



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-100868

54. TÍTULO Un complejo Multifuncional para identificar
patógenos específica de un agente objetivo

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/12

71. SOLICITANTE Yamit Biotechnologies LTD

DOMICILIO P.O Box 408, 110513 Kiryat Shmona, Israel

74. APODERADO Dra Margarita Castellanos Abordano

22. BOGOTÁ, D. C., 08 oct 2004

202099

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: YAMIT BIOTECHNOLOGIES LTD.

Dirección: P.O.BOX 408, 110313 Kiryat Shmona,
ISRAEL

Nacionalidad o Domicilio: Kiryat Shmona, ISRAEL

Lugar de Constitución: ISRAEL

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CARRERA 9 No. 83-08

Teléfono: 610 74 80 Fax: 610 07 06
E-mail: acastell@impest.net.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐Número 38779.664 TPA 70.818

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: JACOB PITKOVSKI; ELY MORAG; YOSEF PINCHASOV

Dirección: 12391 Korazim, Israel; Kfar Aviv, P.O.BOX 121, 76867 Yeshuavy G'derot, Israel;
Beit Gamliel 107, 76880 D.N. Nahal Soreq, Israel

Nacionalidad o Domicilio israelíes

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/IL2003/000196Fecha 10/03/2003Publicación Internacional No. WO 2003/076471 A3Fecha 18/09/2003

⑥

Título (54)

"UN COMPLEJO MULTIFUNCIONAL PARA IDENTIFICAR FAGOCITOSIS ESPECIFICA DE UN AGENTE OBJETIVO"

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07K 16/12

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

IL

(32) Fecha

10/03/2002

(31) Número de Solicitud

148898

⑨

Comprobante de pago No.

04-76.778

Fecha

Septiembre 29, 2004

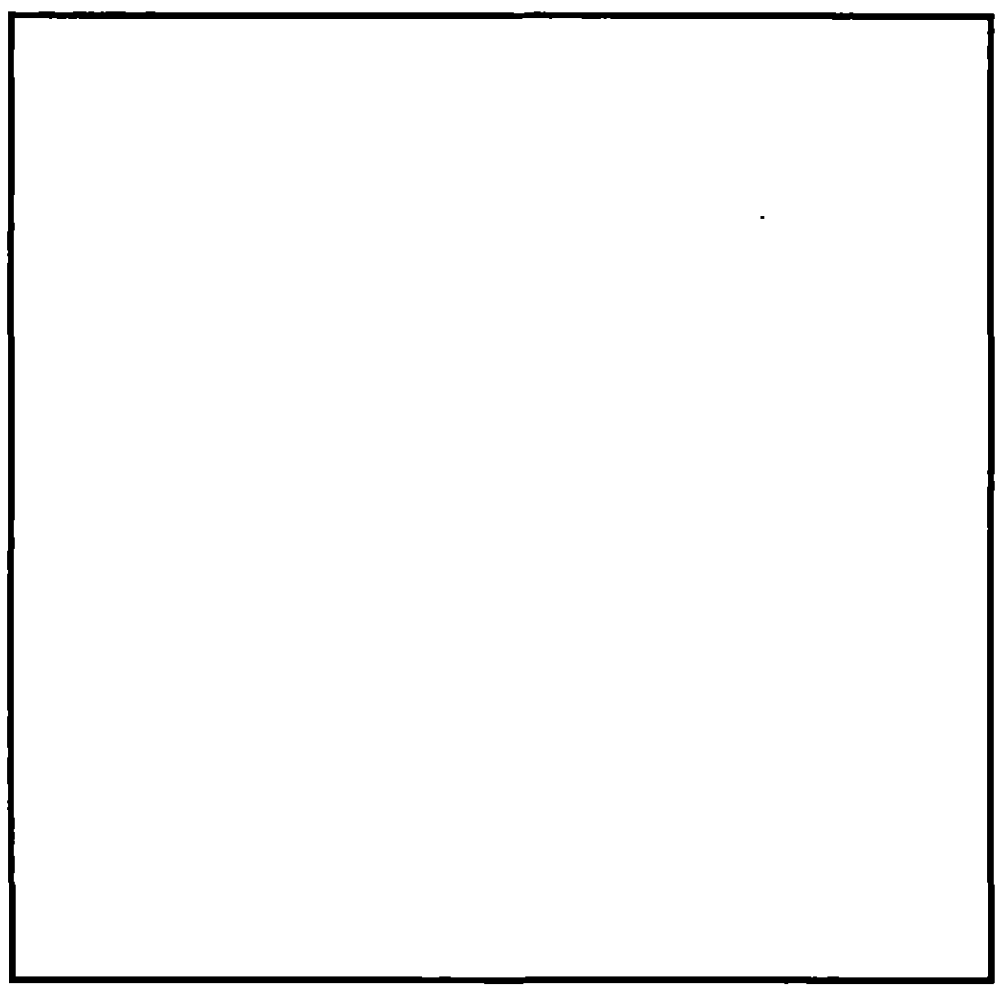
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo hecha a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud Internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA: Margarita Castellanos
C.C. No. 39.779.654 Uruquén - TPA 70.819 C.S.J.

2017.03.03

MIT : 800176087-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 04100068 00000000

Folios: 198

Fecha (AMD): 2004-10-08 15:30:52

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTA

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 76,776

FECHA : SEPTIEMBRE 29 DE 2004

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CARTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	23204294	28/09/2004	2.369,000.00

CONCEPTO

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 30005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422.000.00
	TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 September 2003 (18.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/076471 A3

(51) International Patent Classification: C07K 16/12, A61K 39/395, 39/40, 39/44, A61P 31/04

(21) International Application Number: PCT/IL2003/000196

(22) International Filing Date: 10 March 2003 (10.03.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 148598 10 March 2002 (10.03.2002) IL

(81) Designated States (national): AR, AT, AU, AM, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, GU, HK, HU, IL, IN, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): YAMIT BIOTECHNOLOGIES LTD. (IL/IL); P.O. Box 408, 11013 Kiryat Shmona (IL).

(72) Inventors; and
(73) Inventor/Applicant (for US only): PTTKOVSKI, Jacob (IL/IL); 12391 Korman (IL); MORAG, Ely (IL/IL); Kfir Aviv, P.O. Box 121, 76867 Yeshuvay O'dana (IL); PIN-CHASOV, Yosef (IL/IL); Beit Gamilal 107, 76880 D.N. Nahal Soreq (IL).

(74) Agent: LUZZATTO, Kfir et al.; P.O. Box 5352, 84152 Beer-Sheva (IL).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report: 8 January 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2003/076471 A3

(54) Title: A MULTIFUNCTIONAL COMPLEX FOR TARGETING SPECIFIC PHAGOCYTOSIS OF A TARGET AGENT

(57) Abstract: AbstractThe present invention relates to a multi-functional targeting complex for inducing a specific immuno-stimulatory reaction, preferably, phagocytosis, against at least one target pathogenic agent. The complex of the invention comprises at least one target recognition component comprising a molecule that specifically binds to the desired target agent, an immuno-active component comprising an immuno-stimulatory agent; and optionally, a connecting component that associates the targeting component and the immuno-active component. The complex of the invention provides an effective therapeutic prevention and treatment of various pathogenic disorders, such as mastitis in cows and furunculosis in fish. The invention further relates to compositions comprising the targeting complex, methods of treatment and uses thereof.

A Multifunctional Complex For Targeting Specific Phagocytosis of a Target Agent

Field of the Invention

The present invention relates to a targeting complex comprising a targeting component and an immuno-stimulatory active component associated together, optionally via a connecting component, which complex provides an effective therapeutic prevention and treatment of various pathogenic disorders.

Background of the Invention

Vaccines are the most efficient way to prevent diseases caused by pathogens like viruses and bacteria. A vaccine protects the animal by stimulating specific cells and antibodies of the immune system. In active vaccination, humans or animals are exposed to an attenuated, inactivated or toxin form of the disease agent. In response, antibodies and memory cells are produced that confer protection for short or long terms, respectively. In absence of an active vaccine, an unprotected animal may become infected and needs to be treated by various medicaments, e.g. antibiotics in the case of bacteria. One of the solutions is passive vaccination. In this approach, antibodies against a specific pathogen, produced in one animal, are administered to another animal which is infected by the same pathogen. One example is maternal immunity. For example, *E. coli* K99, infects young calves and causes diarrhea. Infected calves may be protected by maternal antibodies directed against the bacteria, which are supplied via the colostrum. Hens passively transfer antibodies to their offsprings, the developing chicks, through egg yolk or through the blood [Hanson *et al.*, Science and Medicine 4:12-21 (1997)], while transfer of antibodies in mammal is via the colostrum.

Numerous publications [Brunser, *et al.*, 1992; Campbell and Petersen, Immune

Milk. *Journal of Immune Milk* 1:3-28 (1984); Davidson, *et al.*, *The Lancet* 2:709-712 (1989); Ebina, *et al.*, *Medical Microbiology and Immunology* 174:177-185 (1985); Fayer, W. *et al.*, 1989, Golay, *et al.*, 1990; Mistens and Keinhorst, 1979; Ormrod and Miller, 1991, 1993, Owens and Nickerson, 1988, Sharpe, *et al.*, 1994; Smith, C. M. (1964)] report that multiple inoculations of hens or dairy cows over a long period of time with an antigen (*i.e.*, hyperimmunization) results in the production of "immune" eggs or milk. These products have antibodies against the specific vaccinating antigens.

Similarly to *in utero* transferred immune protection is observed in mammals, hens passively transfer protection to their progeny by secreting antibodies into the egg. Transfer of chicken antibodies from the hen's serum to the yolk, and absorption by the chick, is analogous to cross-placental transfer of IgG from the mammalian mother to its offspring [Kowalczyk, *et al.*, *Transport in the Chicken Immunology* 54:755-762 (1986); Rose, *et al.*, *European Journal of Immunology* 4:521-523 (1974)].

Since immunoglobulins occur naturally in eggs, and egg products are a common source of protein in human diet, immune eggs are a convenient and economical source of specific antibodies [Hamada, *et al.*, *Infection and Immunity* 59:4161-4167 (1991); Polson, *et al.*, *Immunological Investigations* 14:823-827 (1985)]. The immune egg therefore appears to serve as a concentrated source of antibodies.

It is therefore one of the objects of the present invention to use antibodies raised in eggs (IgY), as a targeting component in the targeting complex of the invention. These targeting components (IgY) specifically direct immunostimulatory response against a particular pathologic agent.

The immunoactive component of the targeting complex of the present invention comprises a phagocytosis inducing agent such as complement,

bacterial antibodies or IgG which induces opsonization by its Fc fragment. Both components, the targeting component and the immunoactive component of the targeting complex of the present invention, may be preferably bound to a micro/nano carrier.

Immunostimulatory cell surface polypeptides and their receptors are important for the clearance and destruction of foreign materials, including mammalian cells or bacteria. Immunostimulatory cell surface polypeptides and their receptors activate the phagocytosis and ADCC. The process begins with opsonization of the foreign materials. An opsonin is an agent, usually an antibody or complement components, that makes a cell or microbe more vulnerable to being engulfed by a phagocyte. Opsonization is the process of coating a cell with opsonin. A phagocyte is a cell that engulfs and devours another, the process of engulfing and devouring is phagocytosis. Amongst the important phagocytes for the purpose of this invention are leukocytes such as macrophages and monocytes.

The present invention thus provides for a targeted immuno-stimulatory complex, for the prevention and treatment of variety of pathological disorders caused by pathogenic agents (bacteria, virus), toxins and other antibiotic-resistant pathogens, as well as malignant disorders in a mammalian subject in need.

In a particular example for targeted immunostimulation, the present invention further provides targeted complex pharmaceutical compositions and method for the prevention and/or treatment of bovine mastitis. The targeted complex comprises the active immunostimulatory component and a targeting component, which is an IgY antibody specific for a mastitis pathogen. Both components may be preferably attached to a micro/nano carrier bead.

Bovine mastitis involves inflammatory changes of the lactiferous ducts, and generally refers to inflammation of the duct system or mammary tissue as a result of the colonization by, or proliferation of, microbes invading the ducts or teat cistern. The milk synthesizing function is thus compromised, and the over-permeation of the cell walls secreting the milk results in the secretion of abnormal milk, with an increase in the number of somatic cells, particularly white blood cells. Additionally, lactating cell disorders and atrophy, as well as the proliferation of connective tissue and the like can also lead to reduced or absent milk production.

The major mastitis pathogens include *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium* and fungi.

The mechanism of mastitis infection or onset is complex, and involves (in terms of bacteria) bacterial infiltration of pathogens, their colonization on the mammary epithelia, and their subsequent proliferation or tissue invasion. Predisposing factors may include genetics, constitution, climate, livestock facilities, environment, the number of feeding animals, feed, milking methods, papillary trauma, and the like, but for practical purposes, the most important is milking hygiene, including proper handling by milkers.

Practical damage caused by mastitis includes lower amounts of milk, lower milk quality, milk waste, the absence of milk, reduced number of years of animal use, greater treatment costs, and potential sources for the infection of healthy cows, all of which represent profound economic losses. Mastitis has thus been the subject of considerable research in many countries over the past 200 years. Although most results have been put to use in the treatment and prevention of the condition itself, its incidence has not declined, and has even increased in some areas. Since mastitis involves inflammatory changes of the mammary glands resulting from microbial infection, responses generally

include the intra-mammary administration of antibiotics and synthetic antibacterials. Administration of antibiotic preparations and synthetic antibacterials is followed by a period in which the milk cannot be used, in concern for the health of human consumers. Since the milk produced during that period is of no commercial value, it represents a major financial loss. In addition, the dosage and administration of the drugs must, of course, be supervised in the area where the treatment is undertaken, but drugs are sometimes selected without testing the susceptibility of the pathogens thereto. Many pathogens have thus acquired multiple resistances, often preventing the establishment of an effective treatment plan.

It is therefore another object of the present invention to overcome the aforementioned problems in providing a simple yet practical and economical method and targeting complex for preventing and treating mastitis without leaving any drugs in milk or producing drug-resistant bacterial strains.

These and other objects of the invention will become apparent as the description proceeds.

Summary of the Invention

In a first aspect, the present invention relates to a multi-functional targeting complex that induces a specific immuno-stimulatory reaction to at least one target agent. The targeting complex of the invention comprises:

- (a) at least one target recognition component, comprising a molecule which specifically binds to said agent or to any functional fragment of said agent;
- (b) an active component comprising an immuno-stimulatory agent; and
- (c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component. The association

of said targeting component and said active component, optionally by said connecting component, should be performed in the appropriate conformation in order to retain the independent biological functions of both the active and the targeting components.

In one embodiment, the targeting complex of the invention induces a specific immuno-stimulatory reaction selected from the group consisting of phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement activation, and stimulation of specific T cells and B cells. This specific immuno-stimulatory reaction is targeted by the complex of the invention to at least one target pathologic agent.

In a specifically preferred embodiment, the targeting complex of the invention induces a specific phagocytosis by leukocytes such as any one of macrophages and monocytes, targeted to at least one target agent.

According to another embodiment, the targeting complex of the invention is targeted against a target pathologic agent selected from the group consisting of bacteria, viruses, fungi, malignant cells, toxins, venoms, haptens and undesired proteins. More preferably, the target pathologic agent may be bacteria selected from the group consisting of mastitis pathogenic bacteria, enteropathogenic bacteria and pathogenic furunculosis bacteria. In a most specifically preferred embodiment, the targeting complex of the invention is targeted to at least one mastitis pathogenic bacteria selected from the group consisting of *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactia*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* (or *farcinica*) and *Streptococcus uberis*.

Alternatively, the target recognition component of the targeting complex may

be targeted against *Aeromonas* spp., particularly, *Aeromonas salmonicida*, which causes an ulcerative disease in fish.

In yet another particular embodiment, the target recognition component comprised within the targeting complex of the invention, comprises any one of an antibody or any functional fragments thereof, ligands and receptors specific to said pathologic agent or to any functional fragment of said agent. In a specifically preferred embodiment, the target recognition component comprises an antibody or any functional fragments thereof. Such antibody is specific to said pathologic agent or to any functional fragment of said agent, and may be for example any one of IgG, IgY and IgM, preferably, an IgY.

According to a specific embodiment, the targeting complex of the invention comprises as the active component an immuno-stimulatory agent. More particularly, this immuno-stimulatory agent induces phagocytosis. The phagocytosis inducing agent comprised within the targeting complex of the invention as an active component, may be selected from the group consisting of opsonins, which are any one of, but not limited to, IgG and C3b, protein molecules having carbohydrate residues that interact with the mannose-fucose receptor of phagocytes, ligand protein molecules recognized by receptors on scavenger macrophages, ligands for integrins expressed by phagocytes, glycoproteins and fucosyl transferase.

According to a specifically preferred embodiment, the phagocytosis inducing agent is IgG.

According to another preferred embodiment, the optional connecting component comprised within the targeting complex of the invention, may be any one of a solid support, a chemical linker, an amino acid residue, a peptide, oligopeptide

or polypeptide linker, a saccharide, oligosaccharide or polysaccharide linker and a lipid linker.

In yet another embodiment, the complex of the invention comprises a targeting component and an immunoactive component, both attached without any connecting component. According to such embodiment, the targeting component may be an IgY antibody directed against said target agent, and the immunoactive component is an IgG anti IgY antibody. Binding of both component retains the appropriate conformation (having the Fc of the IgG molecule free).

In a particular embodiment, the invention relates to a multi-functional targeting complex that induces specific phagocytosis of at least one target mastitis pathogenic bacteria in bovine infected by said bacteria. This specific complex comprises:

- a. at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to the mastitis pathogenic bacteria or to any functional fragment of said bacteria;
- b. at least one active component comprising a phagocytosis-inducing agent; and
- c. optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component. Both active and targeting components are associated, optionally by the connecting component, in an appropriate conformation that retains the independent biological functions of both components.

This targeting complex according to a specific embodiment comprises as a target recognition component, an IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria. More specifically, the targeting complex of the invention may comprise at least one IgY antibody specific for at least one of the mastitis

pathogenic bacteria selected from the group consisting of *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* (or *farcinica*) and *Streptococcus uberis*.

According to a specifically preferred embodiment, the targeting complex of the invention comprises as a phagocytosis-inducing agent, an IgG molecule. Most preferably, said IgG molecule is generated in bovine.

This particular targeting complex may optionally further comprise as a connecting component, any one of, but not limited to, a solid support, a chemical linker, a peptide, oligopeptide or polypeptide linker, a saccharide, oligosaccharide or polysaccharide linker and lipid linker.

The invention further provides for a multi-functional targeting complex for inducing specific phagocytosis of at least one target pathogenic bacteria causing ulcerative disease in fish infected by said bacteria. According to this embodiment, such specific complex comprises: (a) at least one target recognition component comprising a molecule that specifically binds to *Aeromonas spp.* pathogenic bacteria which causes ulcerative disease in fish, or to any functional fragment of said bacteria; (b). an active component comprising phagocytosis inducing agent; and (c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.

As a further aspect, the invention relates to a composition for the treatment of a pathologic disorder in a subject. The composition of the invention comprises as active ingredient a multi-functional targeting complex that induces a

specific immuno-stimulatory reaction to at least one target pathologic agent. The complex comprised within the composition of the invention comprises:

(a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said pathologic agent or to any functional fragment of said agent; (b) at least one active component comprising an immuno-stimulatory agent; and (c) optionally, a connecting component that associates said at least one targeting component and said at least one active component.

The composition of the invention may optionally further comprise pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

According to one embodiment, the composition of the invention is intended for the treatment of a pathological disorder that may be any one of immuno-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders, in a subject in need of such treatment.

Such subject may be according to a preferred embodiment, any one of human, domestic mammal, domestic bird, domestic aquaculture and exotic aquaculture.

In one preferred embodiment, the composition of the invention is intended for the treatment of domestic mammals, most preferably, bovines, and particularly dairy cows.

In a particular embodiment, the pathologic disorder to be treated with the composition of the invention may be a bacterial infection. More preferably, the bacterial infection may be bovine mastitis.

Therefore, the invention further provides a composition for the treatment of mastitis in bovines. Such specific composition according to one embodiment comprises as active ingredient a multi-functional targeting complex, that induces specific phagocytosis to at least one target mastitis pathogenic bacteria in a bovine infected by said bacteria. More specifically, the complex comprised within this specific composition for mastitis, comprises: (a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said mastitis pathogenic bacteria or any functional fragment of said bacteria; (b) an active component comprising phagocytosis inducing agent; and

(c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and said active component.

According to a specifically preferred embodiment the composition of the invention comprises as an active ingredient, a complex comprising an avidin-coated polystyrene bead as a connecting component, a biotinylated IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria, as the targeting component, and an anti avidin IgG molecule, which is, most preferably, generated in bovine.

In another embodiment, the composition of the invention is intended for the treatment of domestic fish and pet/aquarium/exotic fish, which suffers of ulcerative disease caused by bacterial infection of *Aeromonas spp.* According to this embodiment, the invention therefore provides for a composition for the treatment of ulcerative disease in fish, comprising as active ingredient a multi-functional targeting complex, that induces specific phagocytosis of at least one target *Aeromonas spp.* pathogenic bacteria in fish infected by said bacteria. Such particular complex comprises: (a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said *Aeromonas spp.* pathogenic bacteria or any functional fragment of said bacteria, preferably an IgY antibody specific for *Aeromonas spp.*; (b) an active component

comprising phagocytosis inducing agent, which may preferably be an IgG molecule prepared in fish; and (c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.

The present invention further relates to a composition for inducing a specific phagocytosis targeted to at least one target pathologic agent or compound related to a pathological disorder in a subject suffering from said disorder. According to one embodiment, this composition comprises as an active ingredient, the multi-functional targeting complex of the invention, and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

According to a specific embodiment the invention relates to a composition for inducing a specific phagocytosis of at least one target mastitis bacterial pathogen in a bovine suffering from mastitis. This composition comprises as an active ingredient, the specific complex according to the invention and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

Another specific embodiment relates to a composition for inducing a specific phagocytosis of at least one target *Aeromonas spp.* bacterial pathogen in a fish suffering from ulcerative disease, which composition comprises as an active ingredient a multi-functional targeting complex according to the invention, and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

As a third aspect, the present invention relates to a method for the treatment of a pathological disorder in a subject. The method of the invention comprises

administering to the subject a therapeutically effective amount of a targeting complex or a pharmaceutical composition comprising the same. This complex comprises: (a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said pathologic agent or to any functional fragment of said agent; (b) at least one active component comprising an immuno-stimulatory agent; and (c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component.

The association of said targeting component and said active component, optionally by said connecting component, should be performed in the appropriate conformation in order to retain the independent biological functions of both the active and the targeting components.

In one embodiment, the method of the invention utilizes any one of the compositions according to the invention. More preferably, these compositions comprise as an effective ingredient any one of the targeting complexes of the invention.

In yet another embodiment, the method of the invention is intended for the treatment of a pathological disorder which may be any one of immune-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders. In a specifically preferred embodiment, the pathological disorder may be a bacterial infection.

In a particularly preferred embodiment, the invention relates to a method for the treatment of mastitis in cattle. This specific method comprises administering to the animal in need a therapeutically effective amount of the targeting complex capable of inducing specific phagocytosis targeted to at least one target mastitis pathogenic bacteria in said infected animal, or of a pharmaceutical composition comprising the same.

In yet another particularly preferred embodiment, the method of the invention utilizes a particular composition of the invention. According to this embodiment, this composition comprises as an active ingredient, a complex comprising an avidin coated polystyrene bead as a connecting component, a biotinylated IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria, as the targeting component, and an anti-avidin IgG molecule, which is, most preferably, generated in bovine. This particular composition may optionally further comprise pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

The present invention further provides for a method for the treatment of ulcerative disease in fish comprising administering to said fish in need a therapeutically effective amount of a targeting complex capable of inducing specific phagocytosis targeted to at least one target *Aeromonas spp.* pathogenic bacteria in said infected fish according to the invention, or of a pharmaceutical composition comprising the same.

The present invention further relates to the use of a multi-functional targeting complex of the invention, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a pathological disorder in a subject in need.

This pathological disorder may be according to a specific embodiment any one of immune-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders. Preferably, the pathologic disorder is a bacterial infection.

In another specifically preferred embodiment, the invention relates to the use of a specific multi-functional targeting complex, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of mastitis in cattle. This

particular complex comprises an avidin-coated polystyrene bead as a connecting component, a biotinylated IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria, as the targeting component, and an anti-avidin IgG molecule, which is most preferably, generated in cattle.

Still further, the invention relates to the use the multi-functional targeting complex of the invention, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of ulcerative disease in fish.

Brief Description of the Figures

Figure 1. Antibody activity of crude egg yolk anti-*E. Coli* IgY soluble extract (1:1000) with time post-immunization determined by ELISA (O.D at 450 nm). Abbreviations: D. Po. Imm. (days post immunization), OD (optical density).

Figure 2. Antibody activity of crude egg yolk anti-*Staphylococcus aureus* IgY soluble extract (1:100) with time post-immunization determined by ELISA (O.D at 450 nm). Abbreviations: D. Po. Imm. (days post immunization), OD (optical density).

Figure 3. Antibody activity of crude egg yolk anti-*Streptococcus uberis* IgY soluble extract (1:1000) with time post-immunization determined by ELISA (O.D at 450 nm). Abbreviations: D. Po. Imm. (days post immunization), OD (optical density).

Figure 4. The effect of anti-*E. Coli* IgY on the growth pattern of bovine *E. Coli*. Abbreviations: incu. T. min. (incubation time in minutes), cont. (control), α (anti), n. spec. (non-specific), IgY (immunoglobulines Y).

Figure 5. The effect of anti-*E. Coli* IgY on the growth of bovine *E. Coli*. Abbreviations: incu. T. min. (incubation time in minutes), cont. (control), a (anti), n. spec. (non-specific), IgY (immunoglobulins Y).

Figure 6. The targeting complex action:

Two major components are bound to the surface of the solid support (micro beads = mic. b.): (i) a targeting component (tar. comp.) comprising an antibody (IgY, receptors, IgG) specifically recognizing the target (pathogen or other target molecules) (e.g. Hormones, tumor specific antigens, viral proteins) and (ii) an active component having immuno-stimulating properties, which induces phagocytosis (IgG, complement). The targeting component binds to a specific target whereas the active component induces a non-specific host immune response (e.g. phagocytes). This targeted stimulation of phagocytosis enables specific clearance of an undesired target from the treated mammalian subject.

Figure 7. SCC in milk of cows treated (left quarters) or untreated (right quarters) with two consecutive injections of the complex of the invention targeted to *S. dysgalactia*. Abbreviations: SCC(somatic cell counts), Trea. (treated), N-Trea. (non-treated), D. Po. treat. (days post treatment).

Figure 8. The level of the *S. dysgalactia* specific complex in milk of three cows during 72 hours post injection. Abbreviations: Co. no. (cow number), T. Po. Infec. Hrs. (time post infection in hours).

Figure 9. The level of *S. dysgalactia* specific complex in milk of three cows during first 6 hours after intra-mammary injection (Means $\pm$ SD). The time point five hours, indicates pre-milking status and six hours indicates post-milking status.

Detailed Description of the Invention

A number of methods of the art of molecular biology are not detailed herein, as they are well known to the person of skill in the art. Such methods include expression of cDNAs, analysis of recombinant proteins or peptides, transformation of cells, transfection of mammalian cells, and the like. Textbooks describing such methods are e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0879698096, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, by F. M. Ausubel, ISBN: 047150388X, John Wiley & Sons, Inc. 1988, and *Short Protocols in Molecular Biology*, by F. M. Ausubel *et al.* (eds.) 8th ed. John Wiley & Sons; ISBN: 0471137812, 1995. These publications are incorporated herein in their entirety by reference. Furthermore, a number of immunological techniques are not in each instance described herein in detail, as they are well known to the person of skill in the art. See e.g., *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. (eds), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

As a first aspect, the present invention relates to a multi-functional targeting complex that induces a specific immuno-stimulatory reaction to at least one target agent, preferably a pathologic agent. The targeting complex of the invention comprises: (a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said agent or to any functional fragment of said agent; (b) at least one immunoactive component comprising an immuno-stimulatory agent; and (c) optionally, a connecting component that associates said at least one targeting component and said at least one active component, wherein the association of the targeting component and the active component, optionally via said connecting component, is such that appropriate conformation is preserved which so that the independent biological functions of both the active and the targeting components are preserved.

In one embodiment, the targeting complex of the invention induces a specific immuno-stimulatory reaction selected from the group consisting of phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement activation, and stimulation of specific T cells and B cells. This specific immuno-stimulatory reaction is targeted by the complex of the invention to at least one target pathologic agent.

