



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 119**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)	A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)	A61K 39/295 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 39/116 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)	C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)	C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03759205 .2**

96 Fecha de presentación : **27.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1551451**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

54

Título: **Uso de toxina termolábil de *Escherichia coli* como adyuvante en aves de corral.**

30

Prioridad: **27.08.2002 US 406359 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2009

73

Titular/es: **Dow AgroSciences L.L.C.**
9330 Zionsville Road
Indianapolis, Indiana 46268-1054, US

72

Inventor/es: **Miller, Timothy, J. y**
Fanton, Matthew, J.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 320 119 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

Uso de toxina termolábil de *Escherichia coli* como adyuvante en aves de corral.

5 La presente invención se refiere generalmente al campo de la inmunología y proporciona composiciones adyuvantes y métodos útiles para vacunar pollos de engorde contra patógenos mucosales. La invención se refiere particularmente al uso de plantas genéticamente modificadas que producen péptidos, proteínas y adyuvantes inmunogénicos.

10 La vacunación oral se ha visto desde hace mucho tiempo como un método cómodo y no traumático para administrar vacunas. Las vacunas comestibles son particularmente atractivas para la industria de la salud animal debido a que idealmente combinarían la comodidad de la medicación con prácticas de alimentación establecidas en animales. A pesar del éxito de las vacunas orales para la poliomielitis desde los 1960, ha existido muy poca comercialización de vacunas orales, especialmente vacunas que utilizan antígenos no viables para estimular la respuesta inmunitaria. Las plantas transgénicas proporcionan un medio para fabricar económicamente antígenos para vacunas comestibles. El primer trabajo presentado en este campo se encuentra en las Patentes de EE. UU. número 5.654.184, 5.679.880 y 5.686.079. Tales plantas transgénicas proporcionan el medio para combinar las características de utilizar prácticas de alimentación de animales aceptadas con la comodidad del aporte oral del antígeno a tejido mucosal para la vacunación.

20 Para que una vacuna comestible sea satisfactoria, el ambiente complejo del tracto digestivo debe gobernarse. El tejido linfóide asociado a la mucosa (MALT, por sus siglas en inglés) que está presente en los tractos digestivo, respiratorio y reproductor de los vertebrados es uno de los sistemas inmunitarios más diversos, y sin embargo universales, de la naturaleza. Cualquier antígeno capaz de estimular una respuesta inmunitaria en el tracto digestivo a través de tejido linfático asociado con el intestino (GALT, por sus siglas en inglés) encuentra un ambiente compuesto cuando entra en el tracto digestivo. La cavidad oral y otros órganos digestivos contienen una amplia serie de pH, enzimas, detergentes y microorganismos comensales que contribuyen a la digestión del alimento.

30 Los microorganismos comensales a menudo son más numerosos que el número de células que constituyen el propio tracto digestivo. Savage, D. 1999. Mucosal Microbiota. Mucosal Immunity, eds (P. Orga, J. Mestecky, M. Lamm, W. Strober, J. Biennenstock, J. McGhee) Academic Press, Inc. pp 19-30. A pesar de este hecho, estos microorganismos comensales proporcionan una función útil y están en un estado constante de "tolerancia" mediante el sistema inmunitario del GALT. Los antígenos entran en competición con componentes alimenticios y otros componentes ambientales que se han ingerido y están en diversas fases de digestión. El sistema inmunitario debe inspeccionar continuamente los tractos digestivo, así como respiratorio y reproductor, con respecto a antígenos extraños frente a propios, incluyendo antígenos alimentarios, que tienen características de propios ya que son tolerados inmunológicamente. Finalmente, una barrera inmunitaria innata compuesta por epitelio ciliado y folicular revestido con moco que tiene mecanismos de transporte tanto pasivos como activos está en un flujo constante para ajustarse a los componentes nutricionales y proporcionar secreciones necesarias a la superficie mucosal.

40 A pesar del ambiente complejo del tracto digestivo, una cantidad muy pequeña de material biológicamente activo (activo para el intestino) puede inducir una respuesta inmunitaria. Dos de los estimulantes inmunitarios más potentes del sistema mucosal, la toxina termolábil (LT, por sus siglas en inglés) procedente de *Escherichia coli* (*E. coli*) y la toxina del cólera (CT, por sus siglas en inglés) procedente de *Vibrio cholera* (*V. cholera*), pueden estimular una respuesta serológica con solo unos pocos microgramos cuando se administran mediante sonda oral. Isaka, M. *et al.*, 1998, Vaccine 16: 1620-1626; Rappuoli, R., *et al.*, 1999; Immunol. Today. 20: 493-499; e Isaka, M., *et al.*, 2000, Vaccine 18: 743-751. Así, la superficie mucosal puede abrirse satisfactoriamente y con pequeñas cantidades de una proteína biológicamente activa tal como LT y CT. Sin embargo, debido a su actividad toxigénica enteropática, LT y CT no se han propuesto como adyuvantes orales para uso seguro en seres humanos o animales en sus formas naturales.

50 Una de las características principales de proteínas mucosalmente activas como CT y LT, en oposición a un antígeno no viable, es que CT y LT son ligandos para un receptor intestinal (gangliósido GM1) que permite la entrada (invasividad) de estas toxinas en pequeñas concentraciones. Esto está en contraste con un antígeno no viable que no tiene calidad invasiva y se diluye y se somete al ambiente digestivo del intestino. El dogma apoya que un antígeno no invasivo requiere altas dosis (cantidades de miligramos) con múltiples administraciones para estimular una respuesta inmunitaria a través de la superficie mucosal del intestino. Sin embargo, probablemente, la alta dosis y las múltiples administraciones de antígeno se requieren para saturar el ambiente digestivo. Puesto que la mayoría del antígeno es degradado o absorbido, puede requerirse una cantidad muy pequeña de antígeno para examinar y estimular una respuesta inmunitaria adquirida.

60 Debido a que la LT y la CT son tan patógenas, han sido el objeto de investigación bioquímica y genética sustancial destinada a reducir o eliminar sus propiedades patógenas mientras se conserva su actividad adyuvante. La LT y la CT exhiben estructura proteínica terciaria análoga ya que ambas están compuestas por una subunidad "B" oligómera (LT-B y CT-B, respectivamente) que tiene especificidad para receptores de gangliósido G1 y una sola subunidad "A" (LT-A y CT-A, respectivamente) que tiene actividad de ADP ribosil transferasa. La investigación que implica a la LT ha producido numerosos análogos que se han probado con respecto a sus propiedades inmunogénicas y adyuvantes en mamíferos. Se han elaborado varios análogos de la toxina LT mediante sustituciones y delecciones de aminoácidos en la subunidad "A" para atenuar la actividad enteropática sin reducir las propiedades adyuvantes de la toxina (Ghiara *et al.*, 1997, Infect. Immun., 65:4996-5002). Sin embargo, existe poca información sobre el uso de tales toxinas en aves bien como adyuvantes o bien como inmunógenos.

ES 2 320 119 T3

Hoshi *et al.*, 1995. *Vaccine*, 13: 245-252 y Meinersmann *et al.*, 1993. *Avian Dis.*, 37: 427-432, presentaron que la administración oral de CT en especies aviarias no incrementaba respuestas humorales sistémicas y mucosales hacia toxoide del tétanos o virus inactivado de la enfermedad bursal infecciosa. Takeda *et al.*, 1996. *Vet. Microbiol.*, 50: 17-25 demostraron que la administración intranasal y subcutánea de CT-B era capaz de potenciar la respuesta humoral hacia el virus de la enfermedad de Newcastle. Además, Vervelde *et al.*, 1998. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 62: 261-272 presentaron que la aplicación quirúrgica intrainestinal de CT en pollos incrementaba la respuesta humoral a antígeno de *Eimeria* de aplicación quirúrgica intrainestinal. Por lo tanto, se concluía que la CT no producía efectos adyuvantes con administración oral en aves aun cuando la administración quirúrgica de CT al intestino demostrara unión al epitelio intestinal.

Basándose en una gran cantidad de bibliografía relativa a los efectos enteropáticos y adyuvantes de LT y CT en una amplia variedad de mamíferos, se anticipó que se observarían efectos similares en aves. Fue bastante inesperado descubrir que los pollos de engorde no presentaban síntomas de diarrea u otros efectos enteropáticos mientras que sin embargo se producía una respuesta inmunológica con la administración oral de toxina LT y CT natural presentada en una variedad de formatos que variaban de toxina purificada a toxina producida por plantas *in situ*.

E. coli enteropatógena que expresa toxina termolábil no se ha descrito para aves de corral, ni tiene el uso de la LT como inmunógeno o adyuvante mucosal. Las aves de corral tienen la capacidad de ser inmunizadas a una edad joven en virtud, en parte, de un órgano de diferenciación de células B (bolsa de Fabricius) que es activo antes de la eclosión. Dibner, J. J. *et al.*, 1998. *Applied Poultry Research* 7: 427-436. Así, las aves inmunizadas con un día de edad tienen una carga reducida de alimento, microorganismos y enzimas digestivas en el intestino para competir con o degradar un antígeno no viable.

Los estudios descritos en esta memoria descriptiva demuestran que la LT y la LT-B naturales inducen respuestas serológicas detectadas en IgG sérica en tan poco como 21 días después de la inoculación de la toxina mediante las rutas bien intranasal (IN), bien subcutánea, bien in ovo o bien oral. De un modo similar, células NT-1 de tabaco transgénico que expresan LT-B de secuencia natural y un análogo de LT-A atenuado inducen respuestas serológicas a través de las rutas tanto oral como IN sin efectos adversos provocados por la toxina o por el material de la planta. Por otra parte, se encontró inesperadamente que cuando la LT natural se administraba mediante las rutas bien oral o bien subcutánea no era patógena para pollos de engorde cuando se suministraba a dosis superiores a las que se presentaba que eran letales en ratones y enteropatógenas en seres humanos.

La invención puede resumirse como una composición que comprende una cantidad adyuvante de una proteína seleccionada del grupo que consiste en toxina termolábil (LT, por sus siglas en inglés) de *E. coli* y análogos de toxina termolábil (análogos de LT, por sus siglas en inglés) de *E. coli* para el uso como un adyuvante cuando se vacunan pollos de engorde. La invención consiste además en métodos para vacunar pollos de engorde que comprenden administrar una cantidad adyuvante de cualquiera de las composiciones reivindicadas a un pollo de engorde, especialmente cuando tales composiciones son producidas por una planta transgénica y/o se administran en la forma de material de planta transgénica procesado o no procesado.

