN no codificante combinado con 8 nmol de vehículo de administración de liposoma.
9. La composición para su utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para mejorar la respuesta inmune adquirida de un animal al que se administra una vacuna.
10. La composición para su utilización de la reivindicación 9, en que la composición del inmunomodulador se coadministra con la vacuna o se administra después, antes o se mezcla con la vacuna.