As noted above, different components of the host immune system may be specifically induced by the targeting complex of the invention. In one component, phagocytes scavenge target pathologic agent, such as bacterial cells, malignant cells, undesired proteins or virus infected cells. In particular, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) has an important role in the destruction of many target cells, including tumor cells, by macrophages. Opsonization of target cells with immunoglobulin G (IgG) for example, enhances the removal of these materials from a host. The role of macrophages in the destruction of target cells by ADCC in the presence of specific antibodies has been well established. While the selectivity of macrophage targeting is based on antibody specificity, the lytic attack on the target cells is triggered by Fc receptor-mediated ADCC.

Another component of the immune system is the activation of the complement system. The two pathways of complement activation (the classical and the alternative pathways) are both directed at a central step in complement activation, the cleavage of C3. A single terminal pathway is the formation of a membrane attack complex (MAC). The classical pathway is normally activated by antigen-antibody complexes, where certain antibodies are complement fixing (capable of binding to complement to cause activation of the classical pathway). Activation of the classical pathway can be initiated with binding of C1q, the first factor of complement cascade, to the Fc region of immunoglobulin. Then, a cascade of proteolytic events results in the activation of C5 convertase, which cleaves C5 into C5b and C5a. The C5b then binds C6,

C7, C8, to form a C5b-8 complex. Binding of C9 molecules to C5b-8 forms C5b-9 (the MAC), which penetrates into lipid bilayers and forms transmembrane channels that permit bidirectional flow of ions and macromolecules. By this mechanism, complement causes lysis of the target pathologic agent (such as cells, for example).

The targeting complex of the invention stimulates an immune response towards the target pathologic agent, since the activation of phagocytes, especially macrophages, acts to regulate both T and B lymphocytes. Macrophages engulf the target pathologic agent bound to the complex of the invention and present the antigenic determinants of the target agent to T cells, stimulating an immune response (Th1, and Th2 response), which results in activation of B cells and production of antibodies against said target agent (Th1 response).

In a specifically preferred embodiment, the targeting complex of the invention induces a specific phagocytosis by any leukocyte such as any one of macrophages and monocytes, targeted to at least one target agent. A phagocyte is a cell that engulfs and devours another; the process of engulfing and devouring is phagocytosis. Among the important phagocytes for this invention are macrophages and monocytes. Monocytes are a type of large white blood cells that travel in the blood but which can leave the bloodstream and enter tissue to differentiate into macrophages. Macrophages digest debris and foreign cells. Monocytes are generally characterized by the cell surface expression of CD14.

According to another embodiment, the targeting complex of the invention is targeted against a target pathologic agent such as bacteria, viruses, fungi, malignant cells, toxins, venoms, haptens and undesired proteins. As non-limiting examples for bacterial targets the complex of the invention may be

targeted to bacteria such as, but not limited to, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, enterotoxigenic *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas spp.*, *Anthrax* and also to bacterial polysaccharide and most preferably to bacterial LPS (lipopolysaccharide). Viral targets may be for example, canine distemper virus, hepatitis in human, particularly, Hepatitis-B surface antigen, mouth and foot disease in cows, Newcastle disease virus in chicken and potato virus. Venoms may include rattlesnake and scorpion venom. The complex of the invention may also be targeted to different proteins such as transferrin, human plasmin and platelet von Willebrand factor, to small bio-active peptides such as beta-Casokinin-10 or to haptens such as 1,25-dihydroxy-vitamin-D and also to environmental pollutants.

More preferably, the target pathologic agent may be bacteria selected from the group consisting of mastitis pathogenic bacteria, enteropathogenic bacteria and pathogenic furunculosis bacteria (*Aeromonas salmonicida* in fish).

In a most specifically preferred embodiment, the targeting complex of the invention is targeted to at least one mastitis pathogenic bacteria selected from the group consisting of *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* (or *farcinica*) and *Streptococcus uberis*.

In yet another specifically preferred embodiment, the targeting complex of the invention is targeted to at least one pathogenic bacteria, *Aeromonas spp.*, which causes an ulcerative disease in fish, particularly exotic fish.

In yet another particular embodiment, the target recognition component comprised within the targeting complex of the invention, comprises any one of

antibody or any functional fragments thereof, ligand and receptor specific to said pathologic agent or to any functional fragment of said agent.

In a specifically preferred embodiment, the target recognition component comprises an antibody or any functional fragments thereof. Such antibody is capable of specifically recognizing said pathologic agent or any functional fragment of said agent, and may be, for example, IgG, IgY or IgM. Preferably, the recognition component comprises an IgY antibody or any functional fragment thereof, specific to said pathologic agent or to any functional fragment of said agent.

The term "antibody" is meant to include both intact molecules and fragments thereof, such as, for example, Fab and F(ab')₂, which are capable of binding antigen. Fab and F(ab')₂ fragments lack the Fc fragment of intact antibody, clear more rapidly from the circulation, and may have less non-specific tissue binding than an intact antibody [Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24:318-325, (1983)]. It will be appreciated that Fab and F(ab')₂ and other fragments of the antibodies, and particularly ScFv are useful in the present invention may be used as the targeting component of the complex, by the same methods disclosed herein for intact antibody molecules. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage, using enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')₂ fragments) or by molecular procedures.

An antibody is said to be "capable of specifically recognizing" or "specific for" or "specific to" a certain target cell (bacterial cell or malignant or virus infected eukaryotic cell) if it is capable of specifically reacting with an antigen which is in this particular example an extracellular marker molecule expressed by said cell, to thereby bind the molecule to the antibody.

An "antigen" is a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by an antibody, and which is additionally capable of inducing an animal to produce antibody capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one, or more than one epitope. The term "epitope" is meant to refer to that portion of any molecule capable of being bound by an antibody that can also be recognized by that antibody. Epitopes or "antigenic determinants" usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains, and have specific three-dimensional structural characteristics as well as specific charge characteristics.

It is to be appreciated that functional fragments of the target, is any fragment that can be recognized by the targeting component of the complex of the invention. In a preferred embodiment when the targeting component is an antibody, the said fragment may be an epitope recognized by said targeting component.

According to a specific embodiment, the targeting complex of the invention comprises as the active component an immuno-stimulatory active component. More particularly, this immuno-stimulatory agent induces phagocytosis. Therefore, binding of the target component to the pathologic target agent, and activation of phagocytosis by said activating component, results in the selective phagocyte-mediated ablation of the undesirable target.

The phagocytosis-inducing agent comprised within the targeting complex of the invention as an immunoactive component, may be according to a specific embodiment, a polypeptide, naturally expressed on a cell surface, which is capable of stimulating an immune response against the cell in a host. Polypeptides appropriate for use as immunostimulatory cell surface polypeptides include, but are not limited to, the following:

a. opsonins such as IgG and C3b;

- b. proteins with carbohydrate residues that interact with the mannose-fucose receptor of phagocytes;
- c. proteins capable of recognition by receptors on scavenger macrophages;
- d. ligands for integrins located on phagocytes;
- e. glycoproteins, such as integrins and selectins; and
- f. fucosyl transferase, which generates a Gal-Gal epitope recognized by macrophages.

According to a specific embodiment, immunoglobulin G (IgG) is the preferred immunostimulatory active component for use in this invention. An IgG protein contains (1) a Fab region (including the VH, VL and CH₁ domains); (2) a hinge region, and (3) an Fc region (including the CH₂ and CH₃ domains). The Fab region is the region of an antibody protein which includes the antigen-binding portions. The "hinge" region is a flexible area on the immunoglobulin polypeptide that contains many residues of the amino acid proline and is where the Fc fragment joins one of the two Fab fragments. The Fc region is the constant region on an immunoglobulin polypeptide; is located on the immunoglobulin heavy chains; and is not involved in binding antigens. The Fc region can bind to an Fc receptor on phagocytes. The amino-proximal end of the CH₂ domain, especially amino acids 234 to 237, is important for binding of the Fc region to the Fc receptor. Fc receptors, such as Fc RI, are integral membrane proteins located on phagocytic white blood cells, such as macrophages. The hinge region is important for regulating Fc-Fc receptor interactions, providing flexibility to the polypeptide and functioning as a spacer.

The immunoglobulin used for immunostimulatory component can be obtained from any vertebrate, such as human or mouse. Preferably, the polynucleotide encodes an immunoglobulin having a substantial number of sequences that are

of the same origin as the host. For example, if a human is treated with a complex of the invention, preferably the immunoglobulin is of human origin.

Therefore, it is to be appreciated that preferably, the IgG is generated in the same species as the subject affected by said pathologic agent.

IgG Fc associated to solid support (or any other optional connecting component) in the reverse orientation, retains the biological function of IgG Fc of binding Fc receptor to mediate macrophage activation. Therefore it is to be noted that the IgG Fc, should project away from the connecting component of the complex of the invention, in a "reversed orientation", thus mimicking the configuration of IgG during opsonization. This IgG which serves as the active component binding the Fc receptor to activate phagocytes, such as macrophages, and may also activate the complement cascade ("complement fixation").

Phagocytes respond to signals from the Fc receptors by assembling cytoskeletal proteins, signaling cytoskeletal-protein assembly by activation of protein tyrosine kinases, and by "phagocytosing" the cell coated with immunoglobulin. IgG-Fc RI interaction activates various biological functions such as phagocytosis, endocytosis, ADCC, release of inflammatory mediators and superoxide anion production. Macrophages possess organic anion transporter proteins that promote the efflux of anionic substances from the macrophage. Thus, Fc RI mediates ADCC by macrophages and triggers both phagocytosis and superoxide production. For that reason, the complexes of the invention where the Fc domain of IgG is associated as an active component, interact with phagocyte Fc receptor and cause phagocytes to bind to the complex bound to the target pathologic agent (through its targeting component), inducing ADCC. The IgG₁ and IgG₂ isotypes, that interact with the high affinity receptor Fc RI on macrophages, are preferred for the complexes and methods of the invention.

Macrophages, dendritic cells and B cells are all antigen presenting cells (APC), which can also present antigens to T cells. In this way, APCs are involved in other components of the immune response, including the humoral immune response (antibody production) and cellular immune response. Thus, APCs which engulf the complex of the invention which stimulates binding and entrance of the pathogen via Fc receptor, present the antigenic determinants of the target agent to T cells, stimulates cellular and humoral immune response specific for the target agent. This particular possibility is especially advantageous in viral infections where no effective therapy is available. Therefore, the complex of the invention may be used as a specific therapy in viral infections.

According to another preferred embodiment, the optional connecting component comprised within the targeting complex of the invention, may be any one of a solid support such as polystyrene beads, Sepharose beads, agarose beads, cellulose beads, a chemical linker, a peptide, oligopeptide or polypeptide linker, a saccharide, oligosaccharide or polysaccharide linker, poly-amine and lipid linker and any protein or particularly scaffold protein.

As indicated above, both active and targeting components may be associated by a chemical linker to the optional connecting component. Alternatively, the chemical linker itself may function as the connecting component. Cross-linking proteins is well known in the art, see e.g., *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, Shan S. Wong, CRC Press, 1991. Proteins may be cross-linked by their functional groups. Usually, the SH or NH₂ groups of proteins are used for that purpose. Chemical groups that react with SH groups include e.g., dithio groups, including pyridyldithio groups, haloacetamido groups, including iodoacetamido groups, maleimido groups, including alkylmaleimido groups, and the like groups known to the skilled person. Amino groups may be

coupled using optionally sulfonated N-hydroxysuccinimide ester groups, imidoester groups, including methyl pimclimide and methyl suberimide groups, or carbodiimide groups. Also free carboxyl groups of a protein may be used for cross-linking, e.g. using an amino group such as an alkylamino group, and providing a dehydrating agent in the reaction.

The cross-linker used for proper association of both complex components may be homobifunctional or heterobifunctional. Examples for homobifunctional cross-linkers include disuccinimidyl suberate (DSS), disuccinimidyl glutarate (DSG) and dimethyl suberimide (DMS). Examples for heterobifunctional cross-linkers include m-maleimideobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) and N-gamma-maleimidobutyryloxy-succinimide ester (GMBS). In yet another embodiment of the invention, a cross-linker is capable of reacting unspecifically with proteins, for instance by photoactivation. Examples for photoreactive groups are e.g., the azidobenzoyl, azido-nitrobenzoyl, azido-hydroxybenzoyl or azido-coumarin groups. Examples of photoreactive cross-linkers include p-nitrophenyl-2-diazo-3, 3, 3-trifluoropropionate (PNP-DTP) and azidobenzoyl hydrazide.

A carbohydrate-reactive cross-linker may be also used. Carbohydrate reactive groups include e.g., the aldehyde group, the glyoxal group, or the sulfone group. Cross-linkers reactive with carbohydrates include e.g., the above azidobenzoyl hydrazide, 4-[m-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxyl-hydrazide (M_2C_6H), or 4-(4-N-maleimidophenyl)-butyric acid hydrazide (MPBH). If any of the complex components (active, targeting and optionally connecting component) does not comprise cysteine residues, a photoreactive cross-linker or an amino-reactive cross-linker may be used, such as the activated N-hydroxy succinimide derivative of the above M_2C_6H or MPBH, e.g., 4-(4-(succinimido-N-oxo)-phenyl)-butyric acid hydrazide. Alternatively, when it is desired to use the above carbohydrate and sulfhydryl-reactive cross-

linkers, a second cross-linker may be used, which may be linked to the sulfhydryl-reactive moiety of the first cross-linker. The protein may then be coupled via the second functionality of the second cross-linker, which advantageously is a group reactive with amino groups, such as an activated N-hydroxy succinimide ester group.

The above noted cross-linkers are commercially available, e.g., from PIERCE, as listed at p. O-90 to O-104 of the 1994 Life Sciences Product Catalog and Handbook of PIERCE, Rockford, IL 61105 USA, or from other suppliers in the field of organic chemistry, such as e.g., Sigma, St. Louis, USA.

US 5,399,501 describes the conjugation of immunologically active proteins, e.g. antibodies, to a solid phase via a rather elaborate set of three distinct molecules: first, a cross-linker which binds to amino, carboxyl or thiol groups on the surface of the solid phase and provides a group capable of reacting with thiols (e.g. maleimide); second, a cross-linker that binds to NH_2 groups of the protein to be conjugated and also provides a group capable of reacting with thiols (e.g. maleimide), and third, a dithiol reagent capable of joining the solid-phase bound thiol-reactive group with the protein-bound thiol-reactive group. This set of cross-linkers may also be used in the present invention, for the purpose of cross-linking of the targeting component (e.g., IgY) and the active component (IgG) together, or associating both components to a connecting component (such as a solid support, beads, etc.).

In another embodiment of the invention, the active component or the targeting component may be cross-linked directly to the connecting component that may be for example a solid support comprising carbohydrates. This may be accomplished e.g., by using a bifunctional cross-linker capable of reacting with carbohydrates on the one hand, and with proteins on the other. For instance, the cross-linker azidobenzoyl hydrazide (ABH) may be coupled to the active or

the targeting component, using the photoactivatable azide group of the cross-linker to nonspecifically bind to said component. In a second step, this "activated" component may then be reacted with the solid support, whereby the carbohydrate-reactive hydrazide group of the cross-linker binds to glucose units in the carbohydrate. This non-covalent bond may then be allowed to form, depending upon the reaction conditions, such as concentration of salt, presence of caustic solutions, reaction time, and the like, to form the desired complex.

Association of both components may be carried out for example using a peptide linker as the connecting component. The peptide linker is a peptide of suitable amino acid sequence which is expected not to interfere with the secondary and tertiary structure of both components. The linker peptide may be connected to the active or the targeting component by a cross-linker, as described above for linking proteins. The necessary functional groups for cross-linking may be provided in the linker peptide by the choice of amino acids. For instance, lysine or arginine is chosen when it is desired to use amino groups for cross-linking. cysteine residues are chosen when it is desired to use sulfhydryl groups for cross-linking. Glutamic acid or aspartic acid may be chosen when it is desired to use carboxylic acid groups for cross-linking. Groups that are not desired to be reacted may be protected by a suitable protection group as known in the art for amino, carboxyl, or sulfhydryl groups.

The linker may preferably comprise between 10 and 160 amino acids in length. Further preferably, the linker comprises small, uncharged amino acids, such as glycine, alanine, valine, serine, or threonine. The linker preferably contains glycine and serine residues. The ratio between the glycine and serine residues is preferably about 3:1 to 4:1. An example for a 17 amino acid Glycine/Serine linker is GGGGSGGGSGGGGSGG.

Alternatively, both components may be linked via a peptide, by using recombinant DNA technology.

In one preferred embodiment, association of both active and target component through a solid support, may be preformed by the avidin-biotin system, as described in a large number of publications. The avidin molecule is a protein originally isolated from chicken egg protein. This protein may be expressed as a fusion protein with one of the complex components, or preferably may be cross-linked to the connecting component (solid support, such as beads). The other component may then be cross-linked to biotin, which is a small vitamin molecule. Methods for cross-linking biotin to proteins are well known to the person of skill in the art, and have been widely published in many articles and text books. In yet another option, the connecting component may be an avidin molecule or any fragment thereof. In such case, the targeting component should be biotinylated and the immunoactive component would be an anti avidin IgG antibody. It is to be appreciated that other high affinity systems may be used for associating the complex of the invention. Such systems include as non-limiting example the GST-glutathione system and CBD-cellulose.

In another preferred embodiment, the complex of the invention comprises only target component and immunoactive component. Both components are directly attached without any connecting component. According to this particular embodiment, the target component may be an antibody targeted against the target agent, for example an IgY antibody, and the active component would be an IgG anti IgY antibody. Binding of both components retains the appropriate conformation (having the Fc of the IgG molecule free).

It is to be appreciated that any targeting complex of the invention may be comprised of different targeting components targeted to different fragments of a target pathogen or to different pathogens.

In a particular embodiment, the invention relates to a multi-functional targeting complex that induces specific phagocytosis of at least one target mastitis pathogenic bacteria in cattle infected by said bacteria. This specific complex comprises: (a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to the mastitis pathogenic bacteria or to any functional fragment of said bacteria; (b) at least one immunoactive component comprising phagocytosis inducing agent; and (c) optionally, a connecting component that associates said at least one targeting component and said at least one active component. Both active and targeting components are associated, optionally by the connecting component, in an appropriate conformation which preserves the independent biological functions of both components.

This targeting complex according to a specific embodiment comprises as a target recognition component, an IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria. More specifically, the targeting complex of the invention may comprise at least one IgY antibody specific for at least one of the mastitis pathogenic bacteria such as, but not limited to, *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* (or *farcinica*) and *Streptococcus uberis*, *mycoplasma*, *viruses* and *endotoxins*.

Optionally, said complex may comprise different IgY antibodies, each targeted to a different mastitis pathogenic bacteria.

According to a specifically preferred embodiment, the targeting complex of the invention comprises as a phagocytosis-inducing agent an IgG molecule preferably generated in a bovine animal.

In another specific embodiment, the invention relates to a multi-functional targeting complex for inducing specific phagocytosis of at least one target pathogenic bacteria causing ulcerative disease in fish infected by said bacteria, said complex comprises: (a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to *Aeromonas* spp. pathogenic bacteria which causes ulcerative disease in fish, or to any functional fragment of said bacteria; (b) an active component comprising phagocytosis inducing agent; and (c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.

The particular targeting complexes of the invention may optionally further comprise as a connecting component, any one of, but not limited to, a solid support, a chemical linker, polypeptide linker, protein, polysaccharide linker and lipid linker.

Such solid support may be for example a polystyrene micro-sphere bead, and more particularly, an avidin-coated polystyrene bead. In this particular case, the target recognition component may be a biotinylated IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria. Further, this particular targeting complex may preferably comprise as the phagocytosis-inducing agent, an anti-avidin IgG molecule, which is most preferably, generated in a bovine animal.

In a further aspect, the invention relates to a composition for the treatment of a pathologic disorder in a subject. The composition of the invention comprises as active ingredient a multi-functional targeting complex in accordance with the invention.

The composition of the invention may optionally further comprise pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluant, excipient and/or additive.

According to one embodiment, the composition of the invention is intended for the treatment of a pathological disorder that may be any one of immune-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders, in a subject in need of such treatment.

The pathological disorder to be treated may be a viral infection caused by different viruses such as influenza virus, human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, vaccinia virus, hepatitis virus, mouth and foot disease, Newcastle disease virus and herpes virus, or a malignant disease such as melanoma, carcinoma, lymphoma and sarcoma.

The subject to be treated may be according to a preferred embodiment, any one of human, domestic and non-domestic mammal, domestic bird, aquaculture, preferably, fish and exotic aquarium fish. It should be appreciated that the treated subject may be also any reptile or zoo animal. More preferably, the composition of the invention is intended for domestic mammals. By "mammalian subject" is meant any mammal for which the proposed therapy is desired, including human, equine, canine, feline subjects, and most preferably, cattle, particularly bovine animals such as cows, goats and sheep. In yet another specific embodiment, the composition of the invention is intended for the treatment of domestic fish and exotic fish such as for example, carp and Koi fish.

In a particular embodiment, the pathologic disorder to be treated with the composition of the invention may be a bacterial infection. More preferably, the bacterial infection may be bovine mastitis.

Therefore, the invention further provides a composition for the treatment of mastitis in bovine animals. Such specific composition according to one embodiment comprises as active ingredient a multi-functional targeting complex that induces specific phagocytosis to at least one target mastitis pathogenic bacteria in bovine infected by said bacteria. More specifically, the complex comprised within this specific composition for mastitis, comprises:

(a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said mastitis pathogenic bacteria or any functional fragment of said bacteria; (b) an active component comprising phagocytosis-inducing agent; and (c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component. It is to be noted that by association of both components, optionally by the connecting component, the independent biological functions of the targeting component and the active component are preserved.

According to a specifically preferred embodiment the composition of the invention comprises as an active ingredient, a complex comprising an avidin-coated polystyrene bead as a connecting component, a biotinylated IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria, as the targeting component, and an anti-avidin IgG molecule, which is most preferably, generated in a bovine animal.

The invention further provides for a composition for the treatment of ulcerative disease in fish. Such specific composition comprises as active ingredient a multi-functional targeting complex, that induces specific phagocytosis to at least one target *Aeromonas* spp. pathogenic bacteria in fish infected by said bacteria, said complex comprises: (a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said *Aeromonas* spp. pathogenic bacteria or any functional fragment of said

bacteria, preferably, such component may be IgY antibody which specifically recognizes antigenic determinants on said bacteria; (b) an active component comprising phagocytosis inducing agent, preferably, an immunoglobuline molecule generated in fish; and (c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.

The present invention further relates to a composition for inducing a specific phagocytosis targeted to at least one target pathologic agent related to a pathological disorder in a subject suffering from said disorder. According to one embodiment, this composition comprises as an active ingredient, the multi-functional targeting complex of the invention, and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

According to a specific embodiment the invention relates to a composition for inducing a specific phagocytosis of at least one target mastitis bacterial pathogen in a female bovine animal suffering from mastitis. This composition comprises as an active ingredient, a complex comprising an avidin-coated polystyrene bead as a connecting component, a biotinylated IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria, as the targeting component, and an anti-avidin IgG molecule, which is most preferably, generated in bovine and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or an active or supporting additive.

In yet another particular embodiment, the invention further provides for a composition for inducing a specific phagocytosis of at least one target *Aeromonas* spp. bacterial pathogen in a fish suffering from ulcerative disease. Such specific composition comprises as an active ingredient a multi-functional

targeting complex according to the invention, and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

In a third aspect, the present invention relates to a method for the treatment of a pathological disorder in a subject. The method of the invention comprises administering to the subject a therapeutically effective amount of a targeting complex according to the invention or of a pharmaceutical composition comprising the same.

As used herein, "effective amount" means an amount necessary to achieve a selected result. For example, an effective amount of the composition of the invention useful for inducing targeted immune-stimulatory effect, and preferably, phagocytosis towards the target pathologic agent.

The complex of the invention may be administered directly to the subject to be treated, or it may be desirable to administer to the subject compositions comprising said targeting complex and it may be desirable to add acceptable carriers, adjuvants or diluents to the composition prior to its administration. Therapeutic formulations may be administered in any conventional dosage formulation. Formulations typically comprise at least one active ingredient, as defined above, together with one or more acceptable carriers thereof.

Each carrier should be both pharmaceutically and physiologically acceptable in the sense of being compatible with the other ingredients and not injurious to the subject. Formulations include those suitable for oral, rectal, nasal, or parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous, intramammary and intradermal) administration. The formulations may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any

methods well known in the art of pharmacy. The nature, availability and sources, and the administration of all such compounds including the effective amounts necessary to produce desirable effects in a subject are well known in the art and need not be further described herein.

The compositions of the invention may further contain a pharmaceutically acceptable carrier, additive, diluent or excipient. Suitable carriers include, e.g., saline phosphate buffered saline, and saline with 5% HSA or PPF. Other suitable carriers are well known to those of skill in the art and are not a limitation on the present invention. Similarly, one of skill in the art may readily select other desired components for inclusion in a pharmaceutical composition of the invention, and such components are not a limitation of the present invention.

The pharmaceutical compositions of the invention generally further comprise a buffering agent, an agent which adjusts the osmolarity thereof, and optionally, one or more pharmaceutically acceptable carriers, excipients and/or additives as known in the art. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions. The carrier can be solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants.

The composition of the invention may be mixed with nutritive feed material or water supplies for the animal. It is contemplated however that the effective composition can either be mixed with the nutritive feed material or water or fed to the animal separately. The effective composition must be provided in an

amount effective to stimulate targeted immuno-stimulatory reaction and preferably, phagocytosis towards the pathologic agent.

More preferably, the complex or compositions of the invention may be administered by a route selected from oral, intravenous, parenteral, transdermal, subcutaneous, intravaginal, intranasal, mucosal, sublingual, topical and rectal administration and any combinations thereof. For the treatment of mastitis, topical intramammary administration is preferred. For the treatment of ulcerative disease, particularly, furculosis in fish, topical or intraperitoneal administration are preferred. It should be noted that preferred topical treatment of fish may be performed by dipping the fish in water containing the specific complex of the invention.

The pharmaceutical forms suitable for injection use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi.

The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above.

In the case of sterile powders for the preparation of the sterile injectable solutions, the preferred method of preparation are vacuum-drying and freeze drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

In one embodiment, the method of the invention utilizes any one of the compositions according to the invention. More preferably, these compositions comprising as an effective ingredient any one of the targeting complexes of the invention.

In yet another embodiment, the method of the invention is intended for the treatment of a pathological disorder which may be any one of immune-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders.

In a specifically preferred embodiment, the pathological disorder may be a bacterial infection.

In a particularly preferred embodiment, the invention relates to a method for the treatment of mastitis in bovine. This specific method comprises administering to said bovine in need a therapeutically effective amount of a targeting complex capable of inducing specific phagocytosis targeted to at least one target mastitis pathogenic bacteria in said infected bovine, or of a pharmaceutical composition comprising the same, said complex comprises:

(a) at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said pathologic agent or to any functional fragment of said agent; (b) an active component comprising an immuno-stimulatory agent; and (c) optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component. The association of said targeting component and said active component, optionally by said connecting component, should retain the independent biological functions of both the active and the targeting components.

The invention further provides a method for stimulating specific phagocyte activity. A targeting complex containing the IgG is made to contact a phagocyte, such as a macrophage or other APC. The contact stimulates an increased phagocytic activity by the phagocyte. The phagocyte may engulf the complex bound to the target agent and enables rapid clearance of said pathologic agent from the host.

In yet another particularly preferred embodiment, the method of the invention utilizes a particular composition of the invention. According to this embodiment, this composition comprises as an active ingredient, a complex comprising an avidin-coated polystyrene bead as a connecting component, a biotinylated IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria, as the targeting component, and an anti avidin IgG molecule, which is most preferably, generated in bovine. This particular composition may optionally further comprise pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

Still further, the invention relates to a method for the treatment of ulcerative disease in fish comprising administering to said fish in need a therapeutically effective amount of a targeting complex capable of inducing specific phagocytosis targeted to at least one target *Aeromonas* spp. pathogenic

bacteria in said infected fish according to the invention, or of a pharmaceutical composition comprising the same.

The present invention further relates to the use of a multi-functional targeting complex of the invention, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a pathological disorder in a subject in need.

This pathological disorder may be according to a specific embodiment any one of immune-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders. Preferably, the pathologic disorder is a bacterial infection.

In another specifically preferred embodiment, the invention relates to the use of a specific multi-functional targeting complex, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of mastitis in bovine. This particular complex comprising an avidin-coated polystyrene bead as a connecting component, a biotinylated IgY antibody specific for mastitis pathogenic bacteria, as the targeting component, and an anti avidin IgG molecule, which is most preferably, generated in bovine.

In yet another embodiment, the invention relates to the use of another particular multi-functional targeting complex, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of mastitis in bovine. Such complex comprises a targeting component and an immunoactive component, both are directly attached without any connecting component. According to such embodiment, the targeting component may be an IgY antibody directed against mastitis pathogenic bacteria, and the immunoactive component is an IgG anti IgY antibody. Binding of both components retains the appropriate conformation (having the Fc of the IgG molecule free).

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All patents and publications cited in this specification are incorporated by reference.