Figura 1. Mapa de pSLT107 usado para transformar células NT-1. Los límites izquierdo y derecho del T-DNA delimitan el DNA que ha de transferirse a células de planta, y flanquean casetes de expresión para LT-A-R72 con transcripción conducida por promotor 35S de CaMV doblemente potenciado y terminada por la región 3' de *pin2* de patata; LT-B con transcripción conducida por el promotor 35S de CaMV doblemente potenciado y terminada por la región 3' de *vspB* de soja; y *npt2* para la selección de plantas resistentes a kanamicina. Además, apréciase que pSLT101, pSLT102 y pSLT105 usados para transformar células NT-1 descritos en los ejemplos son idénticos a pSLT107 en todos los aspectos excepto para la región codificante de LT-A. El vector pSLT102 codificaba el mutante de LT-A K63, el vector pSLT105 codificaba el mutante de LT-A G192 y el vector pSLT107 codificaba el mutante de LT-A R72 descrito en Rappuoli *et al.*, 1999. *Immunol. Today*, 20, 493-500. El vector pSLT101 codificaba la LT completamente natural biológicamente equivalente a LT derivada de *E. coli*.

Un inmunógeno es una sustancia no propia que provoca una respuesta inmunitaria humoral y/o celular en animales sanos de modo que el animal se protege contra la exposición futura al inmunógeno. Los inmunógenos son típicamente patógenos tales como virus, bacterias y hongos que pueden hacerse de algún modo no patógenos. Los inmunógenos también pueden ser porciones antigénicas de patógenos tales como componentes de la pared celular, proteínas de la cubierta viral y proteínas secretadas tales como toxinas y enzimas, por nombrar solo unos pocos. Los inmunógenos también incluyen células recombinantes, tales como células de planta, y extractos de tales células que se han manipulado para expresar y presentar antígenos inmunoprotectores.

Vacunación y vacunar se define como un medio para proporcionar protección contra un patógeno al inocular a un huésped con una preparación inmunogénica de agente patógeno, o una de sus formas o partes no virulentas, de modo que el sistema inmunitario del huésped se estimule y prevenga o atenúe reacciones subsiguientes del huésped a exposiciones posteriores del agente patógeno.

Administración o administrar se define como la introducción de una sustancia en el cuerpo de un animal e incluye las rutas oral, nasal, ocular, rectal, *in ovo* y parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea). Las rutas de administración más preferidas de acuerdo con la presente invención son la administración oral y/o nasal, ambas de las cuales pueden alcanzar la mucosa intestinal, e *in ovo*. La administración oral es la más altamente preferida.

ES 2 320 119 T3

Una cantidad eficaz o inmunoprotectora se define como aquella cantidad o masa de una sustancia que produce la consecuencia deseada de protección contra una inducción patógena. Las cantidades eficaces serán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de los datos y la información proporcionados en esta memoria descriptiva.

5 Para los propósitos de esta memoria descriptiva, un adyuvante es una sustancia que acentúa, incrementa o potencia la respuesta inmunitaria a un inmunógeno o antígeno. Los adyuvantes típicamente potencian la respuesta inmunitaria tanto humoral como celular, pero se califica que una respuesta incrementada a cualquiera en ausencia de la otra define a un adyuvante. Por otra parte, los adyuvantes y sus usos son bien conocidos para los inmunólogos y se emplean típicamente para potenciar la respuesta inmunitaria cuando las dosis de inmunógeno son limitadas o cuando el inmunógeno es escasamente inmunogénico o cuando la ruta de administración es subóptima. Así, el término “cantidad adyuvante” es aquella cantidad de adyuvante capaz de potenciar la respuesta inmunitaria a un inmunógeno o antígeno dado. La masa que es igual a una cantidad adyuvante variará y depende de una variedad de factores incluyendo, pero no limitados a, las características del inmunógeno, la cantidad de inmunógeno administrada, la especie del huésped, la ruta de administración y el protocolo para administrar el inmunógeno. La cantidad adyuvante puede cuantificarse fácilmente mediante experimentación habitual dado un grupo particular de circunstancias. Esto está totalmente dentro de la esfera de los expertos normales y típicamente emplea el uso de determinaciones habituales de respuesta a la dosis a cantidades variables de inmunógeno y adyuvante administrados. Las respuestas se miden al determinar concentraciones de anticuerpo en suero producidas en respuesta al inmunógeno usando ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas, radioinmunoensayos, ensayos de hemaglutinaciones y similares.

20 En el caso de la LT, una cantidad considerable de mamíferos de trabajo ha establecido que cantidades de submicrogramos por kilogramo no solo provocan una fuerte respuesta inmunitaria sino que también producen patología. Los más sorprendentemente, no se mostraba que este fuera el caso en pollos de engorde debido a que ni siquiera hasta 10 mg/kg de LT natural administrada oralmente producían signos de patología y sin embargo todavía producían una respuesta inmunitaria sustancial en forma de altas concentraciones de IgG en suero. Esto está en contraste con estudios que muestran que la CT y el antígeno implantados quirúrgicamente provocaban una respuesta inmunitaria en ausencia de patología (Vervelde *et. al.*, 1998. *Supra*) mientras que la CT-B era capaz de producir una repuesta inmunitaria pero no patología (Takeda *et. al.*, 1996. *Supra*).

30 La toxina termolábil (LT, por sus siglas en inglés) de *E. coli* se ha caracterizado bien mediante cristalografía de rayos X y consiste en una proteína multímera. La holotoxina incluye una subunidad “A” (LT-A) de peso molecular 27.000 daltons que es segmentada en LT-A1 y LT-A2 por las proteasas en el intestino delgado. La holotoxina también contiene cinco subunidades “B” (LT-B), de peso molecular 11.600 daltons cada una, que están conectadas no covalentemente en una estructura pentámera toroidal muy estable. Se prefiere la LT natural procedente de cualquier fuente.

40 Los análogos de toxina termolábil (análogos de LT, por sus siglas en inglés) de *E. coli* se definen como cualquier LT natural conocida en la que uno o más aminoácidos se han sustituido, y se presentan en la bibliografía. Varios análogos de LT bien conocidos son aquellos en los que los residuos encontrados naturalmente en las posiciones 63, 72 y 192 de la subunidad alfa se sustituyen por lisina, arginina y glicina, respectivamente (K63, R72 y G192). Rappuoli, *et. al.*, 1999. *Immunol. Today*, 20, 493-500. La LT y los análogos de LT biológicamente activos se unen a gangliósido GM1 en un formato de ELISA, y son tóxicos para células adrenales Y1 para pruebas de citotoxicidad celular *in vitro*.

45 Las aves son susceptibles de una amplia variedad de enfermedades para las que la presente invención proporciona vacunación protectora. Lo siguiente es una lista de algunas de las enfermedades aviares más importantes comercialmente cuyos agentes causales representan inmunógenos que son compatibles con la presente invención. Esta lista no representa de ningún modo una lista exhaustiva de enfermedades aviares aplicables a la presente invención. Enfermedad de Newcastle, influenza aviar, enfermedad bursal infecciosa, coccidiosis, enteritis necrótica, aerosaculitis, celulitis, anemia del pollo, laringorinotraqueitis, bronquitis infecciosa y enfermedad de Marek. Un grupo preferido de inmunógenos que proporcionan protección contra enfermedades aviares y están de acuerdo con la presente invención son determinantes antigénicos del virus de la enfermedad de Newcastle, la proteína de hemaglutinina neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, determinantes antigénicos del virus de la influenza aviar, la proteína de hemaglutinina del virus de la influenza aviar.

55 Numerosos métodos son bien conocidos en la técnica para producir cantidades de polipéptidos y proteínas, incluyendo LT-A, LT-B, LT y análogos de LT, relativamente puros. Sistemas bacterianos y de levadura para producir polipéptidos y proteínas recombinantes se han puesto en práctica durante décadas. Más recientemente, se han desarrollado sistemas de producción de proteínas transgénicas que se basan en células de insecto, vertebrado, mamífero o planta como el vehículo de producción. La producción de un adyuvante tal como LT, y opcionalmente la coexpresión con un inmunógeno de elección, en una planta transgénica es particularmente adecuada para la presente invención debido a que el material de la planta transgénica puede procesarse directamente y darse a las aves como una vacuna o administrarse intranasalmente.

65 Planta transgénica se define en la presente memoria como un cultivo celular de planta, una línea celular de planta, una planta o una progenie de la misma derivada de una célula, un tejido o un protoplasto de planta transformada, en donde el genoma de la planta transformada contiene DNA extraño exógeno, introducido mediante técnicas de laboratorio, no presente originalmente en una planta no transgénica natural de la misma cepa. Los términos “planta transgénica” y “planta transformada” se han usado a veces en la técnica como términos sinónimos para definir una

planta cuyo DNA contiene una molécula de DNA exógena. También se incluyen en esta definición plantas que se han transformado transitoriamente con DNA heterólogo a través de sistemas vectoriales virales que no producen episodios transgénicos integrados. Esta tecnología es bien conocida en la técnica, según se representa en parte mediante las Patentes de EE. UU. Número 5.846.795 y 5.500.360.

5

Un grupo preferido de plantas para el uso en la práctica de la presente invención son cultivos celulares de plantas, patata, tomate, alfalfa y lenteja de agua. Un grupo más preferido son los cultivos celulares de planta y el tomate, y los cultivos celulares de planta son los más preferidos. Cultivos celulares de planta preferidos incluyen cultivos derivados tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas. Cultivos celulares de plantas particularmente preferidos son los cultivos celulares de tabaco denominados NT-1 y BY-2 descritos por Toshiyuki *et al.*, 1992. *Int'l Rev. of Cytology*, 132, 1-30.

10

Existen muchos métodos bien conocidos en la técnica para introducir segmentos de DNA transformantes en células, pero no todos son adecuados para aportar DNA a células de planta. Se cree que los métodos adecuados incluyen virtualmente cualquier método mediante el cual pueda introducirse DNA en una célula, tal como mediante infección con *Agrobacterium*, aporte directo de DNA, por ejemplo mediante transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulleh *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 21:415-428, 1993.), mediante captación de DNA mediada por desecación/inhibición, mediante electroporación, mediante agitación con fibras de carburo de silicio, mediante aceleración de partículas revestidas con DNA, etc. En ciertas realizaciones, se prefieren los métodos de aceleración e incluyen, por ejemplo, bombardeo con microproyectiles y similares.

15

20

La tecnología para introducir DNA en células es bien conocida por los expertos en la técnica. Se han descrito cuatro métodos básicos para aportar DNA extraño a células de planta. Métodos químicos (Graham y van der Eb, *Virology*, 54(02):536-539, 1973; Zatloukal, Wagner, Cotten, Phillips, Plank, Steinlein, Curiel, Birnstiel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:136-153, 1992); Métodos físicos incluyendo microinyección (Capecchi, *Cell*, 22(2):479-488, 1980), electroporación (Wong y Neumann, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 107(2):584-587, 1982; Fromm, Taylor, Walbot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(17):5824-5828, 1985; Pat. de EE. UU. N° 5.384.253) y la pistola génica (Johnston y Tang, *Methods Cell. Biol.*, 43(A):353-365, 1994; Fynan, Webster, Fuller, Haynes, Santoro, Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(24):11478-11482, 1993); Métodos virales (Clapp, *Clin. Perinatol.*, 20(1):155-168, 1993; Lu, Xiao, Clapp, Li, Broxmeyer, *J. Exp. Med.* 178(6):2089-2096, 1993; Eglitis y Anderson, *Biotechniques*, 6(7):608-614, 1988; Eglitis, Kantoff, Kohn, Karson, Moen, Lothrop, Blaese, Anderson, *Avd. Exp. Med. Biol.*, 241:19-27, 1988); y Métodos mediados por receptores (Curiel, Agarwal, Wagner, Cotten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(19):8850-8854, 1991; Curiel, Wagner, Cotten, Birnstiel, Agarwal, Li, Loechel, Hu, *Hum. Gen. Ther.*, 3(2):147-154, 1992; Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (13):6099-6103, 1992).