Disclosed and described, it is to be understood that this invention is not limited to the particular examples, process steps, and materials disclosed herein as such process steps and materials may vary somewhat. It is also to be understood that the terminology used herein is used for the purpose of describing particular embodiments only and not intended to be limiting since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims and equivalents thereof.

Throughout this specification and the claims which follow, unless the context requires otherwise, the word "comprise", and variations such as "comprises" and "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated integer or step or group of integers or steps but not the exclusion of any other integer or step or group of integers or steps.

It must be noted that, as used in this specification and the appended claims, the singular forms "a", "an" and "the" include plural referents unless the content clearly dictates otherwise.

The following examples are representative of techniques employed by the inventors in carrying out aspects of the present invention. It should be appreciated that while these techniques are exemplary of preferred embodiments for the practice of the invention, those of skill in the art, in light of the present disclosure, will recognize that numerous modifications can be made without departing from the spirit and intended scope of the invention.

Examples

Experimental procedures

Bacteria

Specific mastitis pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, and *E. coli*) were either purchased from ATCC (Hy Lab, Rehovot, IL) or taken from stocks of the Israeli Veterinary Authorities (Beit Dagan, IL), according to the following accession numbers; *Staphylococcus aureus*, 2449/1; *E. coli*, Ein Hashofet 169. ATCC: *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956, *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 27957, *Streptococcus uberis* ATCC 27958.

Antigen preparation

Bacteria as well as purified proteins were used as antigens for the production of specific IgY. Bacteria were cultured in a specific medium as indicated below, and were prepared for vaccination as follows;

Freeze dried bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *dysgalactiae* and *uberis*) were thawed [1 ml Nutrient broth (NB) (Difco, Detroit, MI)], inoculated on blood agar and incubated at 37° C for 24 h to confirm vitality and purity. 8-4 colonies were selected and inoculated in 250 ml 37°C Columbia broth (CB) (Difco, Detroit, MI) (12-24 h at 37°C) supplemented with 0.1% D-glucose, yeast extract, and 0.5% NaCl in a 1 liter Erlenmeyer and incubated at 37°C for 10 h. *Streptococcus* were inoculated in 250 ml NB at 37°C. The bacteria were separated by centrifugation (1000 x g, 15 min) and the pellet was washed (x 3) and resuspended in non-pyrogenic PBS (pH 7.6; 0.01M) to approximate 1.2×10^9 cells, as indicated by McFarland equivalence turbidity standard 4 (1.2×10^8 cell/ml) (remel, 12076 Santa Fe, Lenexa, Ka). To confirm purity, blood agar plates were inoculated and incubated. The pellet was subjected to mechanical agitation with glass beads by cell homogenizer (Braun

Melsungen AG, Germany). After removal of the glass beads and intact bacteria, the homogenate was filtered through 0.2 μ m-pore-size membranes, protein concentrations were determined with the Protein Assay kit (Bio-Rad, UK) and stored at -20°C. To confirm sterility, blood agar plates were inoculated and incubated under appropriate conditions.

In an additional method, bacteria were inoculated and allowed to grow as described above. After incubation, bacteria were harvested by centrifugation at 10,000 x g for 20 minutes and then suspended in 50 mM PBS (pH 7.0). Bacteria were then divided into three groups for the following processes: (1) inactivation with formaldehyde (0.05%), (2) inactivation by heat (100°C for 10 minutes), and (3) sonication. A mixture of the treated fractions was used for vaccination.

Preparation of E. coli antigen

E. coli were cultured in 250 ml NB (Difco, Detroit, MI), in a 1 liter Erlenmeyer and incubated at 37°C for 24 h. The bacteria pellet was sonicated with glass beads as described above.

Preparation of the targeting component

Production of IgY

Three to six, 35-50 wk-old commercial White Leghorn hens per group were immunized by an intramuscular injection at two sites of breast muscle of 0.05-0.5-0.5mg of antigen with Freund's incomplete adjuvant, in a total volume of 0.8-1.0 ml per chicken. The adjuvant comprised half of the injected volume. A booster injection was given intramuscularly 2-3 wk thereafter with the same dose emulsified with Freund's incomplete adjuvant. Blood samples were collected from wing vein on every week after the initial injection. Eggs were collected daily and stored below 20°C until analyzed.

Isolation of IgY from egg yolk

IgY were isolated from by the following steps:

1. Separation of the yolk from the white;
2. Water dilution of yolks (10 ml yolk to 100 ml water), pH = 6.8 and stirring with an electric mixer in temperature less than 20 C for 4-6 hrs;
3. Delipidation - by filtration of the soluble water fraction under vacuum through a filter paper (1574 Bunfilter, Schleicher & Schuell GmbH, Germany).
4. Precipitation of the soluble filtered proteins by ammonium sulfate (60 % w/v)
5. Centrifugation (10000g, 20 min) and re-suspending the precipitate in ammonium sulfate (60% w/v) medium at 4°C.
6. Isolation of the IgY by gel filtration, using T-gel (Pierce, USA), anion-exchange (DEAE-Sephacel) and gel filtration (Ultragel AcA 22) techniques.
7. The crude (5) or the purified (6) IgY were diluted in a serial 1:10 dilution order with PBS before use.

IgY Specificity

Since most commercial birds are routinely vaccinated against NDV (New Castle Disease), anti-NDV antibodies were used to test the efficiency of IgY isolation. This was done by hemagglutination inhibition test.

ELISA for intact bacteria

Quantitative ELISA for measurement of specific anti-bacteria IgY concentrations and Standard IgY: Wells in a plate were coated overnight with 100 µl of polylysine (10µg/ml), then 200µl of specific bacteria in broth (0.8 OD)

were added. Twenty four hrs later, 100 μ l of glutaraldehyde (0.07%) were added for 15 min and washed with PBS. Wells were blocked with 100 μ l of 2% milk powder and 100mM glycine. Crude samples of IgY were serially diluted in PBS (Akita and Nakai, 1992) and 100 μ l of serial 1:10 dilution in duplicates were applied to the wells. Plates were incubated at 37°C for 2 h and washed with PBS-T (Phosphate Buffer Saline- TWEEN20 TM) and then incubated with 100 μ l of rabbit anti-chicken IgY conjugated with horseradish peroxidase (1:10000 in PBS). After incubation at 37°C for 1 h, plates were washed three times with PBS-T (Phosphate Buffer Saline - TWEEN 20), followed by addition of 100 μ l of freshly prepared substrate solution, 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) in 0.05 M phosphate citrated buffer (pH 5.0). The optical density at 450 nm was then recorded.

IgY and bacteria growth pattern- Agglutination test

In order to examine the extent of out-membrane antigen recognition by IgY and its inhibitory effect on bacterial growth, various bacterial pathogens [10^7 CFU/ml (colony forming units) E-media broth] were cultured in a tripticase soy broth (TSB) in the presence of specific- and non-specific control IgY. IgY concentration ranged between 250-500 μ g/ml were incubated at 37°C for 1 to 8 h. The bacteria growth curve was calculated using optical density measurement at 590 nm.

Antigen-Antibody Binding and Pathogen Growth Pattern

The effectiveness of IgY to bind, neutralize or reduce the proliferation of various mastitis pathogenic bacteria was examined in an additional method. Mastitis pathogen (10^7 CFU/ml E-media broth) was cultured in TSB with specific- and non-specific control IgY (250-500 μ g/ml) and allowed to incubate at 0-4°C for 80 min. Then cultures were diluted to serial dilutions with a sterile TSB and 10 μ l (in triplicates) of the diluted medium, were inoculated on the

appropriate plate and were incubated at 37°C for 24 hrs. The colonies of each treatment were counted and their size was measured.

Micro/nano carrier preparation

Commercial carboxylated microbeads are activated by using 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) in the presence of Avidin. The EDC activate the carboxyls group and allowed efficient coupling of amine group in avidin with carboxyl group. This results in formation of amide bonds coupling avidin molecules to each micro-bead.

Attachment of the targeting component to the activated beads

At the first stage, IgY antibody (specific anti *E. coli* IgY for example) is biotinylated using Sulfo-NHS-biotin reagent using common biotinylation method. The resulting biotinylated anti *E. coli* IgY is then mixed with Avidin-microbeads at various ratio for 1 hr at room temp. This step is followed by addition of Bovine anti Avidin antibody which allowed to reacted with the microbead-Avidin-Biotinylated-IgY. In this context, antibody was raised in calf immunized with Avidin.

Development of an in-vitro assay for phagocytosis

The present procedure was adapted from the TECHNICAL DATA SHEET 430 (2001) of PolySciences Inc (PA, USA).

Polystyrene microparticles (1, 2 and 3 μm) have been used for phagocytosis studies. To elicit this response, the particles were first coated with avidin, then a specific bovine IgG anti-avidin and the specific IgY produced against mastitis pathogens were bound, as described above. Microbeads (1 μm , 1×10^5 per group), were coated with various ratios of IgG:IgY (0.6 to 0.7 $\mu\text{g/ml}$, 60 min 37 C). After opsonization, one million microbead coated components were

incubated with or without 10^7 E. coli bacteria and were exposed to cow blood phagocytes (granulocytes, monocytes, and macrophages). Cells were continuously mixed for 60 min at 37°C during which phagocytosis occurs. The reaction was then stopped by the addition of ice cold PBS, centrifuged $1000 \times g$ for 5 min and samples of $10 \mu\text{l}$ diluted in a 1:10 order were applied on a tryptic soy agar plate for determination of CFU. Then the cells were washed to remove any free particles in the medium and re-suspended in cold deionized H_2O and analyzed for the number of bacteria. This procedure enables the determination of phagocytic activity by measuring the number of bacteria left in medium after incubation with known numbers of bacteria with the described complex.

Phagocytosis assay with multi-functional targeting complex (microbead coated components)

- (1) 200 μl of anticoagulated whole blood were added to a polypropylene tube.
- (2) 10 μl of microbead coated components (10^6 particles/ml) were added to the tube and incubated with gentle shaking for 30 to 60 min at 37°C .
- (3) At the end of the incubation phagocytosis is terminated by adding 2 ml of ice cold PBS and mixing.
- (4) The cell pellet is re-suspended in 8 ml of sterile water and gently mixed for 20 to 30 seconds. 1 ml of 3.5% NaCl is added to make the suspension isotonic and the cells are pelleted by centrifuging at $500 \times g$ for 5 min.
- (5) The cells were resuspended in 500 μl of cold PBS, and samples were kept at 4°C , and analyzed as soon as possible.

SCC (Somatic cell counts)

The SCC was determined with a Coulter cell counter (CC), Z1 model, Coulter Electronics Limited, Luton, UK).

N-acetyl-D-glucosaminidase (NAGase)

The concentration of NAGase in milk was fluorometrically determined according to the ADLMILK NAGase test, (ADC Applied Diagnostics Corporation, Helsinki, Finland) with a computerized microplate setting. A value of 100 units corresponds to a release of about 5 μ mol of product per liter per minute at 25°C.

ELISA procedure for measuring IgY in milk

Quantitative ELISA for measurement of specific anti-bacteria IgY concentrations in milk: Walls of ELISA plate were coated overnight with 100 μ l of Rabbit-anti-IgY-Fc, then were blocked for 1 hr in 37°C with 200ul of 2% milk buffer. Volume of 100 μ l the tested solution or commercial IgY (used for standard curves) was added to the ELISA plates and incubated for 1hr in 37 °C, followed by five washes with PBS plus Tween 20 (0.1%). Plates were then incubated with 100 μ l of rabbit anti-chicken IgY conjugated with horseradish peroxidase (1:1000 in PBS). After incubation at 37°C for 1 h, plates were washed five times with PBS-T (Phosphate Buffer Saline – TWEEN 20), followed by addition of 100 μ l of freshly prepared substrate solution, 2-2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) in 0.05 M phosphate citrated buffer (pH 5.0).

Example 1***Preparation of targeting component targeted against bovine mastitis bacterial pathogens******Immune response against bovine mastitis E. Coli***

IgY antibodies specific for bovine mastitis E. Coli were prepared as detailed in experimental procedures. The effectiveness of specific anti-pathogen IgY in prevention or treatment of bovine mastitis, was next examined.

The activity of antibody (OD of the crude sodium sulfate egg yolk precipitate diluted by 1:1000) against mastitis intact E. Coli was determined by ELISA using the egg yolk preparation from laying hens as shown in Fig. 1. The pre-immune antibody activity was below 0.2 OD, increased rapidly 3 weeks later and reached a plateau thereafter.

Immune response against bovine mastitis Staphylococcus aureus

The activity of antibody (diluted by 1:100) against mastitis intact Staphylococcus aureus, that was prepared according to experimental procedures, was determined by ELISA as described above.

As shown in Fig. 2, antibody activity increased markedly one-week post immunization, then decreased about half way down and reached a plateau thereafter. However the titer was lower than that found against E. coli.

Immune response against bovine mastitis Streptococcus uberis

The activity of antibody (diluted by 1:1000) against mastitis intact Streptococcus uberis was determined by ELISA as described above. Antibody activity increased markedly two-week post immunization and reached a plateau thereafter, as shown by Fig. 3.

Example 2***Agglutination of mastitis pathogen growth using IgY specific antibodies******Agglutination assay of mastitis E. Coli***

In order to evaluate the extent of out-membrane antigen recognition by IgY and its inhibitory effect on bacterial growth, various bacterial pathogens (10^7 CFU/ml E-media broth) were cultured in a tripticase soy broth (TSB) in the presence of specific- and non-specific control IgY, and were incubated for 1 to 3 h at 37°C. The IgY concentration ranged between 250-500 µg/ml. The growth curve of the bacteria was calculated by optical density measurements of viable bacteria in culture at 590 nm.

As shown by Figure 4, E. Coli (10^7 CFU/ml) cultures in TSB were incubated in the presence of 486 µg/ml of anti-E. coli IgY (open triangles), 486µg/ml of non specific IgY (asterisk) and control (black diamonds) IgY at 37°C and the optical density of the culture was measured at OD 590 nm through 6 h post incubation. Results indicated that incubation of cultures in the presence of the specific IgY derived against E. Coli, led to about 20% growth inhibition. Non-specific IgY had minor effect on growth pattern.

In order to optimize conditions for bacterial growth inhibition, by the targeting component of the invention, cultures were incubated in the presence of increasing concentrations of specific anti E. coli IgY. As shown by Fig. 5, E. coli culture (1×10^7 CFU/ml) in TSB was incubated with 650µg/ml of 0.5U (units) filtrated anti-E. coli-IgY (open triangles), with 650µg/ml of non specific IgY (asterisks) and control (black diamonds) IgY at 37°C and the optical density of the culture was measured at OD 590 nm through 6 h post incubation.

Results indicated that the specific IgY completely inhibited the growth of *E. coli*. The non-specific control IgY had only a minor effect on bacteria agglutination and growth. These results indicate that the developed IgY anti *E. coli* serves as a useful tool for prevention of mastitis caused by *E. coli*.

Antigen-Antibody Binding and Pathogen Growth Pattern

The effectiveness of IgY to bind, neutralize or reduce the proliferation of *E. coli* was further examined. Starter culture of mastitis *E. coli* (10^7 CFU/ml E-media broth) was cultured at 4-8°C for 30 min with: (a) control TSB medium + PBS; (b) control TSB medium + pre-immune non-specific IgY; (c) control TSB medium + specific IgY harvested after 8 weeks and (d) control TSB medium + specific IgY harvested 10 weeks after first boost.

The results summarized in Table 1 demonstrate that growth of the negative control *E. coli* yielded about 5×10^7 CFU/ml E-media broth, and control with non-specific IgY about 6×10^7 CFU. Treatments (c) and (d), which were pre-cultured with the specific anti-*E. coli* IgY, resulted in about 90% growth inhibition of the control. These results indicate that the developed IgY well recognizes mastitis *E. coli*, and enables its binding and inhibition of its growth pattern.

Table 1. Growth and development of *E. coli* (CFU/10ul media broth) pre-cultured (0-4°C) with or without specific anti *E. coli* IgY and inoculated onto an agar plate.

Treatments	CFU/10ul media broth, as % of control
(a) control TSB medium + PBS	100
(b) control TSB medium + pre-immune non-specific IgY	100
(c) control TSB medium + specific IgY harvested 8 weeks after first boost	12
(d) control TSB medium + specific IgY harvested 10 weeks after first boost	9

Effectivity of IgY from different immunization batches, on binding and neutralization of *E. coli*, as well as the and antibody levels were examined in a further experiment. Starter mastitis *E. coli* (10^7 CFU/ml E-media broth) was cultured at 4-8°C for 30 min with: (a) control TSB medium + PBS; (b) treatment (a) + pre-immune non-specific IgY; (c) treatment (a) + specific IgY harvested 2 weeks post-immunization; (d) treatment (a) + specific IgY harvested 4 weeks post-immunization; (e) treatment (a) + specific IgY harvested 5 weeks post-immunization; (f) treatment (e) with double amount of specific IgY harvested 5 weeks post-immunization; and (g) treatment (a) + specific IgY harvested 7 weeks post-immune. As shown by Table 2, IgY was found to be capable of binding and inhibiting *E. coli* growth similarly at

ifferent batches of egg collections, and increasing IgY levels further inhibited bacterial growth (e vs. f).

Table 2. Growth and development of *E. coli* (CFU/10ul media broth) pre-cultured (4-8°C) with or without specific anti *E. coli* IgY and inoculated in an agar plate.

Treatments	CFU/10ul media broth, as % of control
(a) control TSB medium + PBS;	100
(b) (a) + pre-immune non-specific IgY;	100
(c) (a) + specific IgY harvested 2 weeks post-immunization;	15
(d) (a) + IgY harvested 4 weeks post-immunization;	14
(e) (a) + IgY harvested 5 weeks post-immunization;	19
(f) (e) with double the amount of specific IgY;	16
(g) (a) + IgY harvested 7 weeks post-immunization;	18

Example 3***Attachment of the targeting component to a micro/nano carrier bead***

The different targeting components prepared as described in Example 1, specifically for different mastitis bacterial pathogens, were next attached to microbeads. Commercial carboxylated microbeads are activated by using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) in the presence of Avidin. The EDC couples the carboxyls to primary amine residues in Avidin resulting in formation of amide bonds and in coupling of Avidin molecules to the activated microbeads.

IgY antibody (specific anti mastitis pathogenic bacteria IgY, anti *E. coli*) is biotinylated using Sulfo-NHS-biotin reagent using common biotinylation method.

Biotinylated anti *E. coli* IgY is mixed with Avidin-microbeads at various ratios for 1 hr at room temp.

In order to attach the active component to the complex of the invention, bovine anti Avidin antibody, raised in calf immunized with Avidin, was reacted with the microbead-Avidin-Biotinylated-IgY. The binding is due to the affinity of the bovine antibody to Avidin. Binding of the anti Avidin antibody to the Avidin covered beads, is performed through the Fab fragment of the antibody, and therefore this part of the molecule is projecting towards the bead, while the Fc fragment projects away from the bead surface, as required for efficient opsonization.

Example 4***Phagocytosis assay using the multi-functional targeting complex of the invention (microbead coated components)***

The ability of the targeting complex of the invention to induce direct phagocytosis against a pathogenic target was next examined. In a first study, approx. 6.5×10^6 E coli mastitis bacteria were incubated with fresh (2-3 hrs) cow blood phagocytes and with microbeads coated with various ratios of IgY (anti different mastitis bacteria, as a targeting component) and IgG (as the immunoactive component) components for 60 min at 37 C.

Most bacteria were engulfed during the 60 min of incubation period, however the number of bacteria that escaped phagocytosis was related to ratio of IgY:IgG. The highest phagocytosis rate was observed with the ratio of 0.9:0.1 for IgY to IgG respectively.

Results of Table 3 confirm the facilitated engulfing of bacteria by macrophage.

Table 3 Induction of phagocytosis by the complex of the invention

	IgY:Ig G					
	1/0	0.9/0.1	0.7/0.3	0.5/0.5	0/1	0/0
Number of bacteria escaped phagocytosis	145	0	145	290	290	485
in percent	83%	0%	83%	67%	67%	100%
Phagocytosis rate	67%	100%	67%	88%	88%	0%

In a further study approx. 8×10^6 E. coli mastitis bacteria were incubated with fresh blood phagocytes and with microbeads coated with various ratios of IgY:IgG components for 60 min at 37°C.

Approximately 70% of bacteria were engulfed during the 60 min of incubation period, however the number of bacteria that escaped phagocytosis was again related to ratio of IgY:IgG. The highest phagocytosis rate was observed with the increased ratio of IgY in the microbead.

The effect of the phagocytes on the viability of the bacteria in the presence of the complex of the invention was also examined.

For testing the viable bacteria, cells were centrifuged (1000 X g), washed and then plated on appropriate plates in increasing dilutions. Viable colonies were counted. As shown by Table 4, only few bacteria survived phagocytosis (between 1800 to 16000) in the presence of the targeting complex of the invention, whereas 1.5×10^6 bacterial cells were counted in culture that was not exposed to the targeting complex of the invention.

Table 4

	1	2	3	4	5
IgY:IgG ratio	1/0	0.9/0.1	0.7/0.3	no microbead control	no phagocyte control
Number of bacteria left after phagocytosis	9425	21025	34800	273500	1450000
Number of bacteria escaped phagocytosis	0.7%	1.5%	2.4%	19%	100%
Phagocytosis rate (vs. no. 5)	99.8%	98.5%	97.6%	81%	0%
Phagocytosis due to microbead (vs. no. 4)	97%	92%	87%	0%	

Example 5***In vivo treatment of mastitis caused by infection of streptococcal *Dysgalactiae* using the targeting complex of the invention***

As indicated in the background, *Streptococcal dysgalactiae*, gram-positive bacteria, are one of the mastitis causing bacteria. These bacteria can exist in the udder between 20 to 30 days and may cause clinical or subclinical mastitis, leading to economical losses due to decreased milk production, lost milk quality premiums due to increased SCC (somatic cell count), and changes in milk composition. Many mastitis pathogens (*Strep. agalactiae* and *Staph. aureus*) have been recently evacuated from Israeli herds, however an increase in the occurrence of other non-agalactiae species was noted.

Therefore, the inventors have next examined the effectiveness of the targeting complex of the invention in *in-vivo* treatment of *Strep. dysgalactiae* infections. These *in vivo* studies were performed in the Veterinary Institute in Beit-Dagan Israel. Two quarters of four Holstein medium-yielding-milking cows (25 L/d) were intramammarily injected with *Strep. dysgalactiae* (1750 CFU of STRPVL1860 in a volume of 5 ml per quarter). Cows were clinically evaluated, three days prior to and after the inoculation, for mastitis using the following parameters: flakes or clots in the milk; hot, swollen quarter or udder; fever; rapid pulse; and loss of appetite. In addition to clinical evaluation, the Afifarm v 2.08 system was used for measuring milk production, activity and milk conductivity, and milk samples taken were analyzed for bacteria, quantitative SCC and NAGase activity. As shown by Table 5, all measured parameters indicated that the infected tested cows suffered from mastitis.

Forty-eight hours after the infection with bacteria, positive bacterial cultures (*Strep. dysgalactiae*) were found in all injected quarters (Table 5). An increased level of SCC and NAGase activity were also noted (except for cow 266 [B/R] that showed only mild increase).

Table 5. Bacteriology, Somatic Cell Counts (SCC) and NAGase activity in milk of cows, 48 hours post intramammary injection with *Strep. dyagalactia* (1750 CFU of STREPVL1860 in a volume of 5 ml per quarter).

NAGase activity (U)	SCC (x1000)	Bacteriology <i>S. dyagalactia</i>	Sampling time (hours)	Quarter	Cow
2±2	125±35	-	-1	B/L	265
366	5000 <	+	24		
128	5000 <	+	48		
8	170±41	-	-1	B/R	
26	256	-	24		
14	590	+	48		
28±11	147±100	-	-1	F/L	1989

113	436	+	24		
85	237	+	48		
25±7	210±72	-	-1	F/R	
550	5000 <	÷	24		
351	5000 <	+	48		
5±8	120±82	-	-1	B/L	2119
25	313	+	24		
22	134	+	48		
6±7	120±88	-	-1	B/R	
577	5000 <	+	24		

258	5000 <	+	48		
18±7	210±55	-	-1	B/L	2226
32	715	+	24		
325	5000 <	+	48		
13±9	142±47	-	-1	B/R	
54	162	+	24		
297	1499	+	48		

F - Fore; B - back; L - left; R - right; +/- (positive/negative)
Streptococcus dysgalactia

Seventy-four hours after *Strep. dysgalactiae* inoculation, the left quarter of each of the four tested cows was treated with the targeting complex of the invention having a target recognition component comprising an IgY antibody specific for *Strep. dysgalactiae* [half of the quarters were treated by injection of 20 (cows 1989, 2226) or 50 (cows 265, 2119) million units/quarter each in 5 ml of pyrogen-free saline]. Two intra-mammary injections were performed in the

treated quarter of each of the four tested cows (one injection after morning milking and a second injection 24 hrs later). The right quarters were untreated and served as control. Milk samples were monitored during the experimental period (three weeks).

In three out of four non-treated quarter of the tested cows, *S. dysgalactia* bacteria were found in milk samples throughout 20 days of experiment, indicating that infection proceeded into its chronic phase. SCC level and NAGase activity were very high in the three quarters, however in cow 265 the level of these parameters returned to their initial level with no bacteria in milk (Table 6).

As shown by Table 6 and Fig. 7, regardless the dose given, injection of the anti *S. dysgalactia* specific complex of the invention to half of the treated quarters, caused a significant decrease in the number of bacteria in three out of four cows (Table 6), while in controls the quarters were infected throughout 20 days of study.

The results of this study clearly indicate that the anti *S. dysgalactia* specific complex of the invention efficiently reduced the number of bacteria in milk of infected cows. Furthermore, SCC and NAGase activity were decreased significantly after 24 to 48 hours in at least 3 out of 4 cows (Table 6 and Fig. 7). It can be seen that one week after treatment was given, the treated quarters were completely recovered from mastitis, whereas control quarters were highly infected (Table 6).

Table 6. Bacteriology, SCC and NAGase activity in milk of four infected cows, after two-consecutive intramammary injection of 20 and 50 million units of the *S. dysgalactia* specific complex of the invention per quarter).

NAGase activity	SCC ($\times 10^3$)	Bacteriology <i>S. dysgalactia</i>	Sampling time (days)	Y-Complex Units $\times 10^3$	Quarter	Cow
289	5000 <	+	0	50,000	B/L	265
310	5000 <	+	1	50,000		
376	5000 <	+	2	0		
98	5000 <	+	9	0		
109	5000 <	+	20	0		
14	590	+	0	0	B/R	
16	500	+	1	0		
17	302	+	2	0		
9	195	-	9	0		
7	219	-	20	0		
102	520	+	0	20,000	F/L	1989

186	5000 <	+	1	20,000		
84	520	+	2	0		
49	820	-	9	0		
25	92	-	20	0		
308	5000 <	+	0	0	F/R	
248	5000 <	+	1	0		
489	5000 <	+	2	0		
467	5000 <	+	9	0		
267	5000 <	+	20	0		
75	1500	+	0	50,000	B/L	2119
98	5000 <	-	1	50,000		
274	5000 <	-	2	0		
8	52	-	9	0		
11	170	-	20	0		
279	5000 <	+	0	0	B/R	

168	5000 <	+	1	0		
654	5000 <	+	2	0		
776	5000 <	+	9	0		
278	5000 <	+	20	0		
325	5000 <	+	0	20,000	B/L	2226
69	1500	+	1	20,000		
50	717	-	2	0		
25	530	-	9	0		
21	310	-	20	0		
297	1499	+	0	0	B/R	
81	5000 <	+	1	0		
111	5000 <	+	2	0		
157	5000 <	+	9	0		
475	5000 <	+	20	0		

F - Fore; B - back; L - left; R - right; +/- (positive/negative) *Streptococcus dysgalactia*

Toxicity test of the anti *S. dysgalactiae* specific IgY complex of the invention

Toxicity of anti *S. dysgalactiae* specific IgY complex was next studied, using commercial healthy Holstein dairy cows that were injected with different amounts of the complex of the invention. Four lactating cows were selected after visual checking for inflamed quarters, and monitoring their bacteriology profile in milk (free of bacteria, NAGase < 80; SCC < 150,000).

Three to ten million units of the anti *S. dysgalactiae* specific IgY complex in 5 ml pyrogen-free sterile saline solution were intra-mammary injected into the tested quarter using a sterile plastic syringe.

Clinical examination was then performed in the treated cows (flakes or clots in the milk; slight swelling of infected quarter; hot, swollen quarter or udder; fever; rapid pulse; and loss of appetite) as well as chemical measurements in milk sampled during 3 days post injection.

No clinical symptoms or any behavioral changes were observed in cows with the treated quarters

As shown by Table 7, milk analysis indicated that injection of the anti *S. dysgalactiae* specific IgY complex of the invention at a level of 3×10^6 units per quarter did not dramatically affect the level of the SCC. The SCC increased slightly after 24 hours but returned to the normal level 24 hours later. Similar results were obtained when NAGase activity at level of 3 or 10 million units of anti *S. dysgalactiae* specific IgY complex. These findings indicate that the complex of the invention has only minor effect on the mammary tissue and milk in response to injection.

Table 7. NAGase activity and somatic cell counts (SCC, average $\pm$ SD) during 72 hours after intra-mammary injection of Y-Complex in four cows at levels of 8 or 10 millions units per quarter

Complex (Units)	SCC ($\times 1000$)				NAGase activity (Units)			
	[Time post injection (hrs)]				[Time post injection (hrs)]			
	0	24	48	72	0	24	48	72
8 $\times 10^6$	70 $\pm$ 96	363 $\pm$ 511	68 $\pm$ 56	70 $\pm$ 96	1 $\pm$ 1	8 $\pm$ 10	18 $\pm$ 82	0 $\pm$ 0
10 $\times 10^6$	ND	ND	NM	NM	87 $\pm$ 68	73 $\pm$ 80	23 $\pm$ 16	NM

__NM - Not Measured; ND - Non detectable

Residue of the anti *S. dysgalactiae* specific IgY complex in milk

To further examine the safety of using the specific *S. dysgalactiae* complex of the invention, milk samples obtained from treated cows, were monitored for the existence of traces of this complex. Milk samples taken at 0, 10 min, 5, 24, 48 and 72 hours after injection of the complex, were subjected to specific ELISA as described in experimental procedures, for determining the levels of the IgY. As shown by Fig. 8, the level of IgY in milk (free and bound to microsphere beads) decreased sharply after injection. Ten minutes after injection, only between about 0.5 to 0.6 μ g IgY per ml milk was detected. These levels decreased rapidly, and no IgY was detected 24 hours after injection. It should be noted that the minimal detected level was 6.25 ng/ml.

Similarly, analysis of samples taken up to 8 hr post injection clearly indicated that the concentration of IgY decreased by 80% 5 hours after injection and after one milking (Fig. 9).

Example 6

In vivo treatment of mastitis caused by infection of *E. coli* using the targeting complex of the invention

The inventors next examined the effectiveness of the targeting complex of the invention in *in-vivo* treatment of another mastitis causing bacteria, *E. coli*.

These *in vivo* studies were also performed in the Veterinary Institute in Beit-Dagan Israel.

Four non-pregnant Israeli-Holstein cows in their 1st-4th mid-lactation period were included in two consecutive trials, two cows each. The cows were chosen for the experiment according to their udder condition as confirmed by three consecutive bacteriological and somatic cell count (SCC) examinations of quarter milk samples. The cows were free of udder infection and had SCC lower than 120×10^3 cells/ml. The cows were milked three times daily and had milk yields of 25-35 kg/day. Food was offered in mangers located in free-stall barns.

The *E. coli* strain (P4) was grown in Nutrient Broth (Difco, Detroit, MI) for 24 h at 37°C and harvested by centrifuging at $3000 \times g$ for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in non-pyrogenic PBS (pH 7.6; 0.01M) and washed, and the bacterial concentration determined by serial dilution on blood-agar plates. The original pellet was stored on ice for 16 h. Each cow was challenged by injection of 5 ml of the suspension, containing 500 colony-forming units (CFU), into two quarters (frontal or rear) through the streak canal into the gland cistern.

Duplicate quarter milk samples were obtained according to the International Dairy Federation (IDF) (1985) procedures and submitted to the laboratory within 1 h. Bacteriological analysis was performed according to accepted standards. A 0.01-ml aliquots of each milk sample were spread over blood-agar plates (Bacto-Agar, Difco Laboratory) containing 5% sheep red blood cells. All plates were incubated at 37°C and examined for growth at 18 and 42 h. Gram negative colonies were identified with the API 20 E or API NE kit (bioMérieux S.A., 69280 Marcy-l'Étoile, France).

Prior to this assay the tested cows were tested for bacteriological status, NAGase activity and SCC, on three consecutive days. Cows were brought to the stalls 1 to 2 h after milking and their teats were washed with warm water, dried, disinfected with individual non-woven towelettes moistened with chlorhexidine, cetrinido and ethanol (Medi-Wipes, AL Band, Massuot Itzhak, Israel). The first three milk squirts were discarded and samples (50 ml/quarter) were then taken into a sterile tube for bacteriology, SCC, and NAGase activity. Each cow was intramammarily inoculated with 500 cfu/quarter in two quarters, frontal or rear immediately to morning milking. In the 48-h post-challenge period, cows were closely monitored for symptoms of illness (rectal temperature, heart and respiratory rate, alimentary tract activity (rumen contraction) and udder temperature, pain, edema and udder size. At 6, 30 and 54 (only in trial 1) hour post-challenge quarters were sampled, cows were milked and the left challenged quarter of each cow was treated. Cows were not milked at the following milking (night) and returns to milking scheme after (morning). Quarters were continued to be sampled every 24-48 hour up to 15 days post challenge. Cows were intramammarily treated with 40×10^6 units of Complex (anti *E. coli*), given with suspension in a 5 ml non-pyrogenic PBS.

As shown by Fig. 10A, *E. coli* bacteria were found in milk samples throughout 15 days of experiment, indicating that infection proceeded into its chronic phase. However, in milk samples obtained from the treated quarters, clear decrease in bacterial infection was shown. Significant protection of the *E. coli* specific complex was also observed when SCC level and NAGase activity were examined (Figs. 10B and 10C, respectively).

These results clearly indicate that the anti *E. coli* specific complex of the invention efficiently reduced the number of bacteria and SCC in milk of infected cows and efficiently recovered infected quarters and protects cows from mastitis.

Example 7

In vivo treatment of Carps suffering of ulceration caused by infection of Aeromonas salmonicida, using the targeting complex of the invention

The effective use of different targeting complexes of the invention in the treatment of mammalian diseases, e.g., mastitis in cattle, led the present inventors to examine the possibility of treating non-mammalian animals, particularly, fish, using the complex of the invention. Thus, the inventors have developed a specific complex targeted against *Aeromonas salmonicida* which causes furunculosis in Koi pet fish.

Aeromonas salmonicida is a Gram-negative bacterial pathogen that is the causal agent of furunculosis in salmonid fishes, a debilitating and lethal disease encountered in aquaculture. Current vaccines offer limited effectiveness and epizootics are common in farmed fish. Development of broadly effective control measures requires a more complete understanding of the interactions between pathogen and host factors that contribute to the disease state.

The following experiments were performed using carps infected with *Aeromonas salmonicida* as a model system. Four tanks (0.5 m³ each) supplied with fresh water throughout the experiment (flowthrough system), were used for this experiment. Each tank contains thirty healthy carps (30 gr each) and five ulcerated fish (Koi) that were kept together for twenty-eight days (cohabitation). The ulcerated Koi were then removed, and ten to fourteen days after cohabitation the infected carps were treated using the *Aeromonas salmonicida* specific complex of the invention which comprises as a targeting component a specific IgY antibody directed against *Aeromonas salmonicida*. Each of the thirty fish in two of the four tanks that were used as the test treated groups is injected twice intraperitoneally (10 to 14 and at day 17 to 19) with 0.5 ml of solution containing the complex of the invention diluted 1:5 [3 mg IgY/kg body weight (BW) or 450 million of complex units per kg/BW] in saline. Fish of the two control tanks are treated with saline and are monitored similarly to the test two tanks, for the development of clinical signs associated with ulcerative disease of carp.

At the end of the study described above, fish of the control groups were divided into two groups. Complex (450 million U/kg BW) of the invention comprises as a targeting component a specific IgY antibody directed against *Aeromonas*, was added to the water of the treated group while the other group was untreated.

Claims

1. A multi-functional targeting complex for inducing a specific immuno-stimulatory reaction against at least one target pathogenic agent, said complex comprises:
 - a. at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said target agent or any functional fragment of said agent;
 - b. an immunoactive component comprising an immuno-stimulatory agent; and
 - c. optionally, a connecting component that associates said at least one targeting component and said at least one immunoactive component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.
2. The targeting complex according to claim 1, wherein said immuno-stimulatory reaction is selected from the group consisting of phagocytosis, antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement activation, and stimulation of specific T cells and B cells.
3. The targeting complex according to claim 2, wherein said immuno-stimulatory reaction is phagocytosis by leukocyte.
4. The targeting complex according to claim 1, wherein said target pathologic agent is selected from the group consisting of bacteria, viruses, fungi, malignant cells, toxins, venoms, haptens, environmental pollutants and undesired proteins.
5. The targeting complex according to claim 4, wherein said target pathologic agent is bacteria selected from the group consisting of mastitis

pathogenic bacteria, enteropathogenic bacteria, pathogenic furunculosis bacteria and ulcerative disease causing bacteria.

6. The targeting complex according to claim 5, wherein said bacteria is at least one mastitis pathogenic bacteria selected from the group consisting of *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* and *Streptococcus uberis*.
7. The targeting complex according to claim 5, wherein said ulcerative disease causing bacteria is *Aeromonas* spp. which causes ulcerative disease in fish.
8. The targeting complex according to claim 1, wherein said target recognition component comprises any one of antibody or any functional fragments thereof, ligand and receptor specific for said pathologic agent or any functional fragment of said agent.
9. The targeting complex according to claim 8, wherein said target recognition component comprises an antibody or any functional fragments thereof specific for said pathologic agent or any functional fragment of said agent, said antibody being selected from the group consisting of IgG, IgY and IgM.
10. The targeting complex according to claim 9, wherein said recognition component comprises an IgY antibody or any functional fragment thereof specific for said pathologic agent or any functional fragment of said agent.

11. The targeting complex according to claim 1, wherein the immunoactive component comprises an immuno-stimulatory agent which induces phagocytosis.
12. The targeting complex according to claim 11, wherein said phagocytosis inducing agent is selected from the group consisting of opsonins which are any one of IgG and C3b, protein molecules having carbohydrate residues that interact with the mannose-fucose receptor of phagocytes, ligand protein molecules recognized by receptors on scavenger macrophages, ligands for integrins expressed by phagocytes, glycoproteins and fucosyl transferase.
13. The targeting complex according to claim 12, wherein said phagocytosis inducing agent is IgG.
14. The targeting complex according to claim 1, wherein the connecting component is any one of a solid support, a chemical linker, polypeptide linker, polysaccharide linker and lipid linker.
15. A multi-functional targeting complex for inducing specific phagocytosis of at least one target mastitis pathogenic bacteria in bovine infected by said bacteria, said complex comprises:
 - a. at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said mastitis pathogenic bacteria or any functional fragment of said bacteria;
 - b. an active component comprising phagocytosis inducing agent; and
 - c. optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component, wherein the independent biological functions of said targeting

component and said active component are retained.

16. The targeting complex according to claim 15, wherein said target recognition component is an IgY antibody specific for at least one mastitis pathogenic bacteria.
17. The targeting complex according to claim 16, wherein said mastitis pathogenic bacteria is at least one bacteria selected from the group consisting of *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* and *Streptococcus uberis*.
18. The targeting complex according to claim 17, wherein said phagocytosis inducing agent is an IgG molecule generated in bovines.
19. The targeting complex according to claim 18, wherein the connecting component is any one of a solid support, a chemical linker, polypeptide linker, polysaccharide linker and lipid linker.
20. A multi-functional targeting complex for inducing specific phagocytosis of at least one target pathogenic bacteria causing ulcerative disease in fish infected by said bacteria, said complex comprises:
 - a. at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to *Aeromonas salmonicida*, pathogenic bacteria which causes ulcerative disease in fish, or to any functional fragment of said bacteria;
 - b. an active component comprising phagocytosis inducing agent; and
 - c. optionally, a connecting component that associates at least one of

said targeting component and at least one of said active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.

21. A composition for the treatment of a pathologic disorder in a subject, comprising as an active ingredient a multi-functional targeting complex that induces in said subject a specific immuno-stimulatory reaction to (against) at least one target pathologic agent, said complex comprising:
 - a. at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said pathologic agent or any functional fragment of said agent;
 - b. an active component comprising an immuno-stimulatory agent; and
 - c. optionally, a connecting component that associates said at least one targeting component and said at least one active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.
22. The composition according to claim 21, wherein said composition optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.
23. The composition according to claim 22, wherein said pathological disorder is any one of immune-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders.
24. The composition according to claim 23, wherein said complex is according to any one of claims 2 to 19.

25. The composition according to any one of claims 19 to 22, wherein said subject affected by the pathogenic agent is any one of human, domestic mammal, domestic bird, domestic fish, pet and exotic fish.
26. The composition according to claim 25, wherein said domestic mammal is bovine.
27. The composition according to claim 26, wherein said pathologic disorder is a bacterial infection.
28. The composition according to claim 27, wherein said bacterial infection is mastitis.
29. A composition for the treatment of mastitis in bovine, comprising as active ingredient a multi-functional targeting complex, that induces specific phagocytosis to at least one target mastitis pathogenic bacteria in bovine infected by said bacteria, said complex comprises:
 - a. at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said mastitis pathogenic bacteria or any functional fragment of said bacteria;
 - b. an active component comprising phagocytosis inducing agent; and
 - c. optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.
30. The composition according to claim 29, wherein said complex is according to any one of claims 17 to 19.

31. The composition according to claim 25, wherein said subject is any one of domestic fish, pet and exotic fish.
32. The composition according to claim 31, wherein said bacterial infection is *Aeromonas spp.* infection which causes ulcerative disease in said fish.
33. A composition for the treatment of ulcerative disease in fish, comprising as active ingredient a multi-functional targeting complex, that induces specific phagocytosis to at least one target *Aeromonas spp.* pathogenic bacteria in fish infected by said bacteria, said complex comprises:
 - a. at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said *Aeromonas spp.* pathogenic bacteria or any functional fragment of said bacteria;
 - b. an active component comprising phagocytosis inducing agent; and
 - c. optionally, a connecting component that associates at least one of said targeting component and at least one of said active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.
34. A composition for inducing a specific phagocytosis targeted to at least one target pathogenic agent related to a pathological disorder in a subject suffering from said disorder, which composition comprises as an active ingredient a multi-functional targeting complex according to any one of claims 1 to 20, and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.
35. A composition for inducing a specific phagocytosis of at least one target mastitis bacterial pathogen in a bovine suffering from mastitis, which

composition comprises as an active ingredient a multi-functional targeting complex according to any one of claims 17 to 19, and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.

36. A composition for inducing a specific phagocytosis of at least one target *Aeromonas spp.* bacterial pathogen in a fish suffering from ulcerative disease, which composition comprises as an active ingredient a multi-functional targeting complex according to claim 20, and optionally further comprises pharmaceutically and/or veterinarily acceptable diluent, excipient and/or additive.
37. A method for the treatment of a pathological condition in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a targeting complex or a pharmaceutical composition comprising the same, said complex comprises:
- at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds to said pathologic agent or any functional fragment of said agent;
 - an active component comprising an immuno-stimulatory agent; and
 - optionally, a connecting component that associates said at least one targeting component and said at least one active component, wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.
38. The method according to claim 37, wherein said composition is as defined in any one of claims 21 to 23, 25 to 29 and 31 to 33.

39. The method according to claim 37, wherein said complex is as defined by any one of claims 1 to 19.
40. The method according to claim 37, wherein said subject affected by the pathogenic agent is any one of human, domestic mammal, domestic bird, domestic fish, pet and exotic fish.
41. The method according to claim 40, wherein said pathological disorder is any one of immune-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders.
42. The method according to claim 41, wherein said pathological disorder is a bacterial infection.
43. A method for the treatment of mastitis in bovine comprising administering to said bovine in need a therapeutically effective amount of a targeting complex capable of inducing specific phagocytosis targeted to at least one target mastitis pathogenic bacteria in said infected bovine, or of a pharmaceutical composition comprising the same, said complex comprises:
- a. at least one target recognition component comprising a molecule which specifically binds said mastitis pathogenic bacteria or any functional fragment of said bacteria;
 - b. an active component comprising phagocytosis inducing agent; and
 - c. optionally, a connecting component that associates said at least one targeting component and said at least one active component,
- wherein the independent biological functions of said targeting component and said active component are retained.

44. The method according to claim 43, wherein said complex is as defined in any one of claims 17 to 19.
45. A method for the treatment of ulcerative disease in fish comprising administering to said fish in need a therapeutically effective amount of a targeting complex capable of inducing specific phagocytosis targeted to at least one target *Aeromonas salmonicida* pathogenic bacteria in said infected fish according to claim 20, or of a pharmaceutical composition comprising the same.
46. Use of a multi-functional targeting complex according to any one of claims 1 to 19, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a pathological disorder in a subject in need.
47. Use according to claim 46, wherein said pathological disorder is any one of immune-related disorders, viral, fungal or bacterial infections and malignant disorders.
48. Use according to claim 47, wherein said pathologic disorder is a bacterial infection.
49. Use of a multi-functional targeting complex, according to any one of claims 17 to 19, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of mastitis in bovine.
50. Use of a multi-functional targeting complex, according to claim 20, in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of ulcerative disease in fish.

1/9

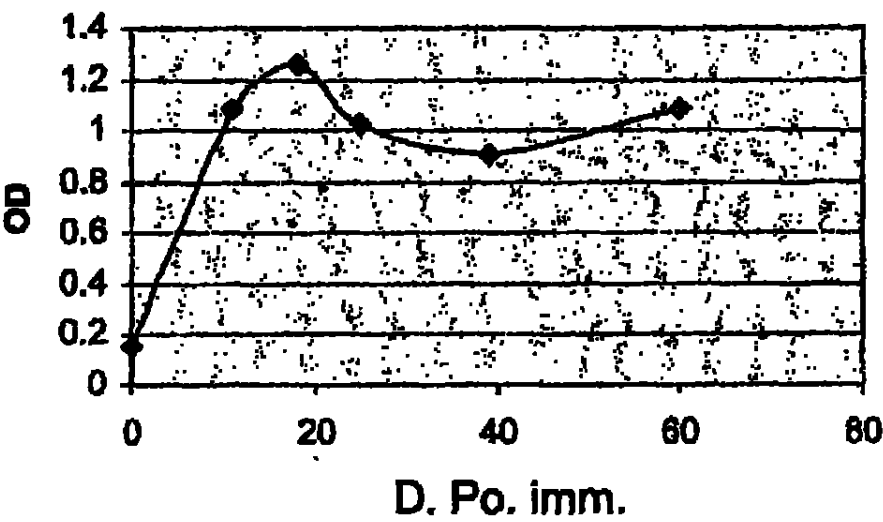


Fig. 1

2/9

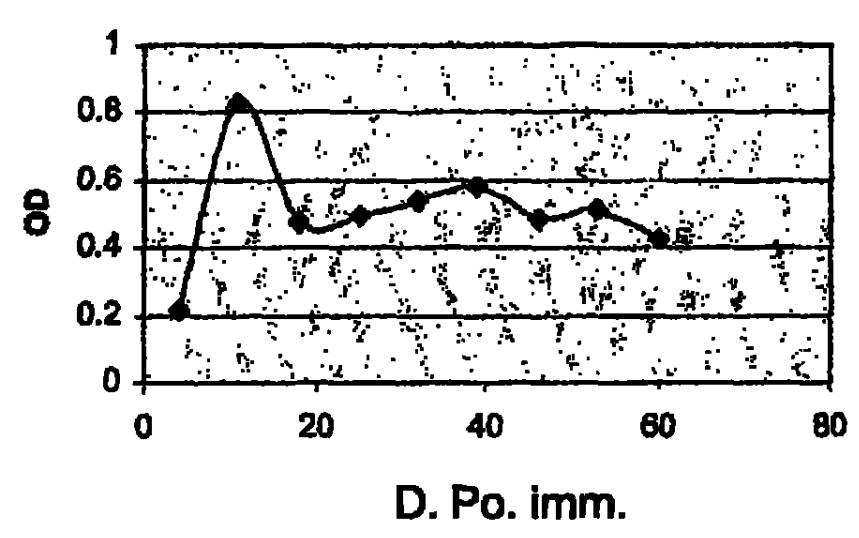


Fig. 2

3/9

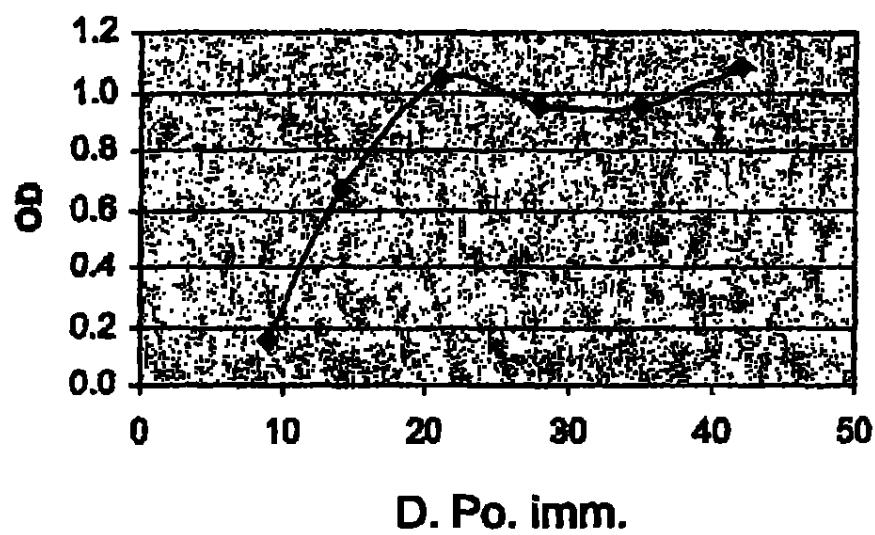


Fig. 3

4/9

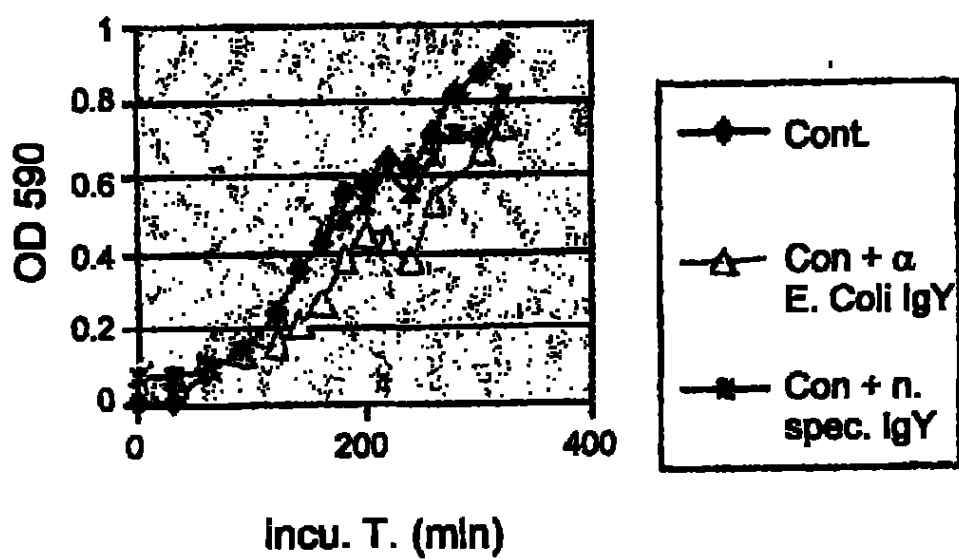


Fig. 4

5/9

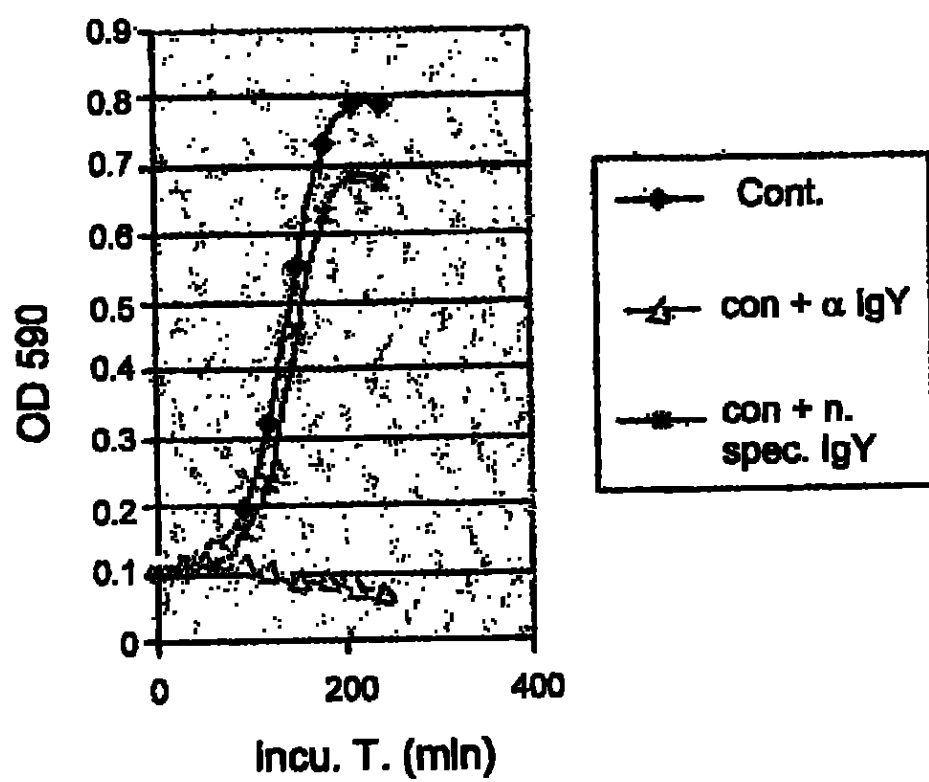


Fig. 5

6/9

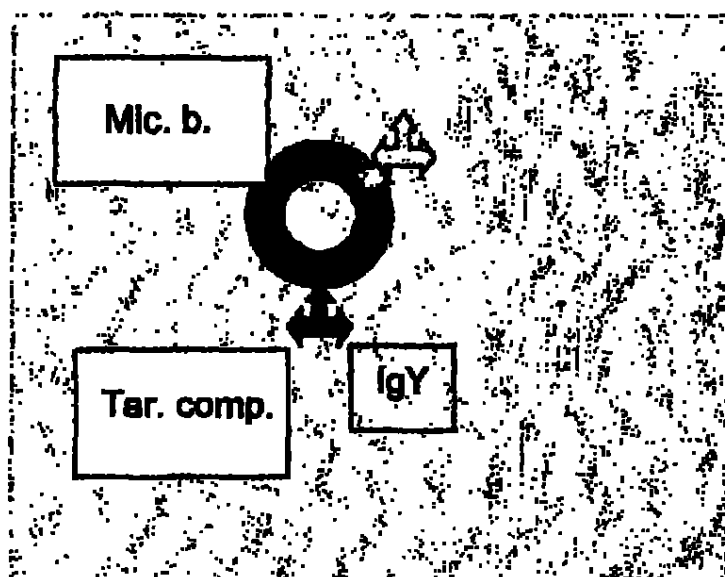
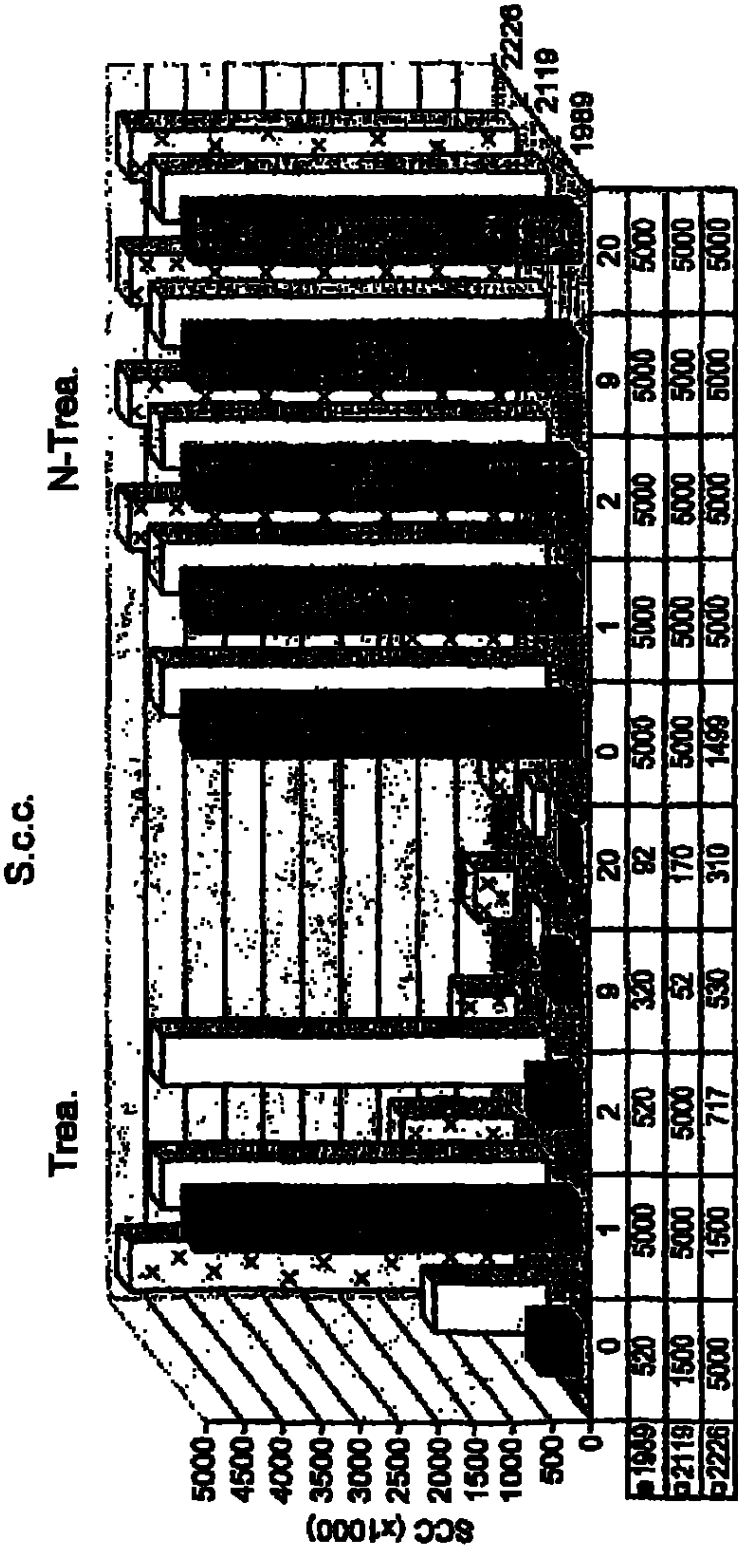