25

30

35

La introducción de DNA en células de planta por medio de electroporación es bien conocida por los expertos en la técnica. Enzimas que degradan la pared celular de la planta, tales como enzimas que degradan pectina, se usan para hacer a las células receptoras más susceptibles de transformación mediante electroporación que las células no tratadas. Para efectuar la transformación mediante electroporación, pueden emplearse tejidos friables tales como un cultivo en suspensión de células, o un callo embriogénico, o embriones inmaduros u otros tejidos organizados directamente. Generalmente es necesario degradar parcialmente las paredes celulares del material de planta elegido con enzimas que degradan pectina o lesionando mecánicamente de manera controlada. Tal material de planta tratado está listo para recibir DNA extraño mediante electroporación.

40

45

50

55

60

65

Otro método para aportar DNA transformante extraño a células de planta es mediante bombardeo con microproyectiles. En este método, las micropartículas se revisten con DNA extraño y se aportan al interior de las células mediante una fuerza propulsora. Tales micropartículas están hechas habitualmente de volframio, oro, platino y metales similares. Una ventaja del bombardeo con microproyectiles es que no se requiere ni el aislamiento de protoplastos (Cristou *et al.*, 1988, *Plant Physiol.*, 87:671-674) ni la susceptibilidad a la infección con *Agrobacterium*. Una realización ilustrativa de un método para aportar DNA a células de maíz mediante aceleración es un sistema de aporte de partículas biolístico, que puede usarse para impulsar partículas revestidas con DNA o células a través de un tamiz sobre una superficie filtrante cubierta con células de maíz cultivadas en suspensión. El tamiz dispersa las partículas de modo que no se aporten a las células receptoras en grande agregados. Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran preferiblemente sobre filtros o medio de cultivo sólido. Alternativamente, embriones inmaduros u otras células diana pueden disponerse sobre un medio de cultivo sólido. Las células que han de bombardearse se sitúan a una distancia apropiada por debajo de la placa de detención de macroproyectiles. En la transformación por bombardeo, pueden optimizarse las condiciones de cultivo previas al bombardeo y los parámetros del bombardeo para dar los números máximos de transformantes estables. Los parámetros tanto físicos como biológicos para el bombardeo son importantes en esta tecnología. Los factores físicos son los que implican manipular el precipitado de DNA/microproyectiles o los que afectan a la trayectoria y la velocidad de cualquiera de los microproyectiles. Factores biológicos incluyen todas las etapas implicadas en la manipulación de las células antes e inmediatamente después del bombardeo, el ajuste osmótico de las células diana para ayudar a aliviar el trauma asociado con el bombardeo, y también la naturaleza del DNA transformado, tal como DNA linealizado o plásmidos superenrollados intactos.

La transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para introducir DNA extraño en células de planta debido a que el DNA puede introducirse en tejidos de plantas enteras, eliminando la necesidad de regenerar una planta intacta a partir de un protoplasto. El uso de vectores de integración en plantas mediada por *Agrobacterium* para introducir DNA en células de planta es bien conocido en la técnica. Véanse, por ejemplo, los

ES 2 320 119 T3

métodos descritos en Fraley *et al.*, 1985, *Biotechnology*, 3:629; Rogers *et al.*, 1987, *Meth. in Enzymol.*, 153:253-277. Por otra parte, la integración del Ti-DNA es un procedimiento relativamente preciso que da como resultado pocas reordenaciones. La región de DNA que ha de transferirse está definida por las secuencias límite, y DNA intermedio se inserta habitualmente en el genoma de la planta según se describe en Spiehmman *et al.*, 1986, *Mol. Gen. Genet.*, 205:34; Jorgensen *et al.*, 1987, *Mol. Gen. Genet.*, 207:471.

Los vectores de transformación con *Agrobacterium* modernos son capaces de replicación en *E. coli* así como *Agrobacterium*, permitiendo manipulaciones cómodas como las descritas (Klee *et al.*, 1985). Por otra parte, los recientes avances tecnológicos en vectores para transferencia génica mediada por *Agrobacterium* han mejorado la disposición de los genes y los sitios de restricción en los vectores para facilitar la construcción de vectores capaces de expresar diversas proteínas o polipéptidos. Los vectores descritos (Rogers *et al.*, 1987) tienen regiones multiconectoras convenientes flanqueadas por un promotor y un sitio de poliadenilación para la expresión directa de genes codificantes de polipéptidos insertados y son adecuados para los presentes propósitos. Además, *Agrobacterium* que contiene genes Ti tanto armados como desarmados puede usarse para las transformaciones.

La transformación de los protoplastos de planta puede alcanzarse usando métodos basados en precipitación con fosfato cálcico, tratamiento con polietilenglicol, electroporación y combinaciones de estos tratamientos (véanse, por ejemplo, Potrykus *et al.*, 1985. *Mol. Gen. Genet.*, 199:183 y Marcotte *et al.*, 1988. *Nature*, 335:454). La aplicación de estos sistemas a diferentes especies de plantas depende de la capacidad para regenerar la especie particular a partir de protoplastos.

Ejemplo 1

25 *Materiales*

La secuencia optimizada para la planta que codifica el gen LT-B de la cepa H10407 de *E. coli* se conoce en la técnica (Mason *et al.*, 1998. *Vaccine* 16:1336-1343). La secuencia optimizada para planta que codifica el gen de LT-A de la cepa H10407 de *E. coli* se describió en el documento WO/2000/37609 que originalmente se presentó como Solicitud Provisional de EE. UU. Número 60/113.507. El documento WO/2000/37609 describe la construcción de tres vectores binarios de T-DNA (pSLT102, pSLT105, pSLT107) que se usaban para transformación de células de planta mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en el Ejemplo 2. Las líneas celulares NT-1 transformadas resultantes (SLT102, SLT105 y SLT107) expresaban y acumulaban LT totalmente montada y análogos de LT comprendidos por LT-B y formas modificadas de la subunidad LT-A. La Figura 1 ilustra pSLT107, que contiene un gen de LT-A modificado que reemplaza Ala72 por Arg72. Los productos de los vectores de expresión SLT102 y SLT105 eran idénticos excepto porque contenían diferentes alteraciones en el gen de LT-A (Ser63 por Lys63 en pSLT102; Arg192 por Gly192 en pSLT105). Estas líneas contienen un número indeterminado de copias en la región de T-DNA de los plásmidos integrados establemente en el DNA cromosómico nuclear. Las células NT1 transgénicas acumulaban subunidades LT-B que se montaban en pentámeros que se unen a gangliósido, a niveles de hasta 0,4% de proteína soluble total según se determina mediante ELISA dependiente de gangliósido. Las células NT1 transgénicas también acumulaban subunidades LT-A modificadas, algunas de las cuales se montaban con pentámeros de LT-B según se determinaba mediante ELISA dependiente de gangliósido usando anticuerpos específicos para LT-A.

Además, se obtuvieron los plásmidos pQETHK, pJC217 y pCS96. pQETHK es una secuencia codificante optimizada para plantas de LTB clonada en el vector pQE60[®] de Quiagens; pJC217 (Cardenas *et al.*, 1993, *Inf. and Imm.* 61:4629-4636) que contiene la secuencia derivada de *E. coli* de LTB y la región no codificante de LTA clonada en pUC8. pCS96 expresa los genes de las subunidades tanto LTB como LTA de *E. coli*. Cada plásmido en la cepa huésped de DH5 α o JM83 de *E. coli* se hizo crecer en medio LB (Gibco/BRL) usando 50 μ g/ml de ampicilina para la selección.

Se aisló LT natural haciendo crecer 1-2 litros de pCS96 en DH5 α durante la noche en medio LB que contiene 50 μ g/ml de ampicilina. Las células se formaron como una pella usando una Heraeus Megafuge (20 minutos a 4000 rpm), se resuspendieron en 200 ml de tampón de TE (Tris 50 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM), se centrifugaron 20 minutos a 4000 rpm y se resuspendieron en 100 ml de tampón de TE y se almacenaron a -80°C. La pella resuspendida se rompió usando un somicador Branson 450 con una punta plana reemplazable en el control de salida de 8, ciclo de servicio 60, durante 10 minutos sobre hielo. Las preparaciones se centrifugaron a continuación a 10.000 rpm durante 30 minutos a 2-7°C usando una centrifuga J2-21 Beckman y un rotor JA-20 Beckman. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y se centrifugó a 20.000 rpm durante 1 hora. El sobrenadante de 20.000 rpm se transfirió a un tubo de diálisis (separación de pesos moleculares 6000-8000) y se dializó contra 2 l de TEN durante 4 días (el TEN se cambiaba diariamente). Después de la diálisis, la muestra se hizo pasar sobre una columna de afinidad de galactosa inmovilizada equilibrada con TEN a un caudal de ~10 ml/hora. La columna se lavó con varios volúmenes de columna de tampón de TEN y la LT unida se eluyó con D(+)galactosa 1 M. Las fracciones que contienen la LT se verificaron mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida), se reunieron y se almacenaron a -80°C.

ES 2 320 119 T3

Ejemplo 2

Preparación de *Nicotiana tabacum* Transgénico que Expresa LT

- 5 De 3 a 4 días antes de la transformación, un cultivo de NT-1 de 1 semana se subcultivó hasta medio reciente añadiendo 2 ml del cultivo de NT-1 en 40 ml de medio NT-1. El subcultivo se mantuvo en la oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en una batidora a 100 rpm.

10

Medio NT-1

	Reactivo	Por litro
15	Sales MS	4,3 g
	Solución de reserva de MES (20X)	50 ml
	Solución de reserva de inositol B1 (100X)	10 ml
20	Solución de reserva I de Miller	3 ml
	2,4-D (1 mg/ml)	2,21 ml
	Sacarosa	30 g
25	pH hasta $5,7 \pm 0,03$	

30

Solución de reserva de Inositol B1 (100x) (1 litro)

HCl de tiamina (Vit B1) - 0,1 g

MES (20x) (1 litro)

MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico) - 10 g

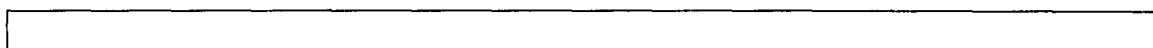
Mioinositol - 10 g

35

I de Miller (1 litro)

KH₂PO₄ - 60 g

40



45

Agrobacterium tumefaciens que contiene el vector de expresión de interés se cultivó en estrías a partir de una solución de reserva de glicerol sobre una placa de medio LB que contenía 50 mg/l de espectinomicina. El cultivo bacteriano se incubó en la oscuridad a 30°C durante 24 a 48 horas. Una colonia bien formada se seleccionó y se transfirió a 3 ml de medio YM que contenía 50 mg/l de espectinomicina. El cultivo líquido se incubó en la oscuridad a 30°C en una batidora incubadora a 250 rpm hasta que la OD₆₀₀ era 0,5-0,6. Esto llevaba aproximadamente 24 h.