Fig. 6

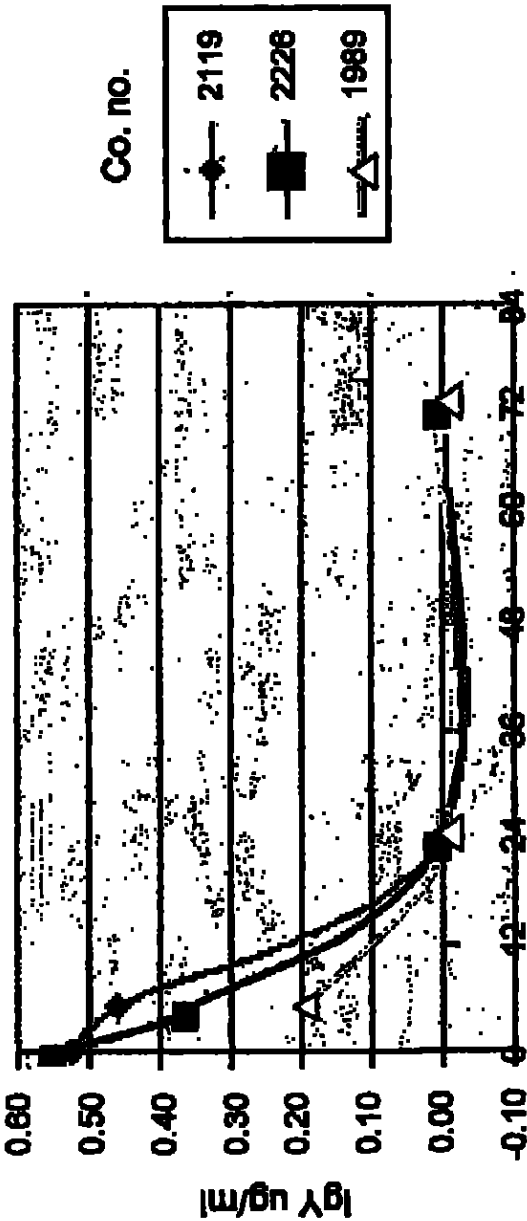
7/9



D. Po. treat.

Fig. 7

8/9



T. Po. Infec. (hrs)

Fig. 8

9/9

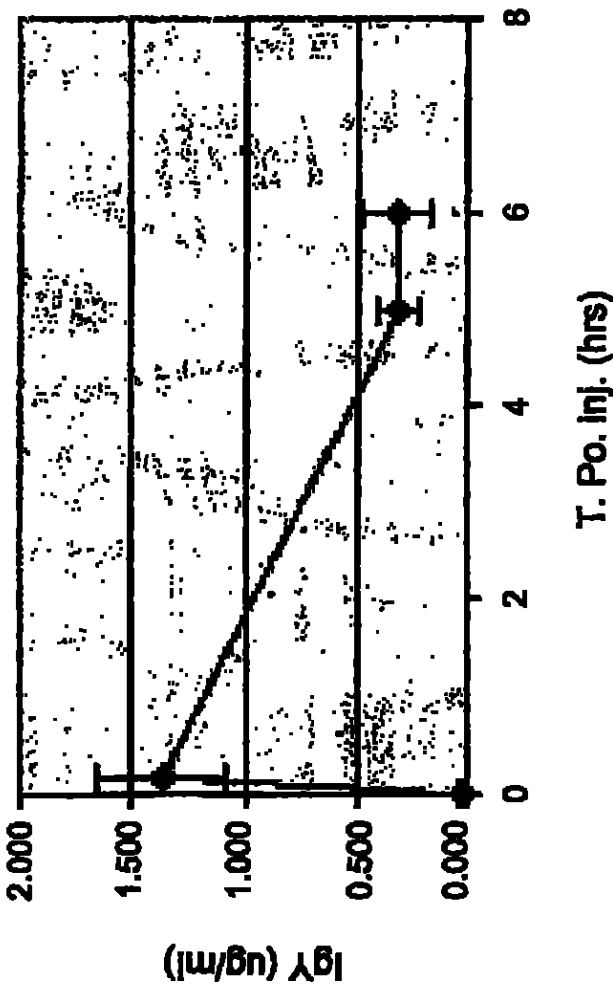


Fig. 9

UN COMPLEJO MULTIFUNCIONAL PARA IDENTIFICAR FAGOCITOSIS ESPECÍFICA DE UN AGENTE OBJETIVO

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un complejo identificador que comprende un componente identificador y un componente activo inmunoestimulador asociados juntos opcionalmente vía un componente de conexión, cuyo complejo proporciona una prevención y tratamiento terapéutico eficaz de varios trastornos patogénicos.

Antecedentes de la Invención

10 Las vacunas son la forma más eficiente de prevenir enfermedades causadas por patógenos como virus y bacterias. Una vacuna protege al animal, mediante la estimulación de células específicas y anticuerpos del sistema inmunológico. En la vacunación activa, los humanos o animales, son expuestos a una forma atenuada, inactivada o toxina del agente de la enfermedad. En respuesta, se producen los anticuerpos y células de memoria que confieren protección por términos cortos o largos, respectivamente. En ausencia de una vacuna activa, un animal no protegido puede ser infectado y requerirá ser tratado mediante varios medicamentos, p. ej., antibióticos en el caso de bacterias. Una de las soluciones es la vacunación pasiva. En este planteamiento, los anticuerpos contra un patógeno específico producidos en un animal, se administran a otro animal que se infectó por el mismo patógeno. Un ejemplo es la materno inmunidad. Por ejemplo, *E coli*. K99, infecta becerros jóvenes y causa diarrea, los becerros infectados pueden ser protegidos por los anticuerpos maternos dirigidos contra la bacteria, los cuales son suministrados vía el calostro. Las gallinas, transfieren de forma pasiva anticuerpos a sus crías, polluelos en desarrollo, a través de la yema

15

20

25

del huevo o a través de la sangre [Hanson y otros, Science and Medicine (Ciencia y Medicina) 4: 12-21 (1977)] y mientras que la transferencia de anticuerpos en mamíferos es vía el calostro.

5 Numerosas publicaciones, [Brunser y otros, 1992; Campebell y Petersen, Immune Milk (Leche inmune), Journal of Immune Milk 1:3-28 (1964); Davidson, y otros, The Lancet 2:709-712 (1989); Ebina, y otros, Medical Microbiology and Immunology (Microbiología e Inmunología Médica) 174:177-185 (1985); Fayer, W, y otros, 1989, Golay, 1990 y otros; Mietens y Keinhorst, 1979; Ommrod y Miller, 1991, 1993, 10 Owens y Nickerson, 1988, Sharpe, y otros , 1994; Smith, C. M. (1964)], reportan que inoculaciones múltiples a gallinas o vacas lecheras durante un periodo de tiempo largo con un antígeno (esto es, hiperinmunización) resulta en la producción de huevos o leche "inmunes". Estos productos poseen anticuerpos contra los antígenos de vacunación específica.

15 De manera similar, se ha observado en mamíferos, la protección inmune transferida *in útero*. Las gallinas transfieren protección de manera pasiva a su prole mediante la secreción de anticuerpos dentro del huevo. La transferencia de los anticuerpos al pollo a partir del suero de la gallina hasta la yema y la absorción 20 por el pollo, es análoga a la transferencia a través de la placenta de la IgG a partir de la madre mamífero a su cría [Kowalczyk, y otros, Transport in the Chicken Immunology (Transporte en la Inmunología del Pollo) 54: 755-762 (1985); Rose, y otros, European Journal of Immunology 4: 521-523 (1974)].

25 Dado que las inmunoglobulinas suceden de manera natural en los huevos y los productos de huevo son fuente común de proteína en la dieta humana, los huevos

inmunes son una fuente conveniente y económica de anticuerpos específicos [Hamada, y otros, Infection and Immunity (Infección e Inmunidad) 59: 4161-4167 (1991); Polson, y otros, Immunological Investigations (Investigaciones Inmunológicas) 14: 323-327 (1985)]. Por tanto, el huevo inmune parece servir
5 como una fuente concentrada de anticuerpos.

En consecuencia, uno de los objetivos de la presente invención, utilizar anticuerpos cultivados en huevos (IgY), como un componente identificador en el complejo identificador de la invención. Estos componentes identificadores (IgY),
10 especialmente dirigen respuesta inmunoestimuladora contra un agente patogénico particular.

El componente inmunoactivo del complejo identificador de la presente invención, comprende un agente que induce la fagocitosis tal como complemento, anticuerpos a bacterias o IgG, los cuales inducen opsonización mediante su
15 fragmento Fc. Ambos componentes, el componente identificador y el componente inmunoactivo del complejo identificador de la presente invención, pueden estar preferiblemente unidos a un micro/nano portador.

Los polipéptidos de superficie celular inmunoestimuladores y sus receptores son importantes para la eliminación y destrucción de materiales extraños, que incluyen células mamíferas o bacterias. Los polipéptidos de superficie celular inmunoestimuladores y sus receptores activan la fagocitosis y la ADCC. El proceso comienza con la opsonización de los materiales extraños. Una opsonina
20 es un agente, normalmente un anticuerpo o componentes del complemento, que hacen que la célula o que el microbio sea más vulnerable a ser tragado por el
25

fagocito. La opsonización es el proceso de recubrir una célula con opsonina. Un fagocito es una célula que traga y devora otras, el proceso de tragar y devorar es la fagocitosis. Entre los fagocitos importantes para el propósito de esta invención están los leucocitos tal como macrófagos y monocitos.

5

La presente invención, de esta manera, proporciona un complejo inmunoestimulador identificado, para la prevención y tratamiento de una variedad de trastornos patológicos causados por agentes patogénicos (bacterias, virus), toxinas y otros patógenos resistentes a antibióticos, como también trastornos malignos en un sujeto mamífero que lo requiera.

10

En un ejemplo particular para inmunoestimulación identificada, la presente invención, proporciona a demás composiciones farmacéuticas de complejo identificado y el método para la prevención y/o tratamiento de mastitis bovina. El complejo identificado comprende el componente inmunoestimulador activo y un componente identificador, el cual es un anticuerpo IgY específico para un patógeno de mastitis. Ambos componentes pueden estar preferiblemente adjuntos a unas perlas de micro/nano portador.

15

20

La mastitis bovina involucra cambios inflamatorios de los conductos lactíferos y generalmente se refiere a la inflamación del sistema de conductos o tejidos mamarios, como el resultado de la colonización o proliferación de microbios que invaden los conductos o depósito de mama, por tanto se ve comprometida la función sintetizadora de leche y la sobre permeabilidad de las paredes celulares que secretan la leche, que resulta en la secreción de leche anormal, con un incremento en el número de células somáticas, particularmente células blancas

25

sanguíneas. Trastornos en células de lactación y la atrofia, como la proliferación de los tejidos conectivos y similares, también, adicionalmente, pueden conducir a la reducción o ausencia de la producción de leche.

- 5 Los patógenos principales de la mastitis, incluyen *Estafilococo*, *Streptococo*, *Actinomyces*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Fungus*.

El mecanismo de la infección de mastitis o el comienzo es complejo, e involucra (en términos de bacteria) la infiltración bacteriana de patógenos, su colonización en el epitelio mamario y su proliferación subsiguiente o invasión del tejido. Los factores de predisposición, pueden incluir genéticos, constitución, climáticos, instalaciones de ganado, medio ambiente, el número de animales alimentados, alimento, métodos de ordeño, trauma papilar y similares, pero para propósitos prácticos, el más importante es la higiene del ordeño, que incluye el manejo adecuado por los ordeñadores.

El daño de práctica causado por la mastitis, incluye bajas cantidades de leche, baja calidad de la leche, desperdicio de leche, ausencia de leche, número reducido de años del animal utilizado, grandes costos de tratamiento y fuentes potenciales para la infección de vacas sanas, todo lo anterior, representan pérdidas económicas profundas. Por esto, la mastitis ha sido objeto de considerable investigación en muchos países durante los pasados 200 años. No obstante, la mayoría de los resultados han sido puestos en uso para el tratamiento y prevención de la condición en sí misma, pero su incidencia no se ha disminuido e incluso se ha incrementado en algunas áreas. Dado que la mastitis involucra cambios de inflamación de las glándulas mamarias que resulta de la infección

microbiana, las respuestas generalmente incluyen, la administración intra-mamaria de antibióticos y antibacterianos sintéticos. La administración de preparaciones antibióticas y antibacterianas sintéticos es continuada por un periodo en el cual no se puede utilizar la leche, en cuanto a la salud de los consumidores humanos respecta. Dado que la leche producida durante ese periodo, no es de valor comercial representa una pérdida financiera mayor. Además, la dosis de administración de los fármacos, debe ser, de hecho, supervisada en el área donde es tomado el tratamiento, pero los fármacos son en algunas ocasiones seleccionados sin probar la susceptibilidad de los patógenos a éstos. Muchos patógenos, de esta manera, han adquirido resistencias múltiples, que a menudo previenen el establecimiento de un plan de tratamiento efectivo.

Por tanto, este es otro objetivo de la presente invención, superar los problemas antes mencionados, al proporcionar un método práctico aún simple, económico y complejo identificador para la prevención y tratamiento de la mastitis sin dejar ninguno de los fármacos en la leche o producción de cepas bacterianas fármaco-resistentes.

Estos y otros objetivos de la invención se harán evidentes como la descripción precedente.

Resumen de la Invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un complejo identificador multifuncional que induce una reacción inmunoestimuladora específica en al menos un agente objetivo. El complejo identificador de la invención comprende:

(a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo, que comprende una molécula, la cual se une específicamente a dicho agente o a cualquier fragmento funcional de dicho agente;

(b) un componente activo que comprende un agente inmunoestimulador; y

5 (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo. La asociación de dicho componente identificador y dicho componente activo, opcionalmente por dicho componente de conexión, debe ser realizado en la conformación adecuada con el fin de conservar las funciones biológicas
10 independientes de ambos componentes: el activo y el identificador.

En una realización, el complejo identificador de la invención, induce una reacción inmunoestimuladora específica, seleccionada del grupo que consiste de fagocitosis, citotoxicidad celular anticuerpodependiente (ADCC, de su sigla en
15 Inglés), complemento y estimulación de células B y células T específicas. Esta reacción inmunoestimuladora específica es identificada mediante un complejo de la invención al menos a un agente patológico objetivo.

En una realización preferida específicamente, el complejo identificador de la
20 invención, induce una fagocitosis específica por leucocitos tal como cualquiera de los macrófagos y monocitos identificados al menos a un agente objetivo.]

De acuerdo con otra realización, el complejo identificador de la invención es identificado contra un agente patológico objetivo seleccionado del grupo que consiste de bacteria, virus, fungus, células malignas, toxinas, venenos, heptenos y
25 proteínas no deseadas. Más preferiblemente, el agente patológico objetivo puede ser bacteria seleccionada del grupo que consiste de bacteria patogénica de

mastitis, bacteria enteropatógena y bacteria de furunculosis patógena. En una realización más específicamente preferida, el complejo identificador de la invención es identificado al menos a una bacteria patógena de mastitis seleccionada del grupo que consiste de *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*,
5 *Clostridium*, *Estafilococo aureus*, *Streptococo agalactiae*, *Streptococo dysgalactia*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* (o *farcinica*) y *Streptococo uberis*.

Alternativamente, el componente de reconocimiento del objetivo del complejo
10 identificador, puede ser identificado contra *Aeromonas spp.*, particularmente, *Aeromonas salmonicida*, que causa una enfermedad ulcerativa en peces.

Aún, en otra realización particular, el componente de reconocimiento del objetivo comprendido dentro del complejo identificador de la invención, comprende
15 cualquiera de un anticuerpo o cualquiera de los fragmentos funcionales del mismo, ligantes y receptores específicos a dicho agente patológico o a cualquier fragmento funcional de dicho agente. En una realización específicamente preferida, el componente de reconocimiento del objetivo comprende un anticuerpo o cualquiera de los fragmentos funcionales del mismo. Tal anticuerpo es
20 específico a dicho agente patológico o a cualquier fragmento de dicho agente y puede ser por ejemplo cualquiera de IgG, IgY e IgM, preferiblemente una IgY.

De acuerdo con una realización específica, el complejo identificador de la invención comprende como el componente activo un agente inmunoestimulador.
25 Más particularmente, este agente inmunoestimulador induce fagocitosis. El agente que induce la fagocitosis comprendido dentro del complejo identificador de la

invención como un componente activo, puede ser seleccionado del grupo que consiste de opsoninas, las cuales son cualquiera de, pero no se limitan a: IgG y C3b, moléculas de proteína que poseen residuos de carbohidratos que interactúan con el receptor de manosa-fucosa de los fagocitos, moléculas de proteína de ligante reconocidas por receptores en macrófagos secuestradores (scavenger),
5 ligantes para integrinas expresados por fagocitos; glucoproteínas y fucosil transferasa.

De acuerdo con una realización específicamente preferida, el agente que induce la
10 fagocitosis es IgG.

De acuerdo con otra realización preferida, el componente de conexión opcional, comprendido dentro del complejo identificador de la invención, puede ser cualquiera de un soporte sólido, un enlazante químico, un enlazante un residuo de
15 aminoácido, un enlazante peptídico, oligopeptídico ó polipeptídico, un sacárido, oligosacárido, polisacárido y un enlazante de lipídico.

Aún, en otra realización, el complejo de la invención, comprende un componente identificador y un componente inmunoactivo, ambos unidos sin ningún
20 componente de conexión. De acuerdo a tal realización, el componente identificador puede ser un anticuerpo IgY dirigido contra dicho agente objetivo y el componente inmunoactivo es un anticuerpo IgY anti IgG. El enlace de ambos componentes conserva la conformación adecuada (que posee el Fc de la molécula libre de IgG).

En una realización particular, la invención se refiere a un complejo identificador multifuncional que induce fagocitosis específica de al menos una bacteria patogénica de mastitis objetivo en bovinos infectados por dicha bacteria. Este complejo específico comprende:

- 5 a. al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a la bacteria patogénica de mastitis o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria;
- b. al menos un componente activo que comprende un agente que induce la fagocitosis; y
- 10 c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo. Ambos componentes el activo y el identificador están asociados, opcionalmente por el componente de conexión, en una conformación adecuada que conserva las funciones biológicas independientes de ambos componentes.

15

Este complejo identificador de acuerdo a una realización específica, comprende como un componente de reconocimiento del objetivo, un anticuerpo IgY específico para la bacteria patogénica de mastitis. Más específicamente, el complejo identificador de la invención puede comprender al menos un anticuerpo IgY

20 específico para al menos una de las bacterias patogénicas de mastitis, seleccionada del grupo que consiste de *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Estafilococo aureus*, *Streptococo agalactiae*, *strptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides (o farcinica)* y *Streptococo uberis*.

25

De acuerdo con una realización específicamente preferida, el complejo identificador de la invención, comprende como un agente que induce la fagocitosis, una molécula de IgG. Más preferiblemente, dicha molécula de IgG es generada en bovinos.

5

Este complejo identificador particular, además puede opcionalmente comprender como un agente de conexión, cualquiera de, pero no se limita a, un soporte sólido, un enlazante químico, un enlazante peptídico oligopeptídico o polipeptídico, un sacárido, oligosacárido o de polisacárido y enlazante de lipídico.

10

La invención además proporciona un complejo identificador multifuncional para inducir la fagocitosis específica de al menos una bacteria patogénica objetivo que causa enfermedad ulcerativa en peces infectados por dicha bacteria. De acuerdo con esta realización, tal complejo específico comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula que específicamente se une a bacteria patogénica de *Aeromonas spp.*, la cual causa enfermedad ulcerativa en peces, o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria; (b) un componente activo que comprende agente que induce la fagocitosis; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, en donde se conservan las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo.

15

20

25

Como un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición para el tratamiento de un trastorno patológico en un sujeto. La composición de la invención comprende como ingrediente activo un complejo identificador

multifuncional que induce una reacción inmunoestimuladora específica al menos a un agente patológico objetivo. El complejo comprendido dentro de la composición de la invención comprende:

(a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicho agente patológico o a cualquier fragmento funcional de dicho agente; (b) al menos un componente activo que comprende un agente inmunoestimulador; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos dicho componente identificador y al menos dicho componente activo.

La composición de la invención, además opcionalmente puede comprender diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

De acuerdo con una realización, la composición de la invención es pretendida para el tratamiento de un trastorno patológico que puede ser cualquiera de: trastornos inmuno-relacionados, virales, infecciones fúngicas o bacterianas y trastornos malignos, en un sujeto que requiera de tal tratamiento.

De acuerdo con una realización preferida, tal sujeto puede ser cualquiera de: humano, mamífero doméstico, ave doméstica, cultivos acuáticos domésticos y cultivos acuáticos exóticos.

En una realización preferida, la composición de la invención es pretendida para el tratamiento de mamíferos domésticos, más preferiblemente, bovinos y particularmente vacas lecheras.

En una realización particular, el trastorno patológico a ser tratado con la composición de la invención, puede ser una infección bacteriana. Más preferiblemente, la infección bacteriana puede ser mastitis bovina.

- 5 En consecuencia, la invención proporciona además una composición para el tratamiento de mastitis en bovinos. Tal composición específica de acuerdo con una realización, comprende como ingrediente activo un complejo identificador multifuncional, que induce fagocitosis específica al menos a una bacteria patogénica de mastitis objetivo en un bovino infectado por dicha bacteria. Más
- 10 específicamente, el complejo comprendido dentro de esta composición específica para mastitis, comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicha bacteria patogénica de mastitis o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria; (b) un componente activo que comprende agente que induce la
- 15 fagocitosis; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y dicho componente activo.

- De acuerdo con una realización específicamente preferida, la composición de la invención comprende como un ingrediente activo, un complejo que comprende
- 20 una perla de poliestireno recubierta con avidina como un componente de conexión; un anticuerpo IgY biotinilado específico para bacteria patogénica de mastitis como el componente identificador; y una molécula de IgG anti avidina, la cual es, más preferiblemente, generada en bovinos.

- 25 En otra realización, la composición de la invención es pretendida para el tratamiento de peces domésticos y peces mascota/acuarios/exóticos, los cuales

sufren de enfermedad ulcerativa causada por infección bacteriana de *Aeromonas spp.* Por lo tanto, de acuerdo con esta realización, la invención proporciona una composición para el tratamiento de enfermedad ulcerativa en peces, que comprende como ingrediente activo un complejo identificador multifuncional, que induce la fagocitosis específica de al menos una bacteria patogénica objetivo de *Aeromonas spp.* en peces infectados por dicha bacteria. Tal complejo particular, comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicha bacteria patogénica de *Aeromonas spp.* o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria, preferiblemente un anticuerpo IgY específico para *Aeromonas spp.*; (b) un componente activo que comprende agente que induce la fagocitosis; el cual preferiblemente puede ser una molécula de IgG preparada en peces; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, en donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y de dicho componente activo son conservadas.

La presente invención además se refiere a una composición que induce una fagocitosis específica identificado en al menos un agente patológico objetivo o compuesto relacionado a un trastorno patológico en un sujeto que sufre de dicho trastorno. De acuerdo con una realización, esta composición comprende como un ingrediente activo, el complejo identificador multifuncional de la invención, y opcionalmente, comprende además diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

De acuerdo con una realización específica, la invención se refiere a una composición para inducir una fagocitosis específica de al menos un patógeno

bacterial de mastitis de objetivo en un bovino que sufre de mastitis. Esta composición comprende como un ingrediente activo, el complejo específico de acuerdo con la invención y opcionalmente comprende además diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptable.

5

Otra realización específica, se refiere a una composición para inducir una fagocitosis específica de al menos un patógeno bacteriano de *Aeromonas spp.* objetivo, cuya composición comprende como un ingrediente activo un complejo identificador multifuncional de acuerdo con la invención y opcionalmente comprende además diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

10

Como un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de un trastorno patológico en un sujeto. El método de la invención comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de identificador o una composición farmacéutica que comprende el mismo. Este complejo comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicho agente patológico o a cualquier fragmento funcional de dicho agente; (b) al menos un componente activo que comprende un agente inmunoestimulador; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente de identificador y al menos uno de dicho componente activo.

15

20

La asociación de dicho componente de identificador y dicho componente activo, opcionalmente por dicho componente de conexión, debe ser realizado en la

25

conformación adecuada, a fin de conservar las funciones biológicas independientes de ambos componentes el activo y el identificador.

5 En una realización, el método de la invención utiliza cualquiera de las composiciones de acuerdo con la invención. Más preferiblemente, aquellas composiciones que comprende como un ingrediente eficaz cualquiera de los complejos de identificador de la invención.

10 Aún, en otra realización, el método de la invención es pretendido para el tratamiento de un trastorno patológico, el cual puede ser cualquiera de trastornos inmuno-relacionados, infecciones virales, fúngicas o bacterianas y trastornos malignos. En una realización específicamente preferida, el trastorno patológico puede ser una infección bacteriana.

15 En una realización particularmente preferida, la invención se refiere a un método para el tratamiento de mastitis en ganado vacuno. Este método específico comprende administrar a un animal que lo requiere, una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo identificador capaz de inducir la fagocitosis específica identificada al menos a una bacteria patogénica de mastitis objetivo en
20 dicho animal infectado, ó de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

Aún, en otra realización particularmente preferida, el método de la invención utiliza una composición particular de la invención. De acuerdo a esta realización, esta
25 composición comprende como un ingrediente activo, un complejo que comprende una perla de poliestireno recubierta con avidina como un componente de

conexión; un anticuerpo IgY biotinilado específico para bacteria patogénica de mastitis, como el agente de identificador; y una molécula de IgG anti-avidina, la cual es, más preferiblemente, generada en bovinos. Esta composición particular opcionalmente puede comprender además diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica o veterinariamente aceptables.

La presente invención además proporciona un método para el tratamiento de enfermedad ulcerativa en peces que comprende administrar a dicho pez que lo requiere, una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de identificador capaz de inducir la fagocitosis específica identificada al menos a una bacteria patogénica de *Aeromonas spp.* objetivo en dicho pez infectado de acuerdo con la invención ó de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

La presente invención se refiere además al uso de un complejo identificador multifuncional de la invención, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno patológico en un sujeto que lo requiera.

Este trastorno patológico puede ser de acuerdo con una realización específica, cualquiera de: desórdenes inmuno-relacionados, virales, infecciones fúngicas o bacterianas y trastornos malignos. Preferiblemente, el trastorno patológico es una infección bacteriana.

En otra realización específicamente preferida, la invención se refiere al uso de un complejo identificador multifuncional, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de mastitis en ganado vacuno. Este complejo particular comprende una perla de poliestireno recubierta con avidina como un

componente de conexión; un anticuerpo IgY biotinilado específico para bacteria patogénica de mastitis, como el componente identificador; y una molécula de IgG anti-avidina, la cual es más preferiblemente, generada en el ganado vacuno.

- 5 Aún más, la invención se refiere al uso del complejo identificador multifuncional de la invención, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedad ulcerativa en peces.

Breve Descripción de las figuras

- 10 **Figura 1.** Actividad del anticuerpo IgY anti-*E.coli* en yema de huevo cruda, extracto soluble (1:1000) con tiempo de post-inmunización determinado por ELISA (O.D. a 450 nm). Abreviaciones: D. Po. Inm. (días post inmunización), OD (densidad óptica).