50

Medio LB

Medio YM

	Reactivo	Por litro		Reactivo	Por litro
55	Bactotiptona	10 g		Extracto levadura	de 400 mg
	Extracto levadura	de 5 g		Manitol	10 g
60	NaCl	10 g		NaCl	100 mg
	Bactoagar Difco	de 15 g		MgSO ₄ •7H ₂ O	200 mg
65				KH ₂ PO ₄	500 mg

(Alternativamente, puede adquirirse YM en forma de polvo (Gibco BRL; n° de catálogo 10090-011). Para elaborar un medio de cultivo líquido, añádanse 11,1 g a 1 litro de agua).

ES 2 320 119 T3

El día de la transformación, se añadió 1 μ l de acetosiringona 20 mM por ml de cultivo de NT-1. La solución de reserva de acetosiringona se elaboró en etanol el día de la transformación. Las células NT-1 se lesionaron para incrementar la eficacia de la transformación. Para la lesión, el cultivo en suspensión se hizo subir y bajar repetidamente (20 veces) a través de una pipeta estéril de diámetro ancho de 5 ml. Cuatro mililitros de la suspensión se transfirieron a cada una de 10 placas de Petri de 60 x 15 mm. Una placa se apartó para usarla como un control no transformado. Aproximadamente 50 a 100 μ l de suspensión de *Agrobacterium* se añadieron a cada una de las 9 placas restantes. Las placas se envolvieron con Parafilm y a continuación se incubaron en la oscuridad en una batidora a 100 rpm a 25 \pm 1°C durante 3 días.

Las células se transfirieron a un tubo de centrífuga cónico estéril de 50 ml y se llevaron hasta un volumen final de 45 ml con medio NTC (medio NT-1 que contiene 500 mg/l de carbenicilina, añadidos después del tratamiento en autoclave). Se mezclaron, a continuación se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min en una centrífuga equipada con un rotor de paletas oscilantes. El sobrenadante se retiró y la pella resultante se resuspendió en 45 ml de NTC. El lavado se repitió. La suspensión se centrifugó, el sobrenadante se descartó y la pella se resuspendió en 40 ml de NTC. Partes alícuotas de 5 ml se pusieron sobre cada placa de Petri (150 x 15 mm) que contenía medio NTCB10 (medio NTC solidificado con 8 g/l de agar/agar; complementado con 10 mg/l de bialafos, añadidos después del tratamiento en autoclave). Las placas se envolvieron con Parafilm y a continuación se mantuvieron en la oscuridad a 25 \pm 1°C. Antes de transferir a la cámara de cultivo, las placas se dejaron abiertas en una campana de flujo laminar para permitir que el líquido en exceso se evaporara. Después de 6 a 8 semanas, aparecían transformantes putativos. Se seleccionaron y se transfirieron a NTCB5 (medio NTC solidificado con 8 g/l de agar/agar; complementado con 5 mg/l de bialafos, añadidos después del tratamiento en autoclave) reciente. Las placas se envolvieron con Parafilm y se cultivaron en la oscuridad a 25 \pm 1°C.

Aparecían transformantes putativos como pequeños aglomerados de callo sobre un fondo de células no transformadas muertas. Estos callos se transfirieron a medio NTCB5 y se dejaron crecer durante varias semanas. Se seleccionaron porciones de cada transformante putativo para el análisis de ELISA. Después de al menos 3 experimentos a través de ELISA, se seleccionaron las líneas con los niveles de antígeno más altos. La cantidad de material calloso para cada una de las líneas selectas se multiplicó a continuación en cultivos en placa y ocasionalmente en cultivos líquidos.

Las líneas celulares NT-1 transformadas resultantes SLT102, SLT105 y SLT107 expresaban y acumulaban la subunidad B de enterotoxina termolábil (LT-B) de *E. coli* y formas modificadas de la subunidad LT-A. Los productos de expresión procedentes de SLT102, 105 y 107 eran idénticos, excepto que contienen diferentes alteraciones en el gen de LT-A. Otra línea de NT-1, SLT101, expresaba los genes de LT-A y LT-B naturales y era equivalente en todos los aspectos a LT derivada de *E. coli*. Estas líneas contienen un número indeterminado de copias en la región de T-DNA de los plásmidos integrados establemente en el DNA cromosómico nuclear. Todas las células NT1 transgénicas acumulaban subunidades LT-B que se montaban en pentámeros que se unen a gangliósido, a niveles de hasta 0,4% de proteína soluble total según se determina mediante ELISA dependiente de gangliósido. Todas las células NT-1 transgénicas también acumulaban subunidades LT-A naturales (SLT101) o modificadas (SLT102, SLT105 y SLT107) que se montaban con pentámeros de LT-B según se determinaba mediante ELISA dependiente de gangliósido usando anticuerpos específicos para LT-A.

Ejemplo 3

Preparación del Inóculo

Tampones y Reactivos: La ampicilina se obtuvo de Sigma (Lote N° 14H0041) y se elaboró una solución de reserva de 100 mg/ml en agua estéril. La triptona se obtuvo de Fisher Biotech (Lote N° 109756JE). El extracto de levadura se obtuvo de Difco (Lote N° 132384JD). El cloruro sódico (Lote N° 49H0265), la D(+)-galactosa (Lote N° 46H03561), el MES (ácido 2-[morfolino]etanosulfónico) (Lote N° 29H54281) y el hidróxido sódico (Lote N° 30K0229) se obtuvieron de Sigma. El Coomassie Brilliant Blue G-250 se obtuvo de Bio-Rad. El metanol se obtuvo de VWR (Lote N° 38274842), el ácido acético glacial de EM Sciences, Lote N° K27260700, y el alcohol etílico, Lote N° DUO9723BU, de Aldrich Chemical. La solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) se preparó como cloruro sódico 0,14 M, fosfato potásico monobásico 1,5 mM, cloruro potásico 2,5 mM y fosfato sódico dibásico 6 mM, pH 7,2 (BRL/Gibco).

Las células NT-1 transformadas se mantuvieron como callo sobre placas de agar preparadas a partir de medio NT-1 que contiene 0,8% de agar. Los componentes del medio incluyen MES 2,5 mM, fosfato potásico dibásico (Lote N° 47H0811) 1,2 mM, mioinositol (Lote N° 49H039025) al 0,1% (p/v), HCl de tiamina (Lote N° 107H02785) al 0,001% (p/v), sales de MS (Lote N° 470803) al 0,4% (p/v), sacarosa (Lote N° 47H0803) al 3% (p/v) y agar-agar (Lote N° 390906) al 0,8% (p/v), todos de Sigma, y 2,4-D (Lote N° 107091) al 0,22% (p/v) de Gibco. Las células en suspensión así como las placas de agar también contenían 50 μ g/ml de kanamicina (Lote N° 129H08941, Sigma), como se requería para evaluar la selección con respecto al DNA recombinante transformado de NT-1. El callo se sometió a un pase cogiendo una pipeta estéril para romper el callo y transferir una pequeña cantidad del callo (0,5 cm³) a una placa reciente. Para producir cultivos en suspensión de las células NT-1, el callo se rompió con una pipeta y varios trozos del callo se transfirieron a medio NT-1 en un matraz Erlenmeyer, sin el agar, y se pusieron en una incubadora giratoria a 28-30°C. Las células se recogieron mediante varios métodos 6-12 días después del pase. Se obtuvieron células húmedas enteras manteniendo el matraz batidor estacionario para permitir que las células se sedimenten, seguido por decantación del

ES 2 320 119 T3

medio. Se obtuvieron células húmedas enteras sometidas a sonicación como se describe anteriormente al resuspender las células húmedas en tampón de extracción que contiene ascorbato sódico 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y Triton X-100 al 0,1% (todos de Sigma), preparado en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2. Las células se abrieron a continuación usando un sonicador Branson 450 con una punta plana reemplazable en el control de salida de 8, ciclo de servicio 60 durante 10 minutos sobre hielo. Sobrenadante y pella procedentes de células húmedas sometidas a sonicación se prepararon al centrifugar la preparación sometida a sonicación 20-30 min a 3400 rpm usando una centrífuga Beckman GPR. Se prepararon células secadas enteras al filtrar células húmedas enteras usando un embudo Buchner revestido con Spectramesh; las células empaquetadas se extendieron sobre una lámina de Spectramesh en una bandeja de plástico de baja altura y a continuación se pusieron en un deshidratador de alimentos durante la noche.

Para tratamientos con el alimento, las células enteras, las células secadas o las células húmedas sometidas a sonicación previamente cuantificadas con respecto al contenido de antígeno diana se pusieron directamente en las cubetas de alimentación. Sin embargo, el consumo del antígeno diana era más eficaz por parte de los polluelos de engorde si las células húmedas enteras, las células secadas o las células sometidas a sonicación se mezclaban en primer lugar con el alimento (6 gramos para polluelos de engorde de 1 día de edad) y se ponían en una sola cubeta de alimentación por jaula de "X" aves. Para la inoculación intranasal (IN), las células húmedas, las células secadas o las células sometidas a sonicación se suspendían en PBS hasta que se obtenía una consistencia para permitir el pipeteo de 25 μ l en la fosa nasal del ave. Típicamente, una relación de masa a volumen celular necesaria para la inoculación IN era 1 parte de células por 2 partes de tampón de extracción.

Ejemplo 4

25 *Administración de Vacuna y Tratamientos*

Se obtuvieron polluelos de engorde de Stover Hatchery, Stover MO. Estos polluelos son machos subproductivos o polluelos de ambos sexos criados para establecer operaciones con pollos de engorde pequeños. Los polluelos llegaron mediante correo urgente durante la noche y se pusieron inmediatamente en jaulas de cría Petersime (7 por jaula). El número de polluelos por tratamiento se basaba en un diseño completamente aleatorizado que usaba medidas repetidas. Cualesquiera polluelos en exceso se pusieron aleatoriamente en jaulas individuales y se utilizaron para reemplazar a polluelos que morían por el estrés del transporte o la confinación. Se añadió agua a voluntad inmediatamente al establecer a las aves en las jaulas. Para hacer ayunar a las aves, el alimento se retuvo durante la noche y la inoculación se realizó la mañana siguiente, o se añadió alimento a voluntad durante la noche y a continuación se retuvo por la mañana durante 5 horas y la inoculación se realizó por la tarde. Para las inoculaciones en el alimento, el antígeno derivado de planta se suspendió con una cantidad mínima de agua y a continuación se mezcló con alimento para elaborar una pasta aglutinada. El alimento se añadió a una cubeta y la cubeta se puso en la jaula para dejar acceso libre a todas las aves. Para el tratamiento con sonda, se usó una aguja de sonda de 2,54 cm (1 pulgada) fijada a una jeringa para inocular directamente al esófago o buche. La ruta de administración intranasal se realizó inoculando 25 μ l directamente en las fosas nasales. Los polluelos tenían generalmente entre 18 y 30 horas de edad en la inoculación, así, todos los experimentos clínicos comienzan con polluelos de 1 día de edad en el Día 0 del Experimento.

Ejemplo 5

45 *ELISA Cuantitativo*

Placas de ELISA de microvaloración de 96 pocillos Nunc Maxisorp se revistieron con 5 μ g/pocillo de gangliósido GM1 mixto en tampón de borato 0,01 M usando 100 μ l por pocillo; las placas se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween® (conteniendo 1 vez Tween 20 al 0,05%, Lote N° 120K0248 de Sigma). Cada pocillo se incubó a continuación a 37°C con 200 μ l tampón de bloqueo que contiene leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBS-Tween 20 al 0,05%. Los pocillos se lavaron 1 vez con 250 μ l/pocillo usando PBS-Tween 20. Antígeno de referencia y antígenos de muestra se mezclaron con tampón de bloqueo antes de añadir a las placas. Antígeno de referencia de LT y antígeno de referencia de LT-B se diluyeron hasta 50 ng/ml en el primer pocillo mientras que las muestras se prediluyeron a varias diluciones de partida diferentes. Las muestras se añadieron a la placa al aplicar 200 μ l de muestra en la fila A y 100 μ l de tampón de bloqueo en las filas restantes. Mezclar y transferir 100 μ l por pocillo formaba diluciones de 2 veces en serie. Las placas se incubaron a continuación 1 h a 37°C, se lavaron 3 veces en PBS-Tween y se añadieron 100 μ l de antisueros diluidos en tampón de bloqueo por pocillo y se incubaron 1 h a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces en PBS-Tween y a continuación se añadieron 100 μ l de conjugado de anticuerpo y se incubaron 1 h a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces en PBS-Tween y se añadieron 50 μ l de sustrato de TMB a cada placa y se añadió solución de parada de TMB a los 20 minutos después de la adición del sustrato. La densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm se determinó usando un lector de placas Tecan Sunrise. Los datos se transportaron y se presentaron usando software Tecan Magellan. Se realizaron análisis de regresión lineal y cuantificación usando Microsoft Excel 2000 versión 9.0.3821 SR-1.

65

ES 2 320 119 T3

Ejemplo 6

ELISA Sérico

5 Se recogió sangre mediante decapitación (aves de 0-7 días de edad) o mediante venipunción en la vena de la membrana alar o yugular. Las aves se sometieron a eutanasia mediante dislocación cervical o mediante exposición a CO₂ durante 1-5 minutos antes de la decapitación. La sangre se transportó desde las instalaciones para los animales hasta el laboratorio y se puso a 2-7°C durante 45 minutos para hacer avanzar y condensar el coágulo sanguíneo. Las muestras de sangre se transfirieron hasta un baño de agua a 37°C durante 10 minutos y a continuación se centrifugaron durante 20 minutos a 2500 rpm usando una centrífuga Beckman GPR a 2-7°C. El suero se retiró asépticamente de cada tubo, se extrajeron partes alícuotas de 0,5-1,5 ml hacia un criotubo (Nunc) y se almacenaron a -18°C hasta que se usaban. Para el ELISA sérico, la etapa de adsorción de gangliósido utilizaba 1,5 µg/ml con incubación durante la noche a 2-7°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween y se bloquearon con 200 µl/pocillo de leche desnatada en polvo al 3% en PBS-Tween. Para valorar el anticuerpo por muestra de suero, después de que el gangliósido se adsorba, se añaden 100 µl de LT-B o LT en 2,5 µg/ml en tampón de bloqueo por pocillo y se incuban 1 h a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween y a continuación se añadieron 200 µl de la muestra de suero diluida en tampón de bloqueo a la Fila A y se añadieron 100 µl de tampón de bloqueo a las filas restantes. La dilución de partida para el suero era 1:10 en tampón de bloqueo a no ser que se especifique otra cosa. Después de diluciones en serie de dos veces de las muestras de suero, las placas se incubaron 1 h a 37°C y a continuación se lavaron 3 veces en PBS-Tween. 10 Anti-(anticuerpo de ratón) caprino, prevalorado para la unión óptima, y cromagén se añadieron y se incubaron 1 h a 37°C. Las placas se lavaron y se añadieron 100 µl de ABTS y se incubaron hasta que la dilución inicial del control positivo proporcionaba una absorbancia de 0,7 a 1,0 a una longitud de onda doble de 405/492 usando un lector de placas Tecan Sunrise™.

25 Los datos se transportaron y se presentaron usando software Tecan Magellan. Se realizaron análisis de regresión lineal y cuantificación usando Microsoft Excel 2000 versión 9.0.3821 SR-1. La concentración media geométrica (GMT, por sus siglas en inglés) se determinó para cada grupo de tratamiento usando Microsoft Excel 2000 versión 9.0.3821 SR-1. Las concentraciones de ELISA de fondo de <10 daban un valor de 1 para estos cálculos. La diferencia en medias por mínimos cuadrados para aves tratadas con respecto a los controles se determinó usando análisis de mínimos cuadrados. Un tratamiento se hacía pasar como eficaz si existía una diferencia significativa de un grupo de tratamiento con el grupo de control no inducido no vacunado.

Ejemplo 7

Ensayo de Células Adrenales Y1

Células adrenales Y1 procedentes de ratones se adquirieron de ATCC (CCL-79, L N° 1353400). El vial celular se descongeló a 37°C y se puso en un matraz T de 25 cm² (Corning) que contenía 10 ml de medio de crecimiento que consistía en suero de caballo donante (Quad-5 L N° 2212) al 15%, suero bovino fetal (JRH L N° 7N2326) al 2,5%, glutamax-1 (Gibco L N° 1080323) al 1% en medio F-12K (Gibco L N° 1089716). Las células se incubaron a 37°C en CO₂ al 5%. Las células se mantuvieron en este medio de crecimiento en cada pase y para ensayos de citotoxicidad de LT y CT. Para el ensayo, las células se someten a pases sobre placas de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc) y se deja que alcancen 80% de confluencia. La toxina LT o CT se diluye hasta 1 µg/ml en medio de crecimiento F-12K. 45 La toxina se diluye adicionalmente mediante diluciones en serie de dos veces sobre una placa de microvaloración de 96 pocillos al añadir 100 µl de la muestra prediluida a la fila A de la placa. Se realizan a continuación diluciones en serie de dos veces al transferir 50 µl de la muestra de la fila A a 50 µl de medio de crecimiento en el siguiente pocillo. Cada dilución de la muestra se transfiere a 1-4 pocillos de células adrenales Y1 dependiendo de la disponibilidad de las muestras o las células. La concentración de punto final de toxina CT o LT son los µg/ml requeridos para obtener 50% de citotoxicidad (muerte celular). Guidry, J. J., Cardenas, L., Cheng, E. y J. D. Clements. 1993 Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity and adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Inf. and Imm. 65: 4943-4950.

Ejemplo 8

Inducción de Aves de Engorde con LT Natural

Los polluelos de engorde se alojaron en 5-6 aves por jaula hasta los 10 ó 21 días de edad. En un estudio piloto, 60 16 polluelos de diez días de edad se dividieron en tres grupos (5 aves no inoculadas, 5 aves tratadas con 100 µg/ave, 5 aves tratadas con 200 µg/ave) y se inocularon subcutáneamente con LT natural de *E. coli*. Se había determinado previamente que la toxina LT estaba en forma activa mediante valoración sobre células adrenales Y1 de ratón según se describe anteriormente. Las aves fueron observadas cada hora durante 8 horas después de la inoculación con respecto a los signos clínicos. A las 1, 2, 4, 8, 24 y 26 horas después de la inoculación, las aves fueron sacrificadas y se efectuó una necropsia ordinaria. Se registraron los pesos y las lesiones de órganos críticos, incluyendo el intestino, el hígado, 65 el riñón, el bazo y la glándula adrenal, así como los pesos corporales.

ES 2 320 119 T3

Para el segundo estudio, 84 aves de veintidós días de edad se dividieron en 6 grupos de 16 aves cada uno y se inocularon subcutáneamente con 0, 10, 50, 100, 200 ó 400 μg de holotoxina LT natural por ave. A las 10, 24 y 48 horas después de la inoculación, 5 aves de cada grupo se evaluaron con respecto a los pesos corporales, la patología ordinaria, la consistencia fecal y la salud general. Se proporcionaba alimento y agua a voluntad a todas las aves a lo largo del estudio.

Ejemplo 9

10 *Respuesta Serológica a CT-B Administrada Oralmente en Polluelos de Engorde*

La subunidad B de la toxina del cólera (CT-B, por sus siglas en inglés) se añadió al alimento o se inoculó directamente en pollos usando diversos formatos. Para este estudio, se realizaron tres inoculaciones a los 1, 14 y 28 días de edad; se recogió sangre para el análisis de anticuerpos los días 1, 14, 28 y 35 de edad. Los datos revelaban varias observaciones previamente descritas para mamíferos, aunque no descritas para pollos. Una respuesta serológica medible se detectó fácilmente a los 28 días de edad o dos semanas después de la segunda vacunación a los 14 días de edad. Así, solo se requerían dos dosis para inducir una respuesta detectable. Sin embargo, proporcionar una tercera dosis a los 28 días de edad potenciaba la respuesta. Las inoculaciones tanto intranasales (IN) como con el alimento (OF, por sus siglas en inglés) inducían respuestas serológicas; la concentración más alta (5407) se producía con un inóculo de 20 μg de CT-B aportado como una dosis acuosa de 25 μl a cada fosa nasal del pico. El aporte oral para CT-B también proporcionaba una buena respuesta ya se aportara como una dosis de 20 μg mediante sonda (concentración 1790) o mediante 40 μg pulverizados directamente (aderezo superficial) sobre el alimento (concentración 365). Según se observaba para mamíferos, la ruta IN que usa CT-B proporciona una buena respuesta serológica. (Verweij *et al.*, 1998. Vaccine 16:2069-2076 e Isaka *et al.* 1998. Vaccine 16: 1620-1626.) Sin embargo, el volumen de dosis necesita ser pequeño para permitir la entrada a través de la fosa nasal. En este caso, podría producirse toxina CT-B purificada como una solución de reserva de 2 mg/ml, lo que permitiría que la dilución hasta la dosis apropiada de 20 μg se aportara en 25 μl . La aplicación por pulverización usando 20 μg en 6 gramos de alimento, o aproximadamente 0,3 ppm, proporcionaba una buena concentración. Considerando la dilución de la CT-B en el alimento y la respuesta que resultaba, la dosificación mediante la ruta oral parece proporcionar una buena estimulación del GALT ya sea inoculada directamente en el esófago o a través del consumo a voluntad de inóculos de 6 gramos. Como comparación, una dosis de 2 μg de CT-B suministrados IN o 40 μg suministrados oralmente con el alimento en pollos es muy similar a la dosis que estimularía una respuesta mucosal en ratones. La dosis mostrada eficaz para la CT-B en este estudio también es comparable con la cantidad de antígeno usada en vacunas convencionales para animales aportada mediante métodos intramusculares (IM) o subcutáneos (SC). Además, no se observaron efectos adversos a partir de CT-B para estas aves; la ganancia de peso y el consumo de alimento eran normales, lo que apoya el uso seguro como vacunas orales de antígenos de plantas derivadas transgénicamente.