- 15 **Figura 2.** Actividad del anticuerpo IgY anti-*Estafilococo aureus* en yema de huevo cruda, extracto soluble (1:1000) con tiempo de post-inmunización determinado por ELISA (O.D. a 450 nm). Abreviaciones: D. Po. Inm. (días post inmunización), OD (densidad óptica).

- 20 **Figura 3.** Actividad del anticuerpo IgY anti-*Streptococo uberis* en yema de huevo cruda, extracto soluble (1:1000) con tiempo de post-inmunización determinado por ELISA (O.D. a 450 nm). Abreviaciones: D. Po. Inm. (días post inmunización), OD (densidad óptica).

- 25 **Figura 4.** El efecto de la IgY anti-*E. Coli* en el patrón de crecimiento de *E. Coli* bovino. Abreviaciones: incu. T. min. (incubación, tiempo en minutos), cont. (control), α (anti), n, espec. (no específico), IgY (inmunoglobulinas Y).

Figura 5. El efecto de la IgY anti-*E. Coli* en el crecimiento de *E. Coli* bovino. Abreviaciones: incu. T. min. (incubación, tiempo en minutos), cont. (control), α (anti), n, espec. (no específico), IgY (inmunoglobulinas Y).

Figura 6. Acción del complejo identificador.

Se encuentran unidos dos componentes principales a la superficie del soporte sólido (micro perlas= mic. p): (i) un componente identificador (Comp. ident.) que comprende un anticuerpo (IgY, receptores, IgG) que específicamente reconocen el objetivo (patógeno u otras moléculas objetivo), p. ej., Hormonas, antígenos específicos de tumor, proteínas virales; y (ii) un componente activo que posee propiedades inmunoestimulantes, el cual induce la fagocitosis (IgG, complemento). El componente identificador se enlaza a un objetivo específico, mientras que el ingrediente activo induce una respuesta inmune no específica en el huésped (p. ej., fagocitos). Esta estimulación identificada de fagocitosis permite la eliminación específica de un objetivo no deseado del sujeto mamífero tratado.

Figura 7. SCC en leche de vacas tratadas (cuarto izquierdo) o no tratadas (cuarto derecho) con dos inyecciones consecutivas del complejo de la invención identificado a *S. dysgalactia*. Abreviaciones: SCC (conteo de células somáticas), Trat. (tratadas), N-trat. (no tratadas), D. Po. trart. (días post tratamiento).

Figura 8. El nivel del complejo específico a *S. dysgalactia* en leche de tres vacas durante 72 horas pos inyección. Abreviaturas: N. Vacas (número de vacas), T. Po. Infec. Hrs. (tiempo post infección en horas)

Figura 9. El nivel de complejo específico a *S. dysgalactia* en leche de tres vacas durante las primeras 6 horas después de la inyección intra-mamaria (Promedio $\pm$ SD). El punto de tiempo de cinco horas, indica estado de pre-ordeño y el de seis horas indica estado de post-ordeño.

5

Descripción Detallada de la Invención

10

Dado un número de métodos de la técnica de biología molecular son bien conocidos para la persona versada en la materia, éstos no se detallan aquí. Tales métodos incluyen la expresión de cDNAs, análisis de proteínas recombinantes o péptidos, transformación de células, transfección de células de mamífero y similares. Los libros que describen tales métodos p. ej., son Sambrook y otros., *Molecular Cloning A laboratory Manual* (Manual de Laboratorio: Clonación Molecular), Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0879693096, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology* (Últimos Protocolos en Biología Molecular), por F. M. Ausubel, ISBN: 047150338X, John Wiley & Sons, Inc. 1988, y *Short Protocols in Molecular Biology* (Protocolos breves en Biología Molecular), por F. M. Ausubel y otros, (eds.) 3^{ra} Ed. John Wiley & Sons; ISBN: 0471137812, 1995. Estas publicaciones se incorporan totalmente aquí como referencia. Adicionalmente, un número de técnicas inmunológicas no son en cada caso descritas aquí en detalle, ya que son bien conocidas por la persona versada en la materia, véase por ejemplo: *Current Protocols in Immunology* (Últimos Protocolos en Inmunología), Coligan y otros. (eds.), John Wiley & Sons. Inc. Nueva York, NY.

15

20

25

Como un primer aspecto, la presente invención se refiere a un complejo identificador multifuncional que induce una reacción inmunoestimuladora específica al menos a un agente objetivo, preferiblemente un agente patológico. El

complejo identificador de la invención comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento de objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicho agente o a cualquier fragmento funcional de dicho agente; (b) al menos un componente inmunoactivo que comprende un agente inmunoestimulador; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, en donde, la asociación del componente identificador y el componente activo, opcionalmente vía dicho componente de conexión, es tal que se preserva la conformación adecuada a fin de que las funciones biológicas independientes de ambos, del ingrediente activo y del identificador sean conservadas.

En una realización, el complejo de identificador de la invención induce una reacción inmunoestimuladora específica seleccionada del grupo que consiste de fagocitosis, citotoxicidad celular anticuerpodependiente (ADCC, de su sigla en Inglés), activación de complemento y estimulación de células B y células T específicas. Esta reacción inmunoestimuladora específica es identificada mediante el complejo de la invención al menos a un agente patológico objetivo.

Como se destacó anteriormente, los diferentes componentes del sistema inmunológico del huésped pueden ser inducidos por el complejo identificador de la invención. En un componente, los fagocitos secuestran el agente patológico objetivo, tal como células bacterianas, células malignas, proteínas no deseadas o células infectadas por virus. En particular, la citotoxicidad celular anticuerpodependiente (ADCC) posee un papel importante en la destrucción de muchas células objetivo, que incluyen células tumorales, mediante macrófagos. La opsonización de células objetivo con inmunoglobulina G (IgG) por ejemplo,

aumenta la remoción de estos materiales del huésped. Ha sido bien establecido el papel de los macrófagos en la destrucción de las células objetivo por la ADCC en presencia de anticuerpos específicos. En tanto que la selectividad de los macrófagos identificadores, se basa en la especificidad del anticuerpo, el ataque

5 lítico en las células objetivo es desencadenado por la ADCC mediada por el receptor Fc.

Otro componente del sistema inmunológico es la activación del sistema complemento. Las dos rutas de la activación del complemento (la ruta clásica y la

10 alternativa), son ambas dirigidas en una etapa central en la activación de complemento, la segmentación del C3. Una ruta terminal sencilla es la formación de un complejo que ataca la membrana (MAC). La ruta clásica, comúnmente es activada por complejos antígeno-anticuerpo, donde ciertos anticuerpos son los que fijan el complemento (capaz de enlazar al complemento para causar la activación

15 de la ruta clásica). La activación de la ruta clásica, se puede iniciar con el enlace de C1q, el primer factor de la cascada complemento, a la región Fc de la inmunoglobulina. Entonces, una cascada de eventos proteolíticos resulta en la activación de la Convertasa C5, la cual segmenta el C5 en C5b y C5a. Luego el C5b enlaza C6, C7, C8, para formar un complejo C5b-8. La unión de moléculas C9

20 a C5b-8 forma el C5b-9 (el MAC), el cual, penetra en la bicapa lipídica y forma canales transmembranales que permiten el flujo bidireccional de iones y macromoléculas. Mediante este mecanismo, el complemento causa lisis del agente patológico objetivo (por ejemplo, células).

25 El complejo identificador de la invención, estimula una respuesta inmune hacia el agente patológico objetivo, dado que la activación de los fagocitos, en especial, los

macrófagos, actúan para regular tanto los linfocitos T como los B. Los macrófagos tragan el agente patológico objetivo enlazado al complejo de la invención y presentan los determinantes antigénicos del agente objetivo a las células T, que estimulan una respuesta inmune (respuesta Th1 y Th2), lo cual resulta en la activación de las células B y en la producción de anticuerpos contra dicho agente objetivo (respuesta Th1).

En una realización específicamente preferida, el complejo identificador de la invención induce una fagocitosis específica mediante cualquier leucocito tal como cualquiera de macrófagos y monocitos, identificado al menos a un agente objetivo. Un fagocito es una célula que traga y devora otra; el proceso de tragar y devorar es la fagocitosis. Entre los fagocitos importantes para esta invención están los macrófagos y los monocitos. Los monocitos son un tipo de células blancas sanguíneas grandes que viajan en la sangre, pero que pueden salir del torrente sanguíneo y entrar en el tejido hasta diferenciarse en macrófagos. Los macrófagos digieren restos y células extrañas. Los monocitos son caracterizados generalmente por la expresión del CD14 en la superficie celular.

De acuerdo con otra realización, el complejo identificador de la invención es identificado contra un agente patológico objetivo tal como bacterias, virus, fungus, células malignas, toxinas, venenos, haptenos y proteínas no deseadas. Así, ejemplos no limitantes para objetivos bacterianos, el complejo de la invención puede ser identificado a bacterias tales como, pero no se limitan a, *Pseudomonas*, *Estafilococo*, *Salmonella*, *E. Coli* enterotoxigénico, *Salmonella typhimurium*, *aeromonas spp.*, ántrax y también a polisacáridos bacterianos y más preferiblemente a LPS(Liposacáridos) bacterianos. Objetivos virales pueden ser

por ejemplo, virus del moquillo canino, hepatitis en humanos, particularmente, antígeno de superficie de la Hepatitis B, enfermedad de la boca y alimentaria en vacas, virus de la enfermedad de Newcastle en pollos y virus de la papa. Los venenos pueden incluir veneno de serpiente de cascabel y escorpión. El complejo de la invención también puede ser identificado a diferentes proteínas tales como transferina, factor de Willebrand von de plaquetas y plasma humano; a pequeños péptidos bio-activos tales como beta-Casocina-10; ó a haptenos tales como 1,25-dihidroxi-vitamina D y también a contaminantes ambientales.

10 Más preferiblemente, el agente patológico objetivo puede ser una bacteria seleccionada del grupo que consiste de bacteria patogénica de mastitis, bacteria enteropatogénica y bacteria de furunculosis patogénica (*Aeromonas salmonicida* en peces).

15 En una realización más específicamente preferida, el complejo identificador de la invención es identificado al menos a una bacteria patogénica de mastitis seleccionada del grupo que consiste de *Actinomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Estafilococo aureus*, *Streptococo agalactiae*, *Streptococo dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium*
20 *bovis*, *Nocardia asteroides* (o *farcinica*) y *Streptococo uberis*.

Aún, en otra realización específicamente preferida, el complejo identificador de la invención es identificado al menos a una bacteria patogénica, *Aeromonas spp.*, la cual causa una enfermedad ulcerativa en peces, particularmente en peces
25 exóticos.

Aún, en otra realización particular, el componente de reconocimiento de objetivo, comprendido dentro el complejo identificador de la invención, comprende cualquiera de anticuerpo o cualquiera de los fragmentos del mismo, ligante y receptor específico a dicho agente patológico o a cualquier fragmento funcional de dicho agente.

En una realización específicamente preferida, el componente de reconocimiento de objetivo comprende un anticuerpo o cualquiera de los fragmentos funcionales del mismo. Tal anticuerpo es capaz de reconocer específicamente dicho agente patológico o cualquier fragmento funcional de dicho agente y puede ser, por ejemplo, IgG, IgY ó IgM. Preferiblemente, el componente de reconocimiento comprende un anticuerpo IgY o cualquier fragmento funcional del mismo, específico a dicho agente patológico o a cualquier fragmento funcional de dicho agente.

El término "anticuerpo" quiere decir que incluye tanto moléculas intactas y fragmentos de las mismas, tal como por ejemplo, Fab y F(ab')₂, los cuales son capaces de enlazar antígeno. Fragmentos de Fab y F(ab')₂ que carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se limpian más rápidamente de la circulación y pueden tener menos tejido no específico enlazado que un anticuerpo intacto [Wahl y otros., J. Nucl. Med. 24: 316-325, (1983)]. Se apreciará que Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos, y en particular, ScFv son útiles en la presente invención y pueden ser usados como componente identificador del complejo, mediante los mismos métodos revelados aquí para moléculas de anticuerpo intactas. Tales fragmentos son típicamente producidos por segmentación proteolítica, mediante el uso de enzimas tales como papaína (para producir

fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$) o por procedimientos moleculares.

Un anticuerpo es dicho para ser "capaz de reconocer específicamente" o "específico para" o "específico a" una cierta célula objetivo (célula bacteriana o maligna o célula eucariota infectada con virus), si es capaz de reaccionar específicamente con un antígeno, el cual es en este ejemplo particular una molécula señal expresada extracelularmente por dicha célula, de tal modo que enlace la molécula al anticuerpo.

Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula, capaz de ser enlazada por un anticuerpo y que es adicionalmente capaz de inducir a un animal a producir anticuerpo capaz de enlazarse a un epítipo de tal antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. El término "epítipo" quiere decir que se refiere a esa porción de cualquier molécula capaz de ser enlazada por un anticuerpo, que puede ser reconocida por ese anticuerpo. Epítipos o "determinantes antígenicos" normalmente, consisten de agrupaciones de superficie activas químicamente de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y poseen características estructurales tridimensionales específicas, como también características específicas de carga.

Se aprecia que los fragmentos funcionales del objetivo, es cualquier fragmento que pueda ser reconocido por el componente de identificador del complejo de la invención. En una realización preferida cuando el componente de identificador es un anticuerpo, dicho fragmento puede ser un epítipo reconocido por dicho componente identificador.

De acuerdo con una realización específica, el complejo de identificador de la invención, comprende como un componente activo un componente activo inmunoestimulador. Mas particularmente, este agente inmunoestimulador, induce la fagocitosis. Por consiguiente, al enlazar el componente objetivo al agente objetivo patológico y la activación de la fagocitosis por dicho componente de activación, resulta en la ablación mediada por fagocito del objetivo no deseado.

El agente que induce la fagocitosis comprendido dentro del complejo identificador de la invención como un componente inmunoactivo, de acuerdo con una realización específica, puede ser un polipéptido, expresado naturalmente en una superficie celular, el cual es capaz de estimular una respuesta inmune contra la célula en un huésped. Los polipéptidos adecuados para el uso como polipéptidos de superficie celular inmunoestimuladores, incluyen, pero no se limitan a los siguientes:

- a. opsoninas tales como IgG y C3b;
- b. proteínas con residuos de carbohidrato que interactúan con el receptor de manosa-fucosa de los fagocitos;
- c. proteínas capaces de reconocer por medio de receptores en macrófagos secuestradores;
- d. ligantes para integrinas localizados en los fagocitos;
- e. glucoproteínas, tales como integrinas y selectinas; y
- f. fucosil transferasa, la cual genera un epítipo Ga1-Ga1 reconocido por macrofagos.

De acuerdo con una realización específica, la inmunoglobulina G (IgG) es el componente activo inmunoestimulador preferido para el uso en esta invención.

Una proteína de IgG, contiene: (1) una región Fab (que incluye los dominios VH, VL y CH₁); (2) una región de pivoteo, y (3) una región Fc (que incluye los dominios CH₂ y CH₃). La región Fab es la región de una proteína de anticuerpo que incluye las porciones que enlazan anticuerpo. La región "de pivoteo" es un área flexible en el polipeptídico de inmunoglobulina, que contiene muchos residuos del aminoácido prolina y es donde el fragmento Fc junta uno o los dos fragmentos Fab. La región Fc es la región constante en un polipéptido de inmunoglobulina; está localizada en las cadenas pesada de inmunoglobulina; y no está involucrada en el enlace de antígenos. La región Fc puede enlazarse a un receptor Fc en los fagocitos. El extremo amino-próximo del dominio CH₂, especialmente los aminoácidos 234 a 237, es importante para enlazar la región Fc del receptor Fc. Los receptores Fc, tal como Fc RI, son proteínas integrales de membrana localizados en las células blancas fagocíticas sanguíneas, tal como los macrófagos. La región de pivoteo es importante para la regulación de la interacción del receptor Fc-Fc, que proporciona flexibilidad al polipéptido y que funciona como un espaciador.

La inmunoglobulina utilizada para componente inmunoestimulador, se puede obtener de cualquier vertebrado, tal como un humano o ratón. Preferiblemente, el polinucleótido codifica una inmunoglobulina que posee un número sustancial de secuencias que son del mismo origen el huésped. Por ejemplo, si un humano es tratado con un complejo de la invención, preferiblemente, la inmunoglobulina es de origen humano.

En consecuencia, se apreciará que preferiblemente, la IgG es generada en las mismas especies como el sujeto afectado por dicho agente patológico.

La IgG Fc asociada al soporte sólido (o cualquier otro componente de conexión) en la orientación contraria, conserva la función biológica de IgG Fc de enlazar el receptor Fc para mediar la activación del macrófago. Por lo tanto, se señala que la IgG Fc, debe proyectarse a distancia del componente de conexión del complejo de la invención, en una "orientación contraria", entonces asemejando la configuración de la IgG durante la opsonización. Esta IgG, la cual sirve como el componente activo que enlaza el receptor Fc a los fagocitos activados, tal como macrófagos, y también puede activar la cascada del complemento ("fijación del complemento").

Los fagocitos responden a señales de los receptores Fc mediante el ensamblaje de proteínas citoesqueléticas, que señala el ensamble de proteínas citoesqueléticas por la activación de quinasas de proteína de tirosina, y por la "fagocitación" de células recubiertas con inmunoglobulina. La interacción IgG-Fc RI activa varias funciones biológicas tales como fagocitosis, endocitosis, ADCC, liberación de mediadores de inflamación y producción de anión superóxido. Los macrófagos poseen proteínas transportadoras de aniones orgánicos que promueven la afluencia de sustancias aniónicas del macrófago. De este modo, el Fc RI media la ADCC por macrófagos y desencadena tanto la fagocitosis como la producción de superóxido. Por esta razón, los complejos de la invención donde el dominio Fc de la IgG está asociado como un componente activo, interactúa con el receptor Fc del fagocito y hace que los fagocitos se enlacen al complejo enlazado al agente patológico objetivo (a través de su componente identificador), que induce la ADCC. Los isotipos IgG₁ e IgG₃, que interactúan con el receptor de alta afinidad Fc RI en macrófagos, son preferidos para los complejos y métodos de la invención.

Los macrófagos, las células dendríticas y las células B, todas son células presentadoras de antígeno (APC), que también pueden presentar antígenos a las células T. En esta forma, las APCs están involucradas en otros componentes de la respuesta inmune, que incluye la respuesta inmune humoral (producción de anticuerpos) y la respuesta inmune celular. De este modo, las APCs que tragan el complejo de la invención que estimula el enlace y la entrada del patógeno vía el receptor Fc, presenta los determinantes de antígeno del agente objetivo a las células T, estimula la respuesta inmune celular y humoral específica para el agente objetivo. Esta posibilidad particular es ventajosa especialmente en infecciones virales, donde ninguna terapia está disponible. Por lo tanto, el complejo de la invención puede ser utilizado como una terapia específica en infecciones virales.

De acuerdo con otra realización preferida, el componente de conexión opcional comprendido dentro del complejo identificador de la invención, puede ser cualquiera de un soporte sólido tal como perlas de poliestireno, perlas de Sefarosa, perlas de agarosa, perlas de celulosa, un enlazante químico, un enlazante péptido, oligopeptídico o polipeptídico, un enlazante sacárido, oligosacárido o polisacárido, enlazante poli-amina y lipídico y cualquier proteína o proteína de andamiaje particularmente.

Como se indicó anteriormente, ambos componentes: el activo y el identificador pueden ser asociados por un enlazante químico al componente de conexión opcional. Alternativamente, el enlazante químico, en sí mismo puede funcionar como el componente de conexión. Las proteínas entrecruzadas (cross-linking) son bien conocidas en la técnica, véase por ejemplo, Chemistry of Protein Conjugation

and Cross linking (Química de Conjugación de Proteína y entrecruzamiento), Shan S. Wong, CRC Press, 1991. Las proteínas pueden ser entrecruzadas por sus grupos funcionales. Normalmente, los grupos SH y NH₂ de las proteínas, son utilizados para ése propósito. Los grupos químicos que reaccionan con grupos SH incluyen, p. ej., grupos dítio, que incluye grupos piridildítio, grupos haloacetamido, que incluyen grupos yodoacetamido, grupos maleimido, que incluyen grupos alquilmaleimido y los grupos similares conocidos por la persona versada. Los grupos amino pueden ser acoplados mediante el uso de grupos éster de N-hidroxisuccinimida opcionalmente sulfonados, grupos imidoéster, que incluyen grupos metil pimelimidato y metil suberimidato ó grupos carbodilimida. También se pueden utilizar grupos carboxilos libres de una proteína para el entrecruzamiento, p. ej., mediante el uso de grupos amino tal como un grupo alquilamino y que proporciona un agente de deshidratación en la reacción.

El entrecruzante utilizado para la asociación adecuada de ambos componentes complejos, puede ser homobifuncional o heterobifuncional. Ejemplos de entrecruzantes homobifuncionales incluyen disuccinimidil suberato (DSS), disuccinimidil glutarato (DSG) y dimetil suberimidato (DMS). Ejemplos para entrecruzantes heterobifuncionales incluyen éster de m-maleimideobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) y éster de N-gamma-maleimidobutiriloxi-succinimida (GMBS). Aún en otra realización de la invención, un entrecruzante es capaz de reaccionar inespecíficamente con proteínas, por ejemplo mediante fotoactivación. Ejemplos para grupos fotoreactivos p. ej., son los grupos azidobenzilo, azido-nitrobenzilo, azido-hidroxibenzilo ó azido-cumarin. Ejemplos de entrecruzantes fotoreactivos incluyen p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionato (PNP-DTP) y azidobenzoilhidrazida.

También se puede utilizar un entrecruzante reactivo a carbohidrato. Grupos reactivos a carbohidratos incluyen, p. ej., el grupo aldehído, el grupo glioxal, ó el grupo sulfona. Los entrecruzantes reactivos con carbohidratos incluyen, p. ej., los anteriores azidobenzoilhidrazida, 4-[m-maleimidometil]-ciclohexan-1-carboxilhidrazida (M_2C_2H) ó hidrazida del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico (MPBH). Si cualquiera de los componentes del complejo (activo, identificador y componente de conexión opcional) no contienen residuos de cisteína, se puede utilizar un entrecruzante foto-reactivo o un entrecruzante amino-reactivo, tal como el derivado N-hidroxi succinimida activado del anterior M_2C_2H o MPBH, p. ej., la hidrazida del ácido 4-(4-(succinimido-N-oxo)-fenil)-butírico. Alternativamente, cuando se desea utilizar el carbohidrato anterior y entrecruzantes de sulfhidrilo reactivo, se puede utilizar un segundo entrecruzante, el cual puede ser enlazado a la parte de sulfhidrilo reactivo del primer entrecruzante. Entonces, la proteína puede ser acoplada vía la segunda funcionalidad del segundo entrecruzante, el cual ventajosamente es un grupo reactivo con grupos amino, tal como un grupo éster de N-hidroxisuccinimida activado.

Los anteriores entrecruzantes señalados son comercialmente disponibles, p. ej., de PIERCE, así enlistados en p. O-90 a O-104 de 1994 Life Sciences Product Catalog and Hanbook of PIERCE, (Hanbook y Catálogo de Productos, Ciencias de la Vida de PERCE, 1994), Rockford, IL 61105 E. U. ó de otros proveedores en el campo de la Química Orgánica, tal como Sigma, ST. Louis, E. U.

La conjugación de proteínas inmunológicamente activas, es descrita en US 5,399,501, p. ej., anticuerpos, en una fase sólida vía una serie bastante elaborada

de tres moléculas distintas: primero, un entrecruzante el cual, se enlaza a los grupos amino, carboxilo o tiol en la superficie de la fase sólida y proporciona un grupo capaz de reaccionar con tioles (p. ej., maleimido); segundo: un entrecruzante que se enlaza a los grupos NH_2 de la proteína a ser conjugada y también proporciona un grupo capaz de reaccionar con tioles (p. ej., maleimido); y tercero: un reactivo de ditiol capaz de unirse la fase sólida unida al grupo tiol reactivo con el grupo tiol reactivo unido a la proteína. Este juego de entrecruzantes pueden ser utilizados en la presente invención, para el propósito de entrecruzar el componente identificador (p. ej., IgY) y el componente activo (IgG) juntos, o asociar ambos componentes a un componente de conexión (tal como un soporte sólido, perlas, etc).

En otra realización de la invención, el componente activo o el componente identificador, puede ser entrecruzado directamente al componente de conexión que puede ser por ejemplo, un soporte sólido que comprende carbohidratos. Esto se puede alcanzar p. ej., mediante el uso de un entrecruzante bifuncional capaz de reaccionar con carbohidratos por un lado y con proteínas por el otro. Por ejemplo, el entrecruzante azidobenzoil hidrazida (ABH), puede se acoplado al componente activo o al identificador, mediante el uso del grupo azida foto-activable del entrecruzante para enlazarse inespecíficamente a dicho componente. En una segunda etapa, este componente "activado" puede entonces, ser reaccionado con el soporte sólido, de tal modo, que el grupo hidrazida reactivo a carbohidrato del entrecruzante se enlaza a las unidades de glucosa en el carbohidrato. Este enlace no-covalente, puede ser entonces permitido, al depender de las condiciones de reacción tales como: la concentración de la sal, la presencia de soluciones cáusticas, tiempo de reacción y similares; formar el complejo deseado.

La asociación de ambos componentes se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el uso de un enlazante peptídico como componente de conexión. El enlazante peptídico es un péptido de secuencia adecuada de aminoácidos, la cual se espera que no interfiera con la estructura secundaria y terciaria de ambos componentes. El enlazante peptídico puede ser conectado al componente activo o identificador mediante un entrecruzante, como los descritos anteriormente para enlazar proteínas. Los grupos funcionales necesarios para el entrecruzamiento pueden ser proporcionados en el enlazante peptídico mediante la elección de aminoácidos. Por ejemplo, Lisina o Arginina, se seleccionan cuando es deseado utilizar grupos aminoácidos para entrecruzamiento. Los residuos de cisteína, se escogen cuando se desea utilizar grupos sulfhidrilo para el entrecruzamiento. Se puede seleccionar el ácido Glutámico o Aspártico, cuando se desea utilizar grupos de ácido carboxílico para el entrecruzamiento. Los grupos que no son deseados para ser reaccionados, se pueden proteger mediante un grupo protector adecuado como se conoce en la técnica para grupos amino, carboxilo o sulfhidrilo.

El enlazante puede comprender preferiblemente entre 10 y 150 aminoácidos en extensión. Además, preferiblemente, el enlazante comprende aminoácidos pequeños, no cargados, tales como Glicina, Alanina, Valina, Serina o Treonina. El enlazante preferiblemente contiene residuos de glicina y serina. La relación entre los residuos de glicina y serina es preferiblemente alrededor de 3:1 a 4:1. Un ejemplo para un enlazante de 17 aminoácidos Glicina/Serina es GGGGSGGGGSGGGGSGG.

Alternativamente, ambos componentes pueden ser enlazados vía un péptido, mediante el uso de tecnología de DNA recombinante.

5 En una realización preferida, la asociación de ambos, el componente activo y el identificador a través de un soporte sólido, puede ser realizada por el sistema de avidina-biotina, así descrito en un gran número de publicaciones. La molécula de avidina es una proteína originalmente aislada de la proteína del huevo de gallina. Esta proteína puede ser expresada como una proteína de fusión con uno de los componentes de complejo, ó preferiblemente puede estar entrecruzada al

10 componente de conexión (soporte sólido, tal como perlas). El otro componente puede ser entonces entrecruzado a la biotina, la cual es una molécula pequeña de vitamina. Los métodos para entrecruzar biotina a proteínas son bien conocidos para la persona versada en la técnica y se han publicado ampliamente en muchos artículos y libros de texto. Aún, en otra opción, el componente de conexión puede

15 ser una molécula de avidina o cualquier fragmento de la misma. En tal caso, el componente identificador debe ser biotilado y el componente inmunoactivo sería un anticuerpo IgG anti avidina. Se apreciará que otros sistemas de alta afinidad se pueden utilizar para asociar el complejo de la invención. Tales sistemas incluyen como ejemplos no limitantes el sistema GST-glutación y CBD-celulosa.

20 En otra realización preferida, el complejo de la invención comprende únicamente componente de objetivo y componente inmunoactivo. Ambos componentes están directamente unidos sin ningún componente de conexión. De acuerdo con esta realización particular, el componente de objetivo puede ser un anticuerpo identificado contra el agente objetivo, por ejemplo un anticuerpo IgY y el

25 componente activo sería un anticuerpo IgY anti IgG. El enlace de ambos

componentes conserva la conformación adecuada (que posee el Fc de la molécula libre de IgG).

5 Será apreciado que cualquier complejo identificador de la invención, puede estar comprendido de diferentes componentes identificadores identificados a diferentes fragmentos de un patógeno objetivo o a diferentes patógenos.