Ejemplo 10

40 *Respuesta Serológica a LT procedente de Tabaco en Pollos*

Utilizando el intervalo de dosis determinado eficaz para CT-B, se realizó un segundo estudio para evaluar si la toxina termolábil (LT, por sus siglas en inglés) o LT-B de *E. coli* natural, así como una toxina termolábil modificada génicamente, podía proporcionar una respuesta similar. En este estudio, 40 μg de toxina, según se medían mediante el ELISA cuantitativo de LT-B, se administraron en tres dosis en un espacio de tiempo similar al del estudio de CT-B descrito anteriormente. La Tabla 1 proporciona los resultados de LT derivada de tabaco (SLT) y toxina natural administradas mediante el método con el alimento o mediante vacunación oral. Todos los grupos de tratamiento respondían, con la excepción del sobrenadante de SLT. Las muestras de “SLT entera” (concentración 844) y la “SLT sometida a sonicación” (concentración 557) proporcionaban las respuestas más altas en este estudio.

55 (Tabla pasa a página siguiente)

60

65

ES 2 320 119 T3

TABLA 1

LT Derivada de Plantas en Comparación con LT, LT-B y CT-B Derivadas de Bacterias

Grupo de Tratamiento	Día 0 GMT	Día 14 GMT	Día 28 GMT	Día 34 GMT
PBS	10 ^a	<10 ^a	<10	<10
NT sometida a sonicación	<10 ^a	<10 ^a	<10	<10
NT secada-mezclada	<10	<10	<10	<10
CT-B - pulverizada	<10	<10	22	266
LT-B - pulverizada	<10	<10	30	171
LT- pulverizada	<10	<10	32/53	133/226
SLT entera-mezclada	<10	<10	260	844
SLT sometida a sonicación-mezclada	<10	<10	130	577
SLT pella-mezclada	<10	<10	30	272
SLT sob-mezclada	80	<10	<10	<10
SLT secada-mezclada	<10	<10	20	96
SLT sometida a sonicación-mezclada O/N	<10	<10	12	72

La "SLT entera" eran células húmedas enteras aisladas simplemente al permitir que los matraces de producción de NT-1 sedimentaran, decantar el medio y usar las células húmedas enteras restantes y el medio residual para ser mezclados con el alimento. La "SLT sometida a sonicación" era células húmedas enteras que se sometían a sonicación en primer lugar para romper la pared celular y a continuación se mezclaban con alimento. Ambas muestras de SLT derivadas de tabaco inducían una mejor respuesta serológica que LT o CT-B naturales cuando se aplicaban directamente al alimento. Estos resultados apoyan a la LT derivada de células de tabaco (SLT) y la LT natural como buenos antígenos mucosales en pollos. Por otra parte, la Tabla 2 muestra que la SLT derivada del tabaco no proporcionaba efectos dañinos según se medía por la ganancia de peso, lo que proporciona datos que apoyan la vacunación segura de pollos mediante la ruta oral usando LT de planta o natural. Además, la toxina LT natural proporcionada en 40 µg a los 1, 14 y 28 días de edad no proporcionaba efectos enteropatógenos visibles (diarrea, incomodidad, deshidratación) de las aves tratadas a cualquier edad. Se estima que la masa de LT por kg de peso corporal es de 0,6 mg de LT/kg de peso corporal, lo que está muy por encima de las dosis letales observadas para ratones (Gill, M. D. 1982. Bacterial toxins; a table of lethal amounts. Microbiol. Reviews. 46: 86-94.) y apoya el concepto de que la LT natural puede usarse con seguridad en pollos.

ES 2 320 119 T3

TABLA 2

Peso corporal total promedio por ave por tratamiento

5

10

15

20

25

30

35

40

Tratamiento	Peso promedio Día 0 (kg)	Peso promedio Día 14 (kg)	Peso promedio Día 28 (kg)	Peso promedio Día 34 (kg)
Control de PBS	0,038	0,29	1,06	1,34
NT sometida a sonicación-mezclada	0,040	0,30	1,06	1,39
NT secada-mezclada	0,039	0,32	1,04	1,36
CT-B - pulverizada	0,040	0,30	1,04	1,36
LT-B - pulverizada	0,038	0,29	0,98	1,3
LT - pulverizada	0,040	0,30	1,02	1,32
SLT entera-mezclada	0,040	0,29	0,94	1,28
SLT sometida a sonicación-mezclada	0,040	0,30	1,00	1,3
SLT pella-mezclada	0,038	0,30	1,04	1,38
SLT sobrenadante- mezclada	0,040	0,33	0,92	1,32
SLT secada-mezclada	0,040	0,32	1,08	1,42
SLT sometida a sonicación-mezclada y secada durante la noche	0,038	0,33	1,12	1,41

45 Ejemplo 11

Comienzo de la Respuesta Serológica y Duración de la Respuesta Serológica a SLT

50 Los dos estudios previos demostraban que la toxina termolábil de *E. coli* natural o derivada del tabaco induce una fuerte respuesta serológica en polluelos de engorde. Se efectuó un estudio para examinar el día de edad más temprana en el que podía medirse una respuesta en polluelos de engorde y la duración de la respuesta. En este estudio, se usó una combinación de dosis y edad del ave para examinar la respuesta a SLT. La Tabla 3 muestra los grupos de tratamiento, la edad del ave a la dosificación y la cantidad de antígeno usada en cada dosis de este estudio. La segunda dosis era inferior debido a un bajo rendimiento de antígeno, que se traducía en una dosis de antígeno inferior cuando se distribuía entre los grupos. La dosis IN era aproximadamente 100 ng; la dosis baja se debe al hecho de que el antígeno de SLT está diluido por la masa de células de tabaco y al hecho de que la resuspensión de células de SLT debe hacerse suficientemente homogénea para permitir la aplicación a la fosa nasal de un ave de un día de edad. Una suspensión de células NT-1 suficientemente diluida para permitir la transferencia a través de una pipeta proporcionaba un inóculo muy pequeño para la primera dosis. A pesar de este hecho, cuando eran reforzadas mediante la segunda dosis con el alimento, estas aves respondían, indicando que una dosis pequeña es adecuada para cebar a las aves con el antígeno de LT mediante la ruta IN.

65

ES 2 320 119 T3

TABLA 3

Tratamiento	1 ^a Dosis (µg)	2 ^a Dosis (µg)	3 ^a Dosis (µg)
1. Células de Control NT In/Orales (Días 0, 14, 28)	0	0	0
2. Células de Control NT con el Alimento (Días 0, 14, 28)	0	0	0
3. Células SLT102 con el Alimento (Días 0, 14, 28)	5	3	3
4. Células SLT102 con el Alimento (Días 0, 14)	5	3	ND
5. Células SLT102 con el Alimento (Días 0, 7)	5	3	ND
6. Células SLT102 con el Alimento (Días 0, 7, 14)	5	3	3
7. Células SLT102 con el Alimento (Días 0, 14, 28)	40	25	25
8. Células SLT102 con el Alimento (Días 0, 14)	40	25	ND
9. Células SLT102 con el Alimento (Días 0, 7)	40	25	ND
10. Células SLT102 con el Alimento (Días 0, 7, 14)	40	25	25
11. Células SLT102 In/Orales (Días 0, 14, 28)	100 (ng)	25	25
12. Células SLT102 In/Orales (Días 0, 7, 14)	100 (ng)	25	25

La Tabla 3A muestra las respuestas serológicas. La edad más temprana para detectar una respuesta serológica era 21 días, independientemente de que la dosis se proporcionara a los 0, 7 ó 14 días de edad. En los grupos 3, 7 y 11, se proporcionaba una tercera dosis a los 28 días de edad, pero no era necesaria para proporcionar una concentración detectable. La respuesta detectada para los 21 días de edad duraba hasta los 42 días de edad, de acuerdo con la edad de comercialización (35-65 días) de las aves de engorde.

La mejor respuesta serológica se observaba cuando solo se proporcionaban dos dosis al ave y en ambos casos la primera inoculación era a 1 día de edad y la segunda inoculación era a los 7 días de edad. Debido a que los polluelos típicamente se inoculan *in ovo* tres días antes de la eclosión o al día de edad en el criadero, la capacidad para cebar a las aves con un día de edad puede adaptarse a las prácticas de vacunación para la industria de los pollos de engorde.

ES 2 320 119 T3

TABLA 3A

Inicio de la Respuesta Serológica y Duración de la Respuesta

Tratamiento	Día 0 GMT	Día 7 GMT	Día 14 GMT	Día 18 GMT	Día 21 GMT	Día 28 GMT	Día 35 GMT	Día 42 GMT
1	14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
2	40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
3	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
4	28	<10	<10	<10	<10	17	<10	<10
5	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
6	20	<10	<10	<10	<10	13	<10	<10
7	20	<10	<10	<10	<10	22	65	49
8	20	<10	<10	<10	26	61	78	68
9	28	<10	<10	15	36	116	335	453
10	28	<10	<10	<10	26	160	394	292
11	14	<10	<10	<10	<10	<10	16	21
12	20	<10	<10	<10	19	90	143	108

Ejemplo 12

Tratamiento de Aves de Engorde con LT Natural procedente de E. coli

Las Tablas 4 y 5 proporcionan los resultados de dos estudios en aves de engorde de 10 días y 21 días de edad tratadas subcutáneamente con LT natural. Se usó inoculación subcutánea ya que se ha presentado como un método potente, si no uno más potente, de inducción letal en ratones (Isaka *et al.* 1998). Usando 16 aves y tres grupos de tratamiento, no podía observarse una diferencia apreciable entre aves no tratadas y tratadas. Aunque unas pocas aves mostraban alguna ligera diarrea y ligeras hemorragias, durante la disección histológica no se observaban diferencias entre aves tratadas y controles no tratados. Una marca característica de un animal sensible a la diarrea es la retención de agua en el intestino por peso corporal total. Sin embargo, en este estudio, el peso promedio de los intestinos por peso corporal era realmente inferior para los controles que para el grupo de tratamiento de 100 µg. Basándose en estos resultados, no existen respuestas patológicas intensas en las aves cuando se administra LT mediante este método. En un segundo estudio, 84 aves de engorde de veintiún días de edad de la misma pollada que el estudio piloto se trataron con un intervalo más amplio de LT natural. Debido a que no se observaron diferencias entre muestras a nivel histoquímico, o patología ordinaria y peso total del ave en el estudio piloto, solo se realizaron observaciones de patología ordinaria y salud general en el segundo estudio. Los datos mostrados en la Tabla 5 indican que, independientemente del grupo de tratamiento, no existía patología o cambio global en la salud general del ave independientemente de la concentración de LT o el momento de la observación. Aunque se observaron algunas regiones hemorrágicas en algunas de las muestras tratadas, también se observaban para los controles, y así no se consideraba que estuvieran asociadas con el tratamiento. El peso promedio por ave examinada en el estudio piloto era 162 g, mientras que el peso promedio por ave para el estudio con inducción era 636 g. Por lo tanto, la masa de LT por peso corporal de ave para ambos estudios variaba entre 0,2 mg/kg y 1,2 mg/kg. La relación de masa a peso corporal presentada considerada letal para ratones varía entre 1 mg/kg de peso corporal para CT (suministrada IN) hasta 0,25 mg/kg para LT (suministrada IV). Glenn *et al.*, 1998. *J Immunol.* **161**: 3211-3214 y Gill, 1983. Para seres humanos, tan poco como 0,1 mg/kg es suficiente para producir varios litros de pérdida de fluido. La relación probada en la presente memoria, mediante un método aceptado y sensible de inducción para LT, no provocaba ninguna indicación de diarrea en comparación con el control.

ES 2 320 119 T3

TABLA 4

Estudio sobre la Inoculación Subcutánea de LT Natural en Aves de 10 Días de Edad

Trata- miento	Patología ordinaria					Peso del órgano					Peso del ave
	Intestino	Hígado	Riñón	Bazo	Glándula adrenal	Intestino	Hígado	Riñón	Bazo	Glándula adrenal	
G1 ave 1	N	N	N	N	nd	18,5	8,1	1,0	0,2	nd	166,8
ave 2	N	N	N	N	nd	19,4	9,95	1,15	0,36	nd	174,4
ave 3	N	N	N	N	nd	19,1	11,7	1,95	0,16	nd	178,3
ave 4	N	N	N	N	N	22,4	9,12	1,54	0,21	nd	204,4
ave 5	N	N	N	N	N	16,2	5,6	1,4	0,16	nd	156,8
G2 ave 6	N	N	N	N	nd	19,5	12,9	1,3	0,2	nd	178,4
ave 7	N	N	h.l.	N	nd	17,8	12,3	1,3	0,17	nd	191,1
ave 8	N	h.l.	N	N	N	15,6	9,2	1,92	0,18	nd	167,6
ave 9	D	h.l.	N	N	N	11,4	8,1	1,51	0,5	nd	166,6
ave 10	D ¹	N	N	N	N	14,82	10,8	2,3	0,09	nd	170,6
G3 ave 11	N	N	N	N	nd	21,4	14,9	0,99	0,17	nd	186,9
ave 12	N	N	N	N	nd	18,0	8,0	1,2	0,2	nd	167,2
ave 13	N ¹	h.l.	nd	N	N	19,09	12,4	2,5	0,13	nd	196,1
ave 14	N ¹	N	N	N	N	13,5	7,2	1,8	0,27	nd	142,7
ave 15	D	N	N	N	N	13,1	7,4	1,9	0,11	nd	144,1
ave 16	D	N	N	N	N	7,6	6,7	1,4	0,14	nd	110,3

G1-grupo 1 controles no inoculados; nd-no determinado; N-normal; D-deshidratado; h.l.- hemorragia ligera; G2-grupo 2 100 µg/ave; G3-grupo 3 200 µg/ave;

¹Diarrea apreciada post mortem

ES 2 320 119 T3

TABLA 5

Tratamiento de Aves de Engorde Usando LT Natural mediante la Ruta Subcutánea

Tratamiento ¹	Peso del ave (peso prom. en g)	Intestino	Hígado	Riñón	Bazo
G1-control de 0 µg 10 h ¹	695	N	N	N	N
G1-control de 0 µg 24 h ¹	666	N	N	N	N
G1-control de 0 µg 48 h ²	741	1 ave s.h.	2 aves l.he.	N	N
G2- 10 µg de trat. 10 h ¹	627	N	N	N	N
G2- -10 µg de trat. 24 h ¹	662	1 ave l.h.	N	N	N
G2-10 µg de trat. 48 h ³	756	N	N	N	N
G3-50 µg de trat. 10 h ¹	683	N	N	N	N
G3-50 µg de trat. 24 h ¹	641	N	N	N	N
G3-50 µg de trat. 48 h ²	728	N	N	N	N
G4-100 µg de trat. 10 h ¹	755	2 aves s.h.	2 aves l.he.	N	N
G4-100 µg de trat. 24 h ¹	690	N	N	N	N
G4-100 µg de trat. 48 h	665	1 ave s.h.	N	1 ave s.h.	
G5-200 µg de trat. 10 h ¹	686	N	N	N	N
G5-200 µg de trat. 24 h ¹	700	N	N	N	N
G5-200 µg de trat. 48 h ²	670	N	N	N	N
G6-400 µg de trat. 10 h ¹	625	N	h.l.	N	N
G6-400 µg de trat. 24 h ¹	534	N	N	N	N
G6-400 µg de trat. 48 h ³	605	N	N	N	N

¹ 4 aves por punto temporal por grupo de tratamiento

² 6 aves por punto temporal por grupo de tratamiento

³ 5 aves por punto temporal por grupo de tratamiento

s.h.- suavemente hemorrágico; p.he.-pequeño hematoma; l.h.-ligeramente hemorrágico

Ejemplo 15

Uso de SLT y LT para Coadyuvar a la Respuesta mediante Inoculación Intranasal/Ocular

Este estudio se diseñó para examinar la dosis de LT necesaria para coadyuvar a otro antígeno mediante la ruta intranasal/ocular. En este estudio, el antígeno diana era la proteína de hemaglutinina neuraminidasa (HN) del virus de la enfermedad de Newcastle descrita en la Patente de EE. UU. 5.310.678. Las células NT-1 se transformaron de acuerdo sustancialmente con el Ejemplo 2 usando pCHN18 como el vector de transformación que produce una línea NT-1 transformada (CHN18) que expresaba el gen de HN natural.

Se prepararon inmunógenos separadamente al romper las células transformadas y liofilizar los extractos de células NT-1 que expresan SLT, HN o control nulo como sigue. Aproximadamente 1 gramo de células filtradas se puso en 2 ml de tampón (DPBS y EDTA 1 mM) y a continuación se sometió a sonicación durante 15 a 20 segundos sobre hielo. La sonicación se realizó usando un sonicador Branson 450 con una micropunta reemplazable en el control de salida de 8, ciclo de servicio 60 durante 20 segundos. El sonicado se centrifugó a continuación 16.000 veces durante 10 minutos para retirar el residuo celular y el sobrenadante se decantó. El extracto se distribuyó en viales de vidrio para suero, se liofilizó y se almacenó a 2-7°C hasta que se necesitara. Los extractos celulares secados por congelación se usaron como el inóculo para los tratamientos derivados de plantas. Se usó holotoxina LT (5,92 mg/ml suspendidos en DPBS) derivada de *E. coli* como control positivo.

Las inoculaciones de vacunas incluidas se realizaron los días 0 y 14 del estudio. Extractos procedentes de CHN18 se suministraron en 7 µg el día 0 y 18 µg el día 14. LT derivada de *E. coli* se mezcló con el extracto de CHN18 usando

ES 2 320 119 T3

8 μg el día 0 y 20 μg el día 14, y la toxina termolábil derivada de planta (SLT 102) se suministró en 0,5 μg el día 0 y 1,5 μg el día 14. Muestras tratadas con LT o SLT se compararon con grupos de tratamiento que recibían un adyuvante más convencional de agua en aceite, que se preparaban al resuspender la preparación de antígeno secada por congelación en una concentración final de Drakeol Oil al 2,5% que contenía 0,165% de Span 80 en DPBS con Tween 80 al 0,5%.

5 Las muestras se mezclaron usando dos jeringas y una espita de tres vías para permitir la suspensión del antígeno en la mezcla de agua y aceite.

Para la inoculación intranasal/ocular, se añadieron 25 μl por cada fosa nasal y cada ojo para aves de menos de 10 días de edad y 50 μl por fosa nasal y ojo para aves de más de 10 días de edad. Se recogió sangre el día 21, 35 y 42. El día 35, las aves fueron inoculadas subcutáneamente con virus natural inactivado para simular una dosis de incitación, 7 días después de la incitación simulada (día 42) se extrajo sangre para el análisis serológico. Los resultados de la Tabla 6 muestran que la respuesta serológica a LT y SLT se detectaba fácilmente tanto en 21 días del estudio como 7 días después de la segunda vacunación. La respuesta serológica a LT por ELISA era muy superior que la de SLT derivada de planta, sin embargo, la dosis usada para la dosis cebadora era más de 10 veces menor para la SLT que para la LT. El día 35 y 42, la respuesta serológica a LT y SLT era bastante alta, indicando que la respuesta mucosal mediante la ruta intranasal y ocular es eficaz cuando se suministra una dosis cebadora tan baja como 0,5 μg . En contraste, la respuesta a proteína de HN derivada de líneas celulares NT1 transgénicas CHN18 no daba una concentración detectable el día 21 ni mediante ELISA ni mediante HAI. Sin embargo, el día 42, que era 7 días después de la incitación simulada con NDV natural, los tratamientos 1 y 2 mostraban ambos respuestas serológicas significativas a HAI que no se observaban en los otros tratamientos. Los otros tratamientos incluían LT y SLT (tratamientos 7 y 8) aportadas en dosis similares a los tratamientos 1 y 2, excepto que estaban emulsionadas en aceite y agua. Estos resultados sugieren que la respuesta memorizada a HN podía amplificarse después de la exposición a antígeno natural en una dosis de incitación simulada. Típicamente, no puede detectarse una respuesta serológica a HN dentro de 7 días después de la exposición al antígeno. Por otra parte, el antígeno de HN por sí mismo o en combinación con otras mezclas no inducía una respuesta en ninguno de los otros tratamientos, así, las concentraciones para HN mostradas para el tratamiento 1 y 2 se desarrollaban como consecuencia de la exposición de HN y LT/SLT.