10 En una realización particular, la invención se refiere a un complejo identificador multifuncional que induce fagocitosis específica de al menos una bacteria patogénica de mastitis objetivo en ganado vacuno infectado por dicha bacteria. Este complejo específico comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a la bacteria patogénica de mastitis o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria; (b) al menos un componente inmunoactivo que
15 comprende el agente que induce la fagocitosis; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que se asocia al menos dicho componente identificador y al menos dicho componente activo. Ambos componentes el activo y el identificador están asociados, opcionalmente por el componente de conexión, en una conformación adecuada, la cual conserva las funciones biológicas
20 independientes de ambos componentes.

Este complejo identificador de acuerdo con una realización específica, comprende como un componente de reconocimiento del objetivo, un anticuerpo IgY específico para la bacteria patogénica de mastitis. Más específicamente, el complejo identificador de la invención puede comprender al menos un anticuerpo IgY
25 específico para al menos una bacteria patogénica de mastitis tal como, pero no se limita a, *Actinomyces*, *E. Coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Estafilococo aureus*,

Streptococcus agalactiae, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* (o *farcinica*) y *Streptococcus uberis*, micoplasma, virus y endotoxinas.

- 5 Opcionalmente, dicho complejo puede comprender diferentes anticuerpos IgY, cada uno identificado a una bacteria patogénica de mastitis diferente.

10 De acuerdo con una realización específicamente preferida, el complejo identificador de la invención, comprende como un agente que induce la fagocitosis, una molécula de IgG, preferiblemente generada en un animal bovino.

15 En otra realización específica, la invención se refiere a un complejo identificador multifuncional para inducir la fagocitosis específica de al menos una bacteria patogénica objetivo, que causa enfermedad ulcerativa en peces infectados por dicha bacteria, dicho complejo comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento de objetivo, que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a bacteria patogénica de *Aeromonas spp*, que causa la enfermedad ulcerativa en peces, o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria; (b) un componente activo que comprende agente que induce la fagocitosis; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, en donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo se conservan.

25 Los complejos de identificador particulares de la invención, además pueden comprender como un componente de conexión opcionalmente, cualquiera de,

pero no se limita a, soporte sólido, un enlazante químico, enlazante polipeptídico, enlazante proteico, polisacárido y un enlazante lipídico.

5 Tal soporte sólido puede ser por ejemplo una perla en micros-esfera de poliestireno y más particularmente, una perla de poliestireno recubierta con avidina. En este caso particular, el componente de reconocimiento del objetivo, puede ser un anticuerpo IgY biotinilado específico para la bacteria patogénica de mastitis. Adicionalmente, este complejo identificador particular, puede comprender preferiblemente como el agente que induce la fagocitosis, una molécula IgG anti-
10 avidina, la cual es más preferiblemente, generada en un animal bovino.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición para el tratamiento de un trastorno patológico en un sujeto. La composición de la invención comprende como ingrediente activo un complejo identificador
15 multifuncional de acuerdo con la invención.

La composición de la invención, además puede comprender opcionalmente diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

20 De acuerdo con una realización, la composición de la invención es pretendida para el tratamiento de un trastorno patológico, que puede ser cualquiera de trastornos inmuno-relacionados, infecciones virales, fúngicas o bacterianas y trastornos malignos, en un sujeto que requiera de tal tratamiento.

El trastorno patológico a ser tratado, puede ser una infección viral causada por
25 diferentes virus tales como el virus de la influenza, virus de inmunodeficiencia humana, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus de vaccinia, virus de

hepatitis, enfermedad de la boca y alimentaria, virus de la enfermedad de Newcastle y el virus de la herpes, ó una enfermedad maligna tal como melanoma, carcinoma, linfoma y sarcoma.

5 El sujeto a ser tratado, puede ser, de acuerdo con una realización preferida, cualquiera de: Humano, mamífero doméstico y no doméstico, ave doméstica, cultivos acuáticos, preferiblemente, peces y peces exóticos de acuario. Debe ser
10 apreciado que el sujeto tratado puede ser también cualquier reptil o animal de zoológico. Más preferiblemente, la composición de la invención es pretendida para mamíferos domésticos. Se entiende por "sujeto mamífero" cualquier mamífero para el cual es deseada la terapia propuesta, que incluye sujetos humanos, equinos, caninos, felinos y más preferiblemente, ganado vacuno, particularmente
15 animales bovinos tales como vacas, cabras y ovejas. Aún, en otra realización específica, el complejo y la composición de la invención, son pretendidos para el tratamiento de peces domésticos y peces exóticos, tales como por ejemplo, pez carpa y *Koi*.

En una realización particular, el trastorno patológico a ser tratado con la composición de la invención, puede ser una infección bacteriana. Más
20 preferiblemente, la infección bacteriana puede ser la mastitis bovina.

En consecuencia, la invención proporciona además una composición para el tratamiento de mastitis en animales bovinos. Tal composición específica, de acuerdo con una realización, comprende como ingrediente activo un complejo
25 identificador multifuncional que induce la fagocitosis específica al menos a una bacteria patogénica de mastitis objetivo en bovino infectado por dicha bacteria.

Más específicamente, el complejo comprendido entre esta composición específica para mastitis, comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo, que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicha bacteria patogénica de mastitis o cualquier fragmento de dicha bacteria, (b) un
5 componente activo que comprende agente que induce la fagocitosis; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo. Se señala que mediante la asociación de ambos componentes, opcionalmente por el componente de conexión, las funciones biológicas independientes del componente
10 identificador y del componente activo se conservan.

De acuerdo con una realización específicamente preferida, la composición de la invención comprende como un ingrediente activo, un complejo que comprende una perla de poliestireno recubierta con avidina, como un componente de
15 conexión; un anticuerpo IgY biotinilado específico para bacteria patológica de mastitis, como el componente identificador y una molécula de IgG anti-vidina, la cual es más preferiblemente, generada en un animal bovino.

La invención, además proporciona una composición para el tratamiento de
20 enfermedad ulcerativa en peces. Tal composición específica, comprende como ingrediente activo un complejo identificador multifuncional, que induce la fagocitosis específica al menos a una bacteria patogénica de *Aeromonas spp.* objetivo en peces infectados por dicha bacteria, dicho complejo comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una
25 molécula, la cual se enlaza específicamente a dicha bacteria patogénica de *Aeromonas spp.* o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria,

preferiblemente, tal componente puede ser anticuerpo IgY, el cual reconoce específicamente determinantes antigénicos de dicha bacteria; (b) un componente activo que comprende agente que induce fagocitosis, preferiblemente, una molécula de inmunoglobulina, generada en peces, y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, en donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo se conservan.

La presente invención además se refiere a una composición para inducir una fagocitosis específica identificada al menos a un agente patológico objetivo relacionado con un trastorno patológico en un sujeto que sufre de dicho trastorno. De acuerdo con una realización, esta composición comprende como un ingrediente activo, el complejo identificador multifuncional de la invención, y además opcionalmente comprende diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica o veterinariamente aceptables.

De acuerdo con una realización específica, la invención se refiere a una composición para inducir una fagocitosis específica de al menos un patógeno bacteriano de mastitis objetivo en un animal bovino hembra que sufre de mastitis. Esta composición comprende como un ingrediente activo, un complejo que comprende una perla de poliestireno recubierta con avidina, como un componente de conexión; un anticuerpo IgY biotinilado específico para bacteria patogénica de mastitis, como el componente identificador; y una molécula de IgG anti-avidina, la cual es más preferiblemente, generada en bovinos y además, comprende opcionalmente diluyente, excipiente y/o aditivo de soporte farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

Aún, en otra realización particular, la invención además proporciona una composición para inducir una fagocitosis específica de al menos un patógeno bacteriano de *Aeromonas spp* .objetivo en un pez que sufre de enfermedad ulcerativa. Tal composición específica comprende como un ingrediente activo un complejo identificador multifuncional de acuerdo con la invención, y además, opcionalmente comprende diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de un trastorno patológico en un sujeto. El método de la invención comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo identificador de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica que comprende el mismo.

Así como se utiliza aquí "cantidad eficaz", significa una cantidad necesaria para alcanzar un resultado selecto. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la composición de la invención útil para inducir el efecto inmunoestimulador identificado y preferiblemente, fagocitosis hacia el agente patológico objetivo.

El complejo de la invención puede ser administrado directamente al sujeto a ser tratado, ó puede ser conveniente para el sujeto, la administración de composiciones que comprendan dicho complejo identificador y puede ser conveniente agregar portadores aceptables, adyuvantes o diluyentes a la composición antes de su administración. Las formulaciones terapéuticas se pueden administrar en cualquier formulación de dosificación convencional.

Típicamente, las formulaciones comprenden al menos un ingrediente activo, como el definido anteriormente, junto con uno o más portadores aceptables del mismo.

5 Cada portador debe ser, tanto farmacéutica como fisiológicamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes y no ser perjudicial para el sujeto. Las formulaciones incluyen aquellos adecuados para la administración oral, rectal, nasal o parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa, intramamaria e intradérmica). Las formulaciones, se pueden presentar de manera conveniente en forma de dosis de unidad y puede ser preparada mediante
10 métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. La naturaleza, disponibilidad y fuentes, y la administración de todos aquellos compuestos que incluyen las cantidades eficaces necesarias para producir efectos deseables en un sujeto, son bien conocidas en la técnica y no requieren ser descritos aquí adicionalmente.

15 Las composiciones de la invención, pueden contener además un portador, aditivo, diluyentes o excipiente farmacéuticamente aceptables. Portadores adecuados comprenden, p. ej., soluciones amortiguadoras salinas de fosfato salino y solución salina con 5% de HSA o PPF. Otros portadores adecuados, son bien conocidos para aquellos versados en la materia y que no son una limitación en la presente
20 invención. De manera similar, una persona versada en la materia, podrá enseguida, seleccionar otros componentes deseados para incluirlos en una composición farmacéutica de la invención y tales componentes no son una limitación de la presente invención.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención, en general comprenden además un agente de amortiguación, un agente el cual ajusta la osmolaridad de

las mismas y opcionalmente, uno o más portadores, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables, así conocidos en la técnica. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios en las composiciones. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y propilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede conservar la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes.

La composición de la invención puede ser mezclada con material de alimento nutritivo o provisiones de agua para el animal. No obstante, se contempla que la composición eficaz puede ser mezclada con material de alimento nutritivo o agua o alimento para el animal, de manera separada. La composición eficaz, debe ser proporcionada en una cantidad eficaz a fin de estimular la reacción inmunoestimuladora identificada y preferiblemente, la fagocitosis hacia el agente patológico.

Más preferiblemente, el complejo o las composiciones de la invención pueden ser administradas mediante una ruta seleccionada de: administración oral, intravenosa, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravaginal, intranasal, mucosal, sublingual, tópica y rectal y cualquiera de las combinaciones de las mismas. Para el tratamiento de la mastitis, se prefiere la administración intramamaria tópica. Para el tratamiento de enfermedad ulcerativa, particularmente, furculosis en peces, son preferidas la administración tópica o intraperitoneal. Se debe señalar que el tratamiento tópico preferido en los peces,

se puede realizar mediante la inmersión de los peces en agua que contiene el complejo específico de la invención.

5 Las formas farmacéuticamente adecuadas para el uso de inyección, incluye soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación ocasional de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida, a tal grado que posea fácil capacidad de inyectabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción contaminante de
10 microorganismos, tales como bacterias y fungus.

La prevención de la acción de microorganismos se puede producir mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares ó cloruro de sodio. La absorción
15 prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso de agentes que retardan la absorción, en las composiciones, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles, se preparan por la incorporación de
20 compuestos activos en la cantidad requerida, en el solvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones son preparadas por la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril, el cual contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de
25 aquellos enumerados anteriormente.

5

En el caso de polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, el método preferido de preparación son las técnicas de secado por vacío y deshidratación por congelación, las cuales producen un polvo del ingrediente activo más cualquiera de los ingredientes adicionales deseados de una solución previamente filtrada y estéril del mismo.

10

En una realización, el método de la invención utiliza cualquiera de las composiciones de acuerdo con la invención. Más preferiblemente, aquellas composiciones que comprenden como un ingrediente eficaz, cualquiera de los complejos identificadores de la invención.

15

Aún, en otra realización, el método de la invención es pretendido para el tratamiento de un trastorno patológico, el cual puede ser cualquiera de trastornos inmuno-relacionados, infecciones virales, fúngicas o bacterianas y trastornos malignos.

20

En una realización específicamente preferida, el trastorno patológico puede ser una infección bacteriana.

25

En una realización particularmente preferida, la invención se refiere a un método para el tratamiento de mastitis en bovinos. Este método específico comprende administrar a dicho bovino que lo requiere, una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo identificador capaz de inducir la fagocitosis específica al menos a una bacteria patogénica de mastitis objetivo en dicho bovino infectado, ó de una composición farmacéutica que comprende el mismo, dicho complejo comprende: (a) al menos un componente de reconocimiento del objetivo, que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicho agente patológico o a

cualquier fragmento funcional de dicho agente; (b) un componente activo que comprende un agente inmunoestimulador; y (c) opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo. La asociación de dicho componente identificador y de dicho componente activo, opcionalmente por dicho componente de conexión, debe conservar las funciones biológicas independientes de ambos: el componente activo y el identificador.

La invención proporciona además, un método para la estimulación de la actividad del fagocito específica. Un complejo identificador que contiene la IgG se pone en contacto con un fagocito, tal como un macrófago u otra APC. El contacto estimula una actividad fagocítica incrementada por el fagocito. El fagocito puede tragar el complejo enlazado al agente objetivo y es capaz de eliminar rápidamente dicho agente patológico del huésped.

Aún, en otra realización particularmente preferida, el método de la invención utiliza una composición particular de la invención. De acuerdo con esta realización, esta composición comprende como un ingrediente activo, un complejo que comprende una perla de poliestireno recubierta con avidina como componente de conexión, un anticuerpo IgY biotinilado específico para la bacteria patogénica de mastitis, como el componente identificador, y una molécula de IgG anti avidina, la cual es más preferiblemente generada en bovinos. Esta composición particular, además, puede comprender además diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

Aún, adicionalmente, la invención se refiere a un método para el tratamiento de enfermedad ulcerativa en peces, que comprende la administración a dicho pez que lo requiere, una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo identificador, capaz de inducir fagocitosis específica identificada al menos a una bacteria patogénica de *Aeromonas spp* en dicho pez infectado, de acuerdo con la invención, o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

La presente invención, además se refiere al uso de un complejo identificador multifuncional de la invención, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno patológico en un sujeto que lo requiera.

Este trastorno patológico, de acuerdo con una realización específica, puede ser cualquiera de trastornos inmuno-relacionados, infecciones virales, fúngicas o bacterianas y trastornos malignos. Preferiblemente, el trastorno patológico es una infección bacterial.

En otra realización específicamente preferida, la invención se refiere al uso de un complejo identificador multifuncional específico, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de mastitis en bovinos. Este complejo particular comprende una perla de poliestireno recubierta con avidina como un componente de conexión; un anticuerpo IgY biotinilado específico para bacteria patogénica de mastitis, como el componente identificador; y una molécula de IgG anti avidina, la cual es más preferiblemente generada en bovinos.

Aún, en otra realización, la invención se refiere al uso de otro particular complejo identificador multifuncional, en la preparación de una composición farmacéutica

para el tratamiento de mastitis en bovinos. Tales complejos comprenden un componente identificador y un componente inmunoactivo, ambos son directamente unidos sin ningún componente de conexión. De acuerdo con tal realización, el componente identificador puede ser un anticuerpo IgY dirigido
5 contra bacteria patogénica de mastitis y el componente inmunoactivo es un anticuerpo IgY anti IgG. El enlace de ambos componentes conserva la conformación adecuada (que posee el Fc de la molécula libre de IgG).

A menos que se defina de otra forma, todas las técnicas y términos específicos
10 utilizados aquí, a las que esta invención pertenecen, tienen el mismo significado como el entendido de manera usual por una persona normalmente versada en la materia. Todas las patentes y publicaciones citadas en esta descripción son incorporadas como referencia.

En lo revelado y descrito, será entendido que esta invención no se limita a los
15 ejemplos particulares, etapas de procesos y materiales revelados aquí, así tales etapas de proceso y materiales pueden variar en algo. También se entenderá que la terminología utilizada aquí es usada para el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no es pretendida para ser limitada, ya que el alcance de
20 la presente invención será limitado únicamente por las reivindicaciones anexas y equivalentes de las mismas.

A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que continúan, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprender" y sus
25 variaciones tales como "comprende" y "que comprende", serán entendidas para implicar la inclusión de una entidad completa establecida o etapa o grupo de

entidades completas o etapas, pero no la exclusión de cualquier otra entidad o etapa o grupos de entidades completas o etapas.

5 Se debe señalar que, como se utilizó en esta descripción y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un" "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido imponga lo contrario.

10 Los siguientes ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo los aspectos de la presente invención. Debe ser apreciado que mientras que esas técnicas sean ejemplares de realizaciones preferidas para la práctica de la invención, aquellos versados en la materia, a la luz de la presente divulgación, reconocerán que se han podido realizar numerosas modificaciones sin apartarse de la esencia y el alcance de la invención.

15 Ejemplos

Procedimientos Experimentales

Bacterias

20 Los patógenos específicos de mastitis (*Estafilococo aureus*, *Streptococo agalactiae*, *Streptococo dysgalactiae*, *Streptococo uberis*, y *E. coli*) fueron adquiridos bien sea a partir de ATCC (Hy Lab, Rehovot, IL) o tomados a partir de los patrones de las Autoridades Veterinarias Israelíes (Beit Dagan, IL), de acuerdo con los siguientes números de acceso: *Estafilococo aureus*, 2449/1; *E. coli*, Ein Hashofet 169. ATCC: *Streptococo agalactiae* ATCC 27956, *Streptococo dysgalactiae* ATCC 27957, *Streptococo uberis* ATCC 27958.

25

Preparación del Antígeno

Tanto bacterias como también proteínas purificadas fueron empleadas como antígenos para la producción de IgY específico. Las bacterias se cultivaron en un medio específico tal como se indica a continuación, y se separaron para
5 vacunación tal como sigue;

Las bacterias secadas por congelamiento (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *dysgalactiae* y *uberis*) se descongelaron [1 ml de caldo nutritivo (NB) (Difco, Detroit, MI)], inoculadas sobre agar de sangre e incubadas a 37° C durante
10 24 h hasta confirmar vitalidad y pureza. Se seleccionaron 3-4 colonias y se inocularon en 250 ml a 37° C de caldo Columbia (CB) (Difco, Detroit, MI) (12-24 h a 37° C) complementado con 0.1% de D-glucosa, extracto de levadura, y 0.5% de NaCl en un Ehrlenmeyer de 1 litro e incubadas a 37° C durante 10 h. Los
15 *Streptococos* se inocularon en 250 ml de NB a 37° C. Las bacterias se separaron mediante centrifugación (1000 x g, 15 min) y el pellet fue lavado (x 3) y resuspendido en PBS no pirogénico (pH 7.6; 0.01M) hasta aproximadamente 1.2×10^9 células, tal como es indicado por el estándar 4 de equivalencia de turbidez de McFarland (1.2×10^9 célula/ml) (remal, 12076 Santa Fe, Lenexa, Ks). Para
20 confirmar la pureza, fueron inoculadas e incubadas placas de agar de sangre. El pellet fue sometido a agitación mecánica con perlas de vidrio por medio de un homogenizador celular (Braun Melsungen AG, Alemania). Después de remover las perlas de vidrio y las bacterias intactas, el homogenizado se filtró a través de membranas de 0.2 μ m de tamaño de poro, las concentraciones de proteína fueron
25 determinadas con el kit Protein Assay (Bio-Rad, UK) y almacenado a -20° C. Para confirmar esterilidad, se inocularon e incubadas las placas de agar de sangre bajo condiciones apropiadas.

En un método adicional, las bacterias se inocularon y se permitió que crecieran tal como se describió anteriormente. Después de la incubación, las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 10,000 x g durante 20 minutos y posteriormente fueron suspendidas en PBS 50 mM (pH 7.0). Las bacterias se dividieron entonces en tres grupos para los siguientes procesos: (1) inactivación con formaldehído (0.05%), (2) inactivación por medio de calor (100° C durante 10 minutos), y (3) sonicación. Una mezcla de las fracciones tratadas fue utilizada para vacunación

10 *Preparación del antígeno de E. coli*

Se cultivaron *E. coli* en 250 ml de NB (Difco, Detroit, MI)], en un Ehrlenmeyer de 1 litro e incubados a 37° C durante 24 h. El pellet de las bacterias se sonicó con perlas de vidrio tal como se describió anteriormente.

Preparación del componente identificador

15 *Producción de IgY*

Se inmunizaron de tres a seis gallinas comerciales White Leghorn de 35-50 semanas de edad por grupo, por medio de una inyección intramuscular en dos lugares del músculo pectoral de 0.05 - 0.5 mg de antígeno con adyuvante incompleto de Freund, en un volumen total de 0.8-1.0 ml por gallina. El adyuvante comprendía la mitad del volumen inyectado. Se proporcionó una inyección de impulso intramuscularmente 2-3 semanas después con la misma dosis emulsificada con adyuvante incompleto de Freund. Se recolectaron muestras de sangre de una vena en el ala, cada semana después de la inyección inicial. Los huevos fueron recolectados diariamente y almacenados por debajo de 20° C hasta que fueron analizados.

Aislamiento del IgY a partir de la yema de huevo

La IgY fue aislada por medio de las siguientes etapas:

1. Separación de la yema de la clara;
2. Disolución en agua de las yemas (10 ml de yema a 100 ml de agua), pH = 6.8 y
5 agitación con un mezclador eléctrico en una temperatura inferior a 20° C
 durante 4-6 horas;
3. Deslipidación mediante filtración de la fracción soluble en agua bajo vacío a
 través de un papel de filtro (1574 Runfilter, Schleicher & Schuell GmbH,
 Alemania).
- 10 4. Precipitación de las proteínas solubles filtradas por medio de sulfato de amonio
 (60 % ; p/v)
5. Centrifugación (10000g, 20 min) y re-suspensión del precipitado en medio de
 sulfato de amonio (60% p/v) a 4° C.
6. Aislamiento de la IgY a través de filtración por gel, empleando técnicas de gel T
15 (Pierce, E. U.), intercambio aniónico (DEAE-Sephacel) y filtración por gel
 (Ultrogel AcA 22).
7. Las IgY crudas (5) o purificadas (6) se diluyeron en un orden de dilución serial
 1: 10 con PBS antes del uso.

Especificidad de la IgY

Dado que la mayoría de las aves comerciales son vacunadas rutinariamente
contra NDV (Enfermedad de New Castle), los anticuerpos de anti-NDV fueron
utilizados para probar la eficiencia del aislamiento de la IgY. Esto fue realizado
mediante la prueba de inhibición de hemoaglutinación.

ELISA para bacterias intactas

Prueba de ELISA cuantitativa para la medida de concentraciones IgY anti-bacterias específicas y de IgY Estándar: Los pozos en una placa se recubrieron durante la noche con 100 µl de polilisina (10 µg/ml), posteriormente se adicionaron 200 µl de bacterias específicas en caldo (0.3 OD). Veinticuatro horas después, se
5 adicionaron 100 µl de glutaraldehído (0.07%) durante 15 min y se lavó con PBS. Los pozos se bloquearon 100 µl de leche en polvo al 2% y glicina 100 mM. Las muestras crudas de IgY fueron diluidas en forma seriada en PBS (Akita y Nakai, 1992) y se aplicaron 100 µl de dilución serial 1:10 en duplicados a los pozos. Las placas se incubaron a 37° C durante 2 h y lavadas con PBS-T (Solución salina de
10 buffer fosfato-TWEEN20™ y posteriormente incubadas con 100 µl de conjugado de IgY de conejo anti-pollo con peroxidasa de rábano (1:10000 en PBS). Después de la incubación a 37° C durante 1 h, las placas se lavaron veces con PBS-T (Solución amortiguadora salina de fosfato -TWEEN 20), seguido por la adición de 100 µl de solución de sustrato recientemente preparada, 2-2-azino-bis (ácido 3-
15 etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en 0.05 M de solución amortiguadora de citrato de fosfato (pH 5.0). La densidad óptica se registró entonces a 450 nm.

Prueba de Aglutinación – IgY y patrón de crecimiento de bacterias

A fin de examinar el grado de reconocimiento de antígenos de membrana externa por la IgY y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, diversos
20 patógenos bacterianos [10^7 CFU/ml (unidades formadoras de colonia) caldo de medio E] se cultivaron en un caldo de tripticasa de soya (TSB) en presencia de la IgY de control específico y no específico. Las concentraciones de IgY ubicadas entre 250-500 g/ml se incubaron a 37° C durante 1 hasta 3 h. La curva de
25 crecimiento de bacteria fue calculada mediante el empleo de las medidas de densidad óptica a 590 nm.

Enlace Antígeno-Anticuerpo y Patrón de Crecimiento de Patógeno

La efectividad de la IgY para enlazar, neutralizar o reducir la proliferación de diversas bacterias patogénicas de mastitis, se examinó en un método adicional. El patógeno de mastitis (10^7 CFU/ml caldo de medio E) se cultivó en TSB con IgY de control específico y no específico (250-500 I_g/ml) y se permitió su aislamiento a 0-4° C durante 30 min. Entonces los cultivos se diluyeron a diluciones seriales con un TBS estéril y 10 μ l (en triplicados) del medio diluido, se inocularon sobre la placa adecuada y se incubados a 37° C durante 24 hrs. Las colonias de cada tratamiento se contaron y su tamaño fue medido.

Micro/nano preparación del portador

Son activados microperlas caboxilatadas comerciales mediante el empleo de clorhidrato de 1-Etil-3- (3- dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) en presencia de Avidina. El EDC activa los grupos carboxilo y permite un acoplamiento eficiente del grupo amino en Avidina con el grupo carboxilo. Esto resulta en la formación de enlaces amida que acoplan moléculas de avidina a cada microperla.

Unión del componente identificador a las perlas activadas

En la primera etapa, el anticuerpo de IgY (por ejemplo la IgY anti *E. Coli* específico) es biotinilado empleando un reactivo de Sulfo-NHS-biotina mediante el uso de un método común de biotinilación. El IgY anti *E. Coli* biotinilado resultante es entonces mezclado con los microperlas-Avidina en diferentes proporciones durante 1 hr a temperatura ambiente. Este paso es seguido por la adición de un anticuerpo Bovino de anti Avidina al cual se permitió reaccionar con la microperla-

Avidina-IgY-Biotinilado. En este contexto, el anticuerpo fue cultivado en becerro inmunizado con Avidina.

Desarrollo de un ensayo in-vitro para fagocitosis

5 **El presente procedimiento fue adaptado de TECHNICAL DATA SHEET 430 (2001) de PolySciences Inc (PA, E. U).**

10 **Se han utilizado micropartículas de poliestireno (1, 2 y 3 μm) para estudios de fagocitosis. Para elicitaresta respuesta, las partículas primero se recubrieron con avidina, posteriormente se enlazaron, un IgG anti-avidina bovino específico y la IgY específica producida contra patógenos de mastitis, tal como se describió anteriormente. Las microperlas (1 μm , 1 x 10⁶ por grupo), se recubiertas con diferentes proporciones de IgG:IgY (0.6 hasta 0.7 $\mu\text{g/ml}$, 60 min 37° C). Después de la opsonización, un millón de componentes de microperlas recubiertas fueron**

15 **incubadas con o sin 10⁷ bacterias de E. coli y fueron expuestas a fagocitos de sangre de vaca (granulocitos, monocitos, y macrófagos). Las células fueron mezcladas continuamente durante 60 min a 37° C durante los cuales ocurrió la fagocitosis. La reacción entonces se detuvo mediante la adición de PBS enfriado en hielo, centrifugada 1000 x g durante 5 min y las muestras de 10 μl diluidas en**

20 **un orden de 1: 10 fueron aplicadas en una placa de agar de soya tríptica para determinación de CFU. Entonces las células se lavaron para remover cualquier partícula libre en el medio y re-suspendidas en H₂O fría desionizada y analizadas para el número de bacterias. Este procedimiento permite la determinación de la actividad fagocítica por medio de la medición del número de bacterias que quedan**

25 **en el medio después de la incubación con números conocidos de bacterias con el complejo descrito.**

Ensayo de fagocitosis con el complejo identificador multifuncional (componentes de micriperla recubierta)

- 5 (1) Se adicionaron 200 μ l de sangre entera anticoagulada a un tubo de polipropileno.
- (2) Se adicionaron 10 μ l de componentes de microperlas recubiertos (10^8 partículas/ml) al tubo e incubados con agitación suave durante 30 hasta 60 min a 37° C.
- 10 (3) Al final de la incubación, se determinó la fagocitosis mediante la adición de 2 ml de PBS enfriado en hielo y mezclado.
- (4) El pellet de células se re-suspendió en 3 ml de agua estéril y se mezcló suavemente durante 20 hasta 30 segundos. Se adicionó 1 ml de NaCl al 3.5% para hacer isotónica la suspensión y las células son peletizadas por medio de
- 15 centrifugación a 500 x g durante 5 min.
- (5) Las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS frío, y las muestras fueron mantenidas a 4° C, y analizadas tan pronto como fue posible.