TABLA 6

Efecto Adyuvante de la Administración Intranasal/Ocular de proteína de LT y SLT en Aves

Grupo de Tratamiento	Descripción del Tratamiento	NDV ELISA GMT			NUV HI GMT			LT ELISA GMT		
		Día 21	Día 35	Día 42	Día 21	Día 35	Día 42	Día 21	Día 35	Día 42
1	pHN + SLT102	5	No Probado	No Probado	3	1	45	133	2229	2560
2	pHN + LT de E.coli	1	No Probado	No Probado	2	1	28	4457	17829	27024
3	pHN en Corixa (Emulsión de MPL/TDM)	2	No Probado	No Probado	1	1	3	4	17	67
4	pHN en Emulsión 1	1	No Probado	No Probado	1	1	4	1	9	13
5	pHN en Emulsión 2	1	No Probado	No Probado	1	1	1	3	3	14
6	pHN en Emulsión 3	1	No Probado	No Probado	1	1	3	1	3	14
7	pHN + SLT en Emulsión 1	1	No Probado	No Probado	2	1	1	352	2560	3880
8	pHN + LT de E. coli en Emulsión 1	5	No Probado	No Probado	5	1	4	844	8914	8914
9	Control de NT + SLT en Emulsión 1	1	No Probado	No Probado	2	1	1	1114	5881	3880
10	Control de NT + LT de E. coli en Emulsión 1	1	No Probado	No Probado	1	1	2	3378	17829	23525

Todavía No Revisado por QA

La Concentración de NDV por ELISA <50 es el fondo

La Concentración de NDV por HI <8 es el fondo

La Concentración de LT por ELISA <10 es el fondo

65 Los resultados de la Tabla 7 se generaron usando inoculaciones subcutáneas (SC) de LT en combinación con HN. La preparación de vacuna era como se describe para la Tabla 6. La vacuna se administró al inocular en la membrana del muslo en este estudio.

ES 2 320 119 T3

Usando dos inoculaciones el día 0 y 14 del estudio, una dosis de incitación simulada con NDV inactivado se administró el día 35. Los resultados mostrados en la Tabla 7 demuestran que la respuesta serológica a LT también resulta de la administración de inoculación SC, y que se observaba potenciación de la respuesta serológica a HN cuando se coadministraban.

TABLA 7

Inoculación Subcutánea de Pollos con LT y HN derivada de Planta

Grupo de Tratamiento	Descripción del Grupo de Tratamiento	NDV HI GMT			LT ELISA GMT		
		Día 21	Día 35	Día 42	Día 21	Día 35	Día 42
7	pHN (20 µg) + SLT (2,5 µg) en Emulsión 1	24	7	38	24	17	16
8	pHN (20 µg) + LT de E.coli (20 µg) en Emulsión 1	239	120	128	557	735	1114
9	control de NT + SLT (2,5 µg) en Emulsión 1	1	1	19	27	190	190
10	control de NT + LT de E.coli (20 µg) en Emulsión 1	1	2	20	1613	2032	3225

La LT también estimulaba una respuesta mediante inoculación *in ovo*. En la tabla 8, LT derivada de *E. coli* se administraba mediante inoculación a través del saco aéreo y en la cavidad amniótica. Los huevos fértiles se observaron al trasluz el día 18 de incubación y solo se identificaron los embriones sanos para la inoculación. La zona de inyección se frotó con alcohol directamente sobre la célula aérea del huevo. Se perforó suavemente un orificio usando un troquel para huevos y una aguja de calibre 22 de 3,8 cm (1 ½ pulgadas) de largo se insertó a través del orificio. Hasta 0,3 ml de inóculo se depositaron en la cavidad amniótica justo por debajo de la membrana del saco aéreo. Los huevos se transfirieron a continuación al criadero desde el día 18-21. Catorce días después de la eclosión, las aves se reforzaron con LT y la sangre se analizó mediante la respuesta serológica el día 21. No se observaba respuesta serológica con una sola inoculación dentro de 7 días, a no ser que se hubiera administrado previamente una dosis cebadora. Los resultados indican que la LT inoculada *in ovo* ceba eficazmente a un embrión de 18 días de edad.

TABLA 8

Inmunización In Ovo

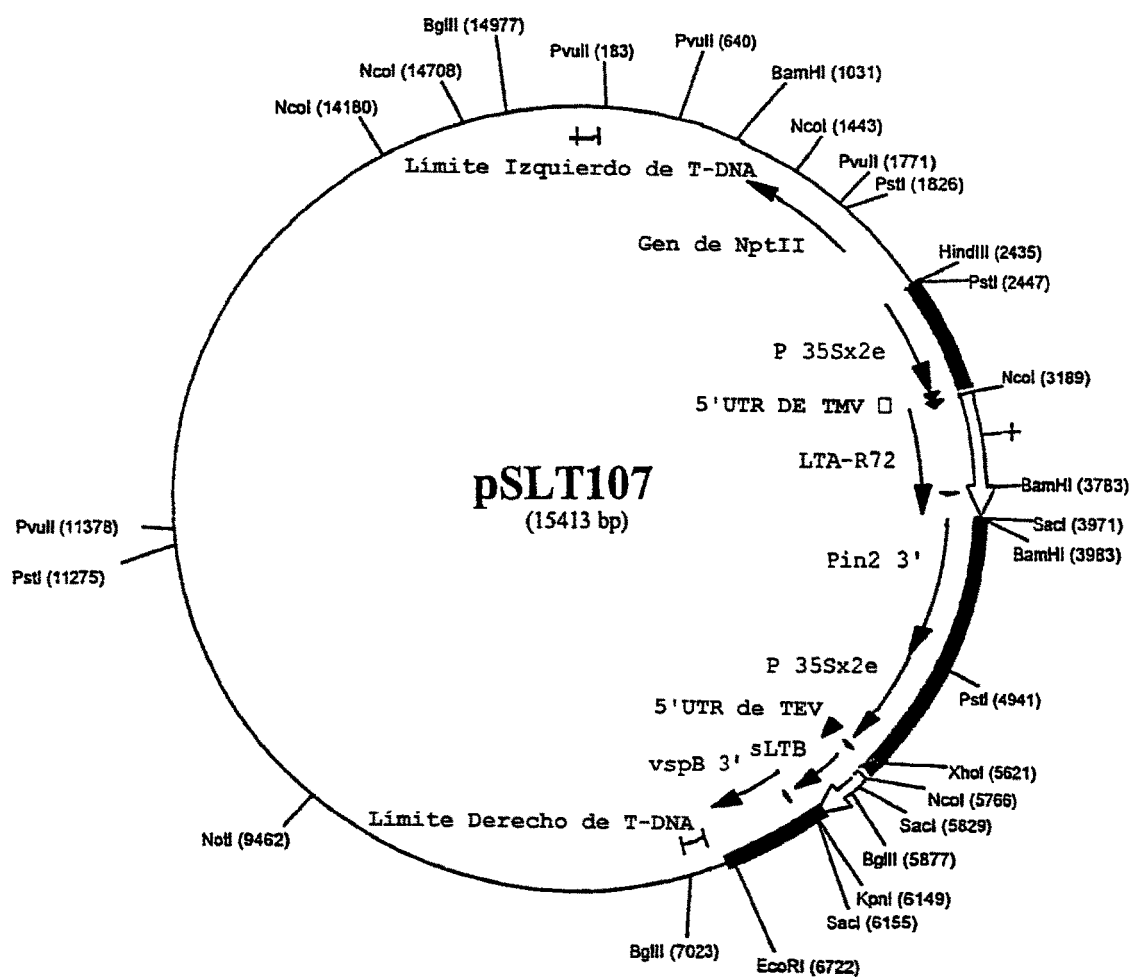
Descripción del Grupo de Tratamiento	Día 21 Serología GMT	
	Nº de eclosiones	LT ELISA
control de NT en Emulsión 2	5	1
control de NT + LT de E.coli (10 µg)	3	1016

El experto normal reconocerá o determinará fácilmente muchos equivalentes de realizaciones específicas de la invención descritas e ilustradas en la presente memoria basándose en esta memoria descriptiva, la técnica anterior o la mera experimentación habitual.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende la toxina termolábil (LT, por sus siglas en inglés) de *E. coli* natural adyuvante para el uso en la vacunación de un pollo de engorde, en donde la composición está adaptada para la administración a través de la ruta oral o subcutánea.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un antígeno inmunoprotector eficaz en un pollo de engorde.
- 10 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el antígeno inmunoprotector se deriva del grupo que consiste en un patógeno viral, bacteriano o fúngico.
- 15 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el antígeno inmunoprotector se selecciona del grupo que consiste en antígenos inmunoprotectores conocidos de la enfermedad de Newcastle, la influenza aviar, la enfermedad bursal infecciosa, la coccidiosis, la enteritis necrótica, la aerosaculitis, la celulitis, la anemia del pollo, la laringorinotraqueitis, la bronquitis infecciosa y la enfermedad de Marek.
- 20 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el antígeno inmunoprotector se selecciona del grupo que consiste en proteína de hemaglutinina neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle y proteína de hemaglutinina de la influenza aviar.
- 25 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el adyuvante es producido por una bacteria *E. coli*.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el adyuvante es producido por una planta transgénica.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el antígeno inmunoprotector se produce en una planta transgénica.
- 30 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el adyuvante y el antígeno inmunoprotector se producen en una planta transgénica.
- 35 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el adyuvante y el antígeno inmunoprotector se producen en una sola planta transgénica.
- 40 11. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento para vacunar a un pollo de engorde contra una enfermedad aviar.
- 45 12. Un método para preparar una vacuna para proteger a un pollo de engorde contra una enfermedad aviar, que comprende mezclar una cantidad eficaz de LT natural con una cantidad eficaz de un antígeno inmunoprotector que se sabe que provoca una respuesta inmunitaria en un ave, en el que la vacuna está adaptada para la administración a través de la ruta oral o subcutánea.
- 50 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el antígeno inmunoprotector se selecciona del grupo que consiste en antígenos inmunoprotectores conocidos de la enfermedad de Newcastle, la influenza aviar, la enfermedad bursal infecciosa, la coccidiosis, la enteritis necrótica, la aerosaculitis, la celulitis, la anemia del pollo, la laringorinotraqueitis, la bronquitis infecciosa y la enfermedad de Marek.
- 55 14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el antígeno inmunoprotector se selecciona del grupo que consiste en proteína de hemaglutinina neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle y proteína de hemaglutinina de la influenza aviar.
- 60 15. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el antígeno inmunoprotector es la proteína de hemaglutinina neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle.
- 65

Figura 1





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N° de publicación : ES 2 320 119 T3

② Número de solicitud: E 03759205

CORRECCIÓN DE ERRATAS DEL FOLLETO DE PATENTE

Pág./Inid	Errata	Corrección
1/54	USO DE TOXINA TERMOLABIL DE ESCHERICHIA COLI COMO ADYVANTE EN AVES DE CORRAL.	USO DE TOXINA TERMOLABIL DE ESCHERICHIA COLI COMO ADYUVANTE EN AVES DE CORRAL.