SCC (conteo de células somáticas)

- 20 El SCC se determinó con un contador de células Coulter (CC), modelo Z1, Coulter Electronics Limited, Luton, U. K.).

N-acetil-D-glucosaminidasa (NAGasa)

- 25 La concentración de NAGasa en leche fue determinada fluorométricamente de acuerdo con la prueba de ADLMILK NAGasa, (ADC Applied Diagnostics Corporation, Helsinki, Finlandia) con un arreglo de microplacas computarizado. Un

valor de 100 unidades corresponde a una liberación de aproximadamente 5 μmol de producto por litro por minuto a 25° C.

Procedimiento de ELISA para la medición de la IgY en leche

- 5 Prueba de ELISA cuantitativa para la medición de concentraciones de IgY anti-bacteria específico en leche: Se cubrieron pozos de una placa de ELISA durante la noche con 100 μl de anti-IgY-Fc-conejo, luego fueron bloqueadas durante 1 hr a 37° C con 200 μl de solución amortiguadora de leche al 2%. Se adicionó un volumen de 100 μl a la solución de prueba o comercial de IgY (utilizada para las
- 10 curvas estándar) a las placas de ELISA y se incubó durante 1 hr a 37° C, seguido por cinco lavados con PBS más Tween 20 (0.1%). Las placas entonces se incubaron con 100 μl de conjugado IgY de conejo anti-pollo con peroxidasa de rábano (1:1000 en PBS). Después de la incubación a 37° C durante 1 h, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T (Solución salina de solución amortiguadora de
- 15 fosfato - TWEEN 20), seguido por la adición de 100 μl de solución de sustrato recientemente preparada, 2-2-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en solución amortiguadora de citrato de fosfato 0.05 M (pH 5.0).

Ejemplo 1

- 20 ***Preparación del componente Identificador Identificado contra patógenos bacteriales de mastitis bovina***

Respuesta inmune contra mastitis bovina de E. coli

- Los anticuerpos específicos de la IgY para mastitis bovina de E. Coli se prepararon tal como ha sido detallado en los procedimientos experimentales. La
- 25 efectividad de la IgY anti-patógeno específico en la prevención o tratamiento de mastitis bovina, fue examinada a continuación.

La actividad del anticuerpo (OD del precipitado crudo de sulfato de sodio de la yema de huevo diluido de 1:1000) contra el E. Coli de mastitis intacto se determinó por medio de prueba de ELISA mediante el empleo de la preparación de la yema de huevo a partir de gallinas ponedoras tal como se muestra en la Fig. 1. La actividad pre-inmune del anticuerpo estuvo por debajo de 0.2 OD, se incrementó rápidamente 3 semanas después y luego de ello alcanzó un valle.

Respuesta inmune contra mastitis bovina de Estafilococo aureus

La actividad del anticuerpo (diluido de 1:100) contra mastitis de Estafilococo aureus intacto, que fue preparado de acuerdo con los procedimientos experimentales, se determinó por medio de la prueba de ELISA tal como se describió anteriormente.

Tal como se muestra en la Fig. 2, la actividad del anticuerpo se incrementó marcadamente una semana después de inmunización, posteriormente disminuyó aproximadamente hasta la mitad y después de ello alcanzó un valle. Sin embargo el título fue menor que el encontrado contra E. coli.

Respuesta inmune contra mastitis bovina de Streptococo uberis

La actividad del anticuerpo (diluido de 1:1000) contra mastitis de Streptococo uberis intacto fue determinada por medio de la prueba de ELISA tal como se describió anteriormente. La actividad del anticuerpo se incrementó marcadamente dos semanas después de inmunización y después de ello alcanzó un valle, tal como se muestra en la Fig. 3.

Ejemplo 2

Aglutinación del crecimiento del patógeno de mastitis mediante el uso de anticuerpos IgY específicos

Ensayo de Aglutinación de mastitis E. Coli

5 A fin de evaluar el grado de reconocimiento del antígeno de membrana externa por medio de la IgY y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, diversos patógenos bacterianos (10^7 CFU/ml caldo de medio E) se cultivaron en un caldo de tripticasa de soya (TSB) en presencia de la IgY de control específico y no específico y se incubaron durante 1 hasta 3 h a 37 °C. La concentración de la IgY
10 se ubicó entre 250-500 g/ml. La curva de crecimiento de bacteria fue calculada mediante el empleo de las medidas de densidad óptica de bacterias viables en cultivo a 590 nm.

Tal como se muestra en la Figura 4, los cultivos de E. Coli (10^7 CFU/ml) en TSB se
15 incubaron en presencia de 436 µg/ml de IgY anti-E. coli (triángulos abiertos), 436 µg/ml de IgY no específica (asterisco) e IgY de control (diamantes negros) a 37 °C y la densidad óptica del cultivo se midió a OD 590 nm a lo largo de 6 h después de la incubación. Los resultados indicaron que la incubación de cultivos en presencia del derivado de IgY específica contra E. Coli, condujo a una inhibición del
20 crecimiento de aproximadamente 20%. La IgY no específica tuvo un efecto menor sobre el patrón de crecimiento.

Con el fin de optimizar las condiciones para la inhibición del crecimiento bacteriano, por medio del componente identificador de la invención, los cultivos
25 fueron incubados en presencia de concentraciones incrementadas de IgY anti E. coli específica. Tal como se mostró en la Fig. 5, el cultivo de E. coli (1×10^7

CFU/ml) en TSB se incubó con 650 µg/ml de 0.5 U (unidades) se filtró la IgY anti-E. Coli (triángulos abiertos), con 650 µg/ml de IgY no específica (asteriscos) e IgY de control (diamantes negros) a 37 °C y la densidad óptica del cultivo se midió a OD 590 nm a lo largo de 6 h después de incubación.

5

Los resultados indicaron que la IgY específica inhibió completamente el crecimiento de E. coli. La IgY de control no específica tuvo únicamente un efecto menor sobre la aglutinación y el crecimiento de las bacterias. Estos resultados indicaron que la IgY anti E. coli desarrollada sirve como una herramienta útil para la prevención de mastitis causada por E. coli.

10

Enlace Antígeno-Anticuerpo y Patrón de Crecimiento de Patógeno

La efectividad de la IgY para enlazar, neutralizar o reducir la proliferación de E. coli fue adicionalmente examinada. El cultivo de partida de mastitis de E. coli (10^7 CFU/ml caldo de medio E) se cultivó a 4-8 °C durante 30 min con: (a) medio de control TSB + PBS; (b) medio de control TSB + IgY no específica pre-inmune; (c) medio de control TSB + IgY específica cosechada después de 8 semanas y (d) medio de control TSB + IgY específica cosechada 10 semanas después del primer refuerzo.

15

20

Los resultados resumidos en la Tabla 1 demostraron que el crecimiento del control negativo de E. coli produjo aproximadamente 5×10^7 CFU/ml caldo de medio E, y el control con IgY no específica aproximadamente 6×10^7 CFU. Los tratamientos (c) y (d), los cuales se pre-cultivaron con la IgY anti-E. coli específica, resultaron en una inhibición de aproximadamente el 90% de crecimiento del control. Estos

25

resultados indicaron que la IgY desarrollada reconoce bien la mastitis por E. coli, y habilita su enlace y la inhibición de su patrón de crecimiento.

5

Tabla 1. Crecimiento y desarrollo de E. coli (CFU/10 µl caldo media) precultivado (0-4 °C) con o sin IgY anti E. coli específica e inoculada sobre una placa de agar.

Tratamientos	CFU/10µl caldo media, como % de control
(a) medio de control TSB + PBS	100
(b) medio de control TSB + IgY no específica preimmune	100
(c) medio de control TSB + IgY específica cosechada 8 semanas después del primer refuerzo	12
(d) medio de control TSB + IgY específica cosechada 10 semanas después del primer refuerzo	9

10 La efectividad de IgY de diferentes lotes de inmunización, sobre el enlace y la neutralización de E. coli, así como también los niveles de anticuerpos fueron examinados en un experimento adicional. La mastitis de partida de E. coli (10⁷ CFU/ml caldo de medio E) se cultivó a 4-8 °C durante 30 min con: (a) medio de control TSB + PBS; (b) tratamiento (a) + IgY no específica preimmune; (c)

15 tratamiento (a) + IgY específica cosechada 2 semanas después de inmunización;

(d) tratamiento (a) + IgY específica cosechada 4 semanas después de inmunización; (e) tratamiento (a) + IgY específica cosechada 5 semanas después de inmunización; (f) tratamiento (e) con doble cantidad de IgY específica cosechada 5 semanas después de inmunización; y (g) tratamiento (a) + IgY específica cosechada 7 semanas después de inmunización. Tal como es mostrado por la Tabla 2, se encontró que la IgY es capaz de enlazar e inhibir el crecimiento de E. coli similarmente a diferentes lotes de conjuntos de huevos, y el incremento de los niveles de la IgY inhibió posteriormente el crecimiento bacteriano (e vs. f).

Tabla 2. Crecimiento y desarrollo de E. coli (CFU/10µl caldo media) precultivado (4-8 °C) con o sin IgY anti E. coli específica e inoculada sobre una placa de agar.

Tratamientos	CFU/10µl caldo de media, como % de control
(a) medio de control TSB + PBS;	100
(b) (a) + IgY no específica pre-inmune;	100
(c) (a) + IgY específica cosechada 2 semanas después de inmunización;	15
(d) (a) + IgY cosechada 4 semanas después de inmunización;	14
(e) (a) + IgY cosechada 5 semanas después de inmunización;	19
(f) (e) con doble cantidad de IgY específica;	16
(g) (a) + IgY cosechada 7 semanas después de inmunización;	18

Ejemplo 3

Unión del componente identificador a una micro/nano perla portadora

Los diferentes componentes identificadores preparados tal como se describió en el Ejemplo 1, específicamente para diferentes patógenos bacterianos de mastitis, fueron a continuación unidos a microperlas. Las microperlas carboxiladas comerciales son activadas empleando clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) en presencia de Avidina. El EDC acopla los carboxilos a los residuos de amina primaria en la Avidina que resulta en la formación de enlaces amida y en el acoplamiento de moléculas de Avidina a los microperlas activadas.

El anticuerpo IgY (IgY específico anti bacteria patogénica de mastitis, anti E. coli) es biotinilado mediante el uso de un reactivo de Sulfo-NHS-biotina al utilizar un método común de biotinilación.

El IgY anti E. coli biotinilado es mezclado con Avidina-microperlas en diferentes proporciones durante 1 hora a temperatura ambiente.

A fin de unir el componente activo al complejo de la invención, un anticuerpo bovino de anti Avidina, cultivado en becerro inmunizado con Avidina, se hace reaccionar con la microperla-Avidina-IgY-biotinilado. El enlace es debido a la afinidad del anticuerpo bovino a la Avidina. El enlace del anticuerpo anti Avidina a las perlas recubiertas de Avidina, es desarrollado a lo largo del fragmento Fab del anticuerpo, y por lo tanto esta parte de la molécula se encuentra proyectada hacia la perla, mientras que el fragmento Fc se proyecta lejos de la superficie de la perla, tal como se requiere para una opsonización eficiente.

Ejemplo 4

Ensayo de fagocitosis mediante el uso del complejo identificador multi-funcional de la invención (componentes microperlas recubiertas)

5

La capacidad del complejo identificador de la invención para inducir la fagocitosis directa contra un patogénico objetivo fue examinada a continuación. En un primer estudio, aproximadamente 6.5×10^6 bacterias de mastitis de E coli., se incubaron con fagocitos de sangre fresca de vaca (2-3 horas) y con microperlas recubiertas con diferentes proporciones de componentes de IgY (anti bacterias de mastitis diferentes, como un componente identificador) e IgG (como el componente inmunoactivo) durante 60 min a 37 °C.

10

15

La mayoría de las bacterias fue tragada durante los 60 min del período de incubación, sin embargo el número de bacterias que escaparon a la fagocitosis fue relacionado con la proporción de IgY:IgG. La velocidad de fagocitosis más alta se observó con la proporción de 0.9:0.1 para IgY a IgG respectivamente.

20

Los resultados de la Tabla 3 confirman el trago facilitado de bacterias por el macrófago.

Tabla 3 Inducción de fagocitosis por el complejo de la invención

	IgY : Ig					
	G					
	1/0 0.	9/0.1	0.7/0.3	0.5/0.5	0/1	0/0

Número de bacterias que escaparon a la fagocitosis	145	0	145	290	290	435
en porcentaje	33%	0%	33%	67%	67%	100%
velocidad de fagocitosis	67%	100%	67%	33%	33%	0%

En un estudio posterior aproximadamente 3×10^8 bacterias de mastitis de E. coli se incubaron con fagocitos de sangre fresca y con microperlas recubiertas con diferentes proporciones de componentes de IgY:IgG durante 60 min a 37 °C.

5

Aproximadamente el 70% de las bacterias fueron tragadas durante los 60 min del período de incubación, sin embargo el número de bacterias que escaparon a la fagocitosis fue relacionado nuevamente con la proporción de IgY:IgG. La velocidad de fagocitosis más alta se observó con la proporción incrementada de IgY en el microperla.

10

El efecto de los fagocitos sobre la viabilidad de las bacterias en presencia del complejo de la invención también fue examinado.

15

Para la prueba de bacterias viables, las células se centrifugaron (1000 X g), lavadas y entonces colocadas sobre placas apropiadas en diluciones incrementadas. Las colonias viables fueron contadas. Tal como es mostrado por la Tabla 4, solamente pocas bacterias sobrevivieron a la fagocitosis (entre 1300 a 16000) en presencia del complejo identificador de la invención, mientras que $1.5 \times$

10⁶ células bacterianas fueron contadas en el cultivo que no fue expuesto al complejo identificador de la invención.

Tabla 4

	1	2	3	4	5
Proporción IgY/IgG	1/0	0.9/0.1	0.7/0.3	sin microperla de control	sin fagocito de control
Número de bacterias sobrantes después de la fagocitosis	9425	21025	34800	275500	1450000
Número de bacterias que escaparon a la fagocitosis	0. 7%	1.5%	2.4%	19%	100%
Velocidad de fagocitosis (vs. no. 5)	99.3%	98.5%	97.6%	81%	0%
Fagocitosis debida a microperlas (vs no. 4)	97%	92%	87%	0%	

Ejemplo 5

*Tratamiento In vivo de mastitis causada por la infección de estreptococo
Dysgalactiae mediante el uso del complejo Identificador de la invención*

5

Como se indicó en los antecedentes, las bacterias gram-positivas de *Streptococo
dysgalactiae*, son una de las bacterias causantes de la mastitis. Estas bacterias

pueden existir en la ubre entre 20 a 30 días y pueden causar mastitis clínica o sub-clínica, lo cual conlleva pérdidas económicas debido a la disminución en la producción de leche, pérdida de interés en la calidad de la leche debido a un SCC incrementado (Conteo de Células Somáticas), y cambios en la composición de la leche. Muchos patógenos de mastitis (*Estrep. agalactiae* y *Estaf aureus*) han sido recientemente evacuados de hatos Israelíes, sin embargo, se ha notado un incremento en la ocurrencia de otras especies *no-agalactiae*.

Los investigadores, por lo tanto, han seguido con la examinación de la efectividad del complejo de la invención en el tratamiento *in-vivo* de infecciones por *Estrep. dysgalactiae*. Se realizaron estos estudios *in vivo* en el Instituto Veterinario en Beit-Dagan Israel. Dos cuartos de cuatro vacas Holstein de leche de rendimiento medio (25 L/d) se inyectaron intramamariamente con *Estrep. dysgalactia* (1750 CFU de STRPVL1860 en un volumen de 5 ml por cuarto). Las vacas se evaluaron clínicamente, tres días antes y después de la inoculación para mastitis mediante el uso de los siguientes parámetros: escamas o grumos en la leche; cuarto o ubre hinchada; fiebre; pulso rápido; y pérdida de apetito. Adicionalmente, a la evaluación clínica, se empleó el sistema Affarm v 2.03 para medir la producción de leche, la actividad y la conductividad de la leche, y las muestra de leche tomadas se analizaron para bacterias, SCC cuantitativo y actividad NAGasa. Como se muestra en la Tabla 5, todos los parámetros medidos indicaron que las vacas infectadas probadas sufrieron de mastitis.

Cuarenta y ocho horas después de la infección con bacterias, se encontraron cultivos de bacterias positivas (*Estrep. dysgalactia*) en todos los cuartos inyectados (Tabla 5). También se notó un nivel incrementado de SCC y actividad

NAGasa (excepto para la vaca 265 [B/R] que solamente mostró un incremento moderado).

Tabla 5. Bacteriología, Conteo de células Somáticas (SCC) y actividad NAGasa en leche de vacas, 48 horas después de inyección intramamaria con *Estrep. dysgalactia* (1750 CFU de STRPVL1860 in un volumen de 5 ml por cuarto).

5

Actividad NAGasa (U)	SCC (x1000)	Bacteriología <i>E. dysgalactia</i>	Tiempo de muestreo (horas)	Cuarto	Vaca
2±2	125±35	-	-1	B/L	265
366	5000<	+	24		
128	5000<	+	48		
3	170±41	-	-1	B/R	
26	256	-	24		
14	590	+	48		
28±11	147±100	-	-1	F/L	1989
113	436	+	24		
85	287	+	48		
25±7	210±72	-	-1	F/R	
550	5000<	+	24		
351	5000<	+	48		
5±3	120±32	-	-1	B/L	2119
25	313	+	24		
22	134	+	48		
6±7	129±33	-	-1	B/R	
577	5000<	+	24		

253	5000<	+	48		
18±7	210±55	-	-1	B/L	2226
32	715	+	24		
325	5000<	+	48		
13±9	142±47	-	-1	B/R	
54	162	+	24		
297	1499	+	48		

F-anterior; B-posterior; L-izquierdo; R-derecho; +/- (positivo/negativo)

Estreptococo dysgalactia

5 Setenta y cuatro horas después de la inoculación de *Estrep. dysgalactiae*, el
cuarto izquierdo de cada una de las cuatro vacas evaluadas con el complejo
identificador de la invención tiene un componente de reconocimiento de objetivo
que comprende un anticuerpo IgY específico para *Estrep. dysgalactiae* [la mitad
de los cuartos fueron tratados por inyección de 20 (vacas 1989, 2226) o 50 (vacas
265, 2119) millón de unidades/cuarto cada una en 5 ml de solución salina libre de
10 pirógeno]. Se llevaron a cabo dos inyecciones intra-mamarias en el cuarto tratado
de cada una de las cuatro vacas evaluadas (una inyección después del ordeño de
la mañana y una segunda inyección 24 horas más tarde). Los cuartos derechos no
se trataron y sirvieron como control. Las muestras de leche se monitorearon
durante el periodo experimental (tres semanas).

15 En tres salidas de los cuatro cuartos no tratados de las vacas probadas, se
encontró la bacteria *S. dysgalactia* en muestras de leche durante los 20 días del
experimento, lo cual indica que la infección prosiguió a una fase crónica. El nivel
de SCCy la actividad NAGasa fue muy alta en los tres cuartos, sin embargo, en la

vaca 265 el nivel de estos parámetros volvieron a su nivel inicial sin ninguna bacteria en la leche. (Tabla 6).

Tal como se muestra en la Tabla 6 y la Fig. 7, sin tener en cuenta la dosis proporcionada, la inyección del complejo específico de la invención anti *E. dysgalactia* a la mitad de los cuartos tratados, causó una disminución significativa en el número de bacterias en tres salidas de las cuatro vacas (Tabla 6), mientras que en los controles los cuartos fueron infectados durante los 20 días del estudio.

Los resultados de este estudio, claramente demuestran que el complejo específico de la invención anti *E. dysgalactia* reduce de manera eficiente el número de bacterias en la leche de vacas infectadas. Más aún, El SCC y la actividad NAGasa fueron disminuidas significativamente luego de 24 a 48 horas en al menos 3 de cuatro vacas (Tabla 6 y Fig. 7). Se puede observar que en una semana después de que el tratamiento se proporcionó, los cuartos tratados se recuperaron completamente de la mastitis, en tanto que los cuartos control fueron infectados enormemente.

Tabla 6. Bacteriología, SCC y actividad NAGasa en leche de cuatro vacas infectadas, después de dos inyecciones consecutivas intramamarias de 20 y 50 millones de unidades del complejo específico de *E. dysgalactia* de la invención por cuarto.

Actividad NAGasa (U)	SCC (x10 ³)	Bacteriología <i>E. dysgalactia</i>	Tiempo de muestreo (días)	Y-unidades de complejo X 10 ³	Cuarto	Vaca
289	5000<	+	0	50,000		265
310	5000<	+	1	50,000		
376	5000<	+	2	0		
98	5000<	+	9	0		
109	5000<	+	20	0		
14	590	+	0	0	B/R	
16	500	+	1	+		
17	302	+	2	0		
9	195	-	9	0		
7	219	-	20	0		
102	520	+	0	20,000	F/L	1989
186	5000<	+	1	20,000		
84	520	+	2	0		
49	320	-	9	0		
25	92	-	20	0		
303	5000<	+	0	0	F/R	
248	5000<	+	1	0		

489	5000<	+	2	0		
467	5000<	+	9	0		
267	5000<	+	20	0		
75	1500	+	0	50,000	B/L	2119
98	5000<	-	1	50,000		
274	5000<	-	2	0		
8	52	-	9	0		
11	170	-	20	0		
279	5000<	+	0	0	B/R	
153	5000<	+	1	0		
654	5000<	+	2	0		
776	5000<	+	9	0		
278	5000<	+	20	0		
325	5000<	+	0	20,000	B/L	2226
69	1500	+	1	20,000		
50	717	-	2	0		
25	530	-	9	0		
21	310	-	20	0		
297	1499	+	0	0	B/R	
81	5000<	+	1	0		
111	5000<	+	2	0		
157	5000<	+	9	0		
475	5000<	+	20	0		

F-anterior; B-posterior; L-izquierdo; R-derecho; +/- (positivo/negativo)

Estreptococo dysgalactia

Prueba de Toxicidad del complejo IgY específico anti *E. dysgalactiae* de la invención

Se continuó con el estudio de la toxicidad del complejo IGY específico anti *E. dysgalactiae*, mediante el uso de vacas lecheras sanas Holstein comerciales que fueron inyectadas con diferentes cantidades del complejo de la invención. Se seleccionaron cuatro vacas lactantes luego del chequeo visual para los cuartos inflamados y se monitoreó sus perfiles bacteriológicos en leche (libre de bacteria, NAGasa <30; SCC < 150,000).

Se inyectaron intramamariamente de tres a diez millones de unidades del complejo IgY específico anti *E. dysgalactiae* en 5 ml de solución salina estéril libre de pirógenos, en el cuarto probado mediante el uso de una jeringa plástica estéril.

Se realizó entonces, la examinación clínica de las vacas tratadas (escamas y coágulos en la leche; ligera hinchazón del cuarto infectado; calor, cuarto ubre hinchada; fiebre, pulso rápido y pérdida del apetito), como también medidas químicas en la muestra de leche durante 3 días post inyección.

No se observó ningún síntoma clínico o ningún cambio de comportamiento en las vacas con los cuartos tratados.

Tal como se muestra en la Tabla 7, los análisis de leche indicaron que la inyección del complejo IgY específico anti *E. dysgalactiae* de la invención a un nivel de

3X10⁶ unidades por cuarto, no afectaron dramáticamente el nivel del SCC. El SCC se incrementa ligeramente luego de 24 horas, pero vuelve al nivel normal 24 horas después. Resultados similares se obtuvieron cuando la actividad NAGasa a nivel de 3 ó 10 millones de unidades del complejo IgY específico anti *E. dysgalactiae*. Estos hallazgos indican que el complejo de la invención, posee solamente menor efecto en el tejido mamario y leche en respuesta a la inyección.

Tabla 7. Actividad NAGasa y conteo células somáticas (SCC, promedio ±SD) durante 72 horas después de la inyección intra-mamaria del Complejo-Y en cuatro vacas a niveles de 3 ó 10 millones de unidades por cuarto.

Complejo Unidades	SCC (x1000)				Actividad NAGasa (unidades)			
	[Tiempo post inyección (hrs)]				[Tiempo por inyección (hrs)]			
	<u>6</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>6</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>
3X10 ⁶	70±96	363±511	66±56	70±96	1±1	9±10	18±32	0±0
10X10 ⁶	ND	ND	NM	NM	87±58	73±60	23±16	NM

.....NM: No medido; ND No detectable.

Residuo del complejo IGY específico anti E. dysgalactiae en leche

Una examinación adicional de la seguridad del uso del complejo específico a *E. dysgalactiae* de la invención y de las muestras de leche obtenidas de vacas tratadas, se monitoreó para observar la existencia de trazas de este complejo. Las muestras de leche se tomaron a 0, 10 min., 5, 24, 48 y 72 horas luego de la inyección del complejo, se sometieron a ELISA específico como se describe en los procedimientos experimentales, para determinar los niveles de la IgY. Tal como se muestra en la Fig 8, el nivel de la IgY en leche (libre o enlazada a perlas de microesfera) disminuyó repentinamente después de la inyección. Diez minutos

luego de la inyección, únicamente se detectó entre aproximadamente 0.5 a 0.6 μg de IgY por ml de leche. Estos niveles disminuyeron rápidamente y no se detectó IgY luego de 24 horas de inyección. Se debe señalar que el nivel mínimo detectado fue de 6.25 ng/ml.

5

Se manera similar, el análisis de las muestras tomadas hasta 8 horas post inyección, indicaron claramente que la concentración de la IgY disminuyó en 80%, 5 horas luego de la inyección y después de un ordeño. (Fig. 9).

10

Ejemplo 6

Tratamiento in vivo de la mastitis causada por la infección de E. coli mediante el uso del complejo Identificador de la invención

Los inventores continuaron examinando la eficacia del complejo Identificador de la invención en tratamiento *in vivo* de otras bacterias que causan la mastitis, *E. coli*.

15

Estos estudios *in vivo* fueron también realizados en el Instituto Veterinario de Beit-Dagan Israel.

20

Cuatro vacas sin preñar Israelí-Holstein en sus periodo medio de lactación 1^{ro}- 4^{to}, se incluyeron en dos pruebas consecutivas, dos vacas cada una. Las vacas se escogieron para el experimento de acuerdo con sus condiciones de ubre así confirmadas por tres exámenes consecutivos bacteriológicos y de conteo de células somáticas (SCC) de muestras de leche de cuartos. Las vacas fueron libres de la infección de ubre y tuvieron un SCC inferior que 120×10^3 células/ml. Las vacas fueron ordeñadas tres veces diariamente y tuvieron rendimientos de leche de 25 – 35 Kg/día. El alimento se les ofreció en pecebreras localizadas en graneros libres de plateas.

25

La cepa de *E. coli* (P4) creció en un cal de de Nutriendo (Disco, Detroit, MI) por 24 h a 37°C y se cosechó por centrifugación a 3000 x g por 15 minutos a 4°C. El pellet se re-suspendió en PBS no pirogénico (pH 7.6, 0.001M) y se lavó, la
5 concentración bacteriana se determinó por dilución serial en placas de agar-sangre. El pellet original se almacenó en hielo por 16 h. Cada vaca se retó mediante inyección de 5 ml de la suspensión, que contenía 500 unidades de colonias (CFU), en dos cuartos (frontal o posterior) a través del canal venoso en la cisterna de glándula.

10 Se obtuvieron muestras de leche de cuartos por duplicado de acuerdo con los procedimientos de la Internacional Dairy Federation (Federación Lechera Internacional) IDF, (1985) y se sometieron a laboratorio dentro de 1 h. El análisis bacteriológico se realizó de acuerdo con estándares aceptados. Alícuotas de 0.01
15 ml de cada una de las muestras de leche se extendieron sobre placas de agar-sangre (Bacto-Agar; Disco Laboratory) que contenía 5% de células rojas sanguíneas de oveja. Todas las placas se incubaron a 37°C y fueron examinadas por crecimiento a 18 y 42 h. Se identificaron las colonias Gram negativas con el Kit de API 20 E ó API NR (bioMérieux S.A., 69280 Marcy-l'Etoile, Francia).

20 Antes de este ensayo, las vacas probadas, fueron ensayadas para estado bacteriológico, en tres días consecutivos con la Actividad NAGasa y el SCC. Se llevaron las vacas a las plateas 1 a 2 horas luego del ordeño y sus mamas se lavaron con agua caliente, se secaron, desinfectaron con toallas (towelettes) no
25 tejidas, humedecidas con clorhexidina, cetrímida y etanol (Medi-Wapes, AL. Bead, Massout Itzhak, Israel). Se descartaron los tre primeros chorros de leche y se

tomaron muestras (50 ml/cuarto) en un tubo estéril para bacteriología, SCC y actividad NAGasa. Cada vaca se inoculó intramamariamente con 500 cfu/cuarto en los cuartos, el frontal o posterior, inmediatamente al ordeño de la mañana. En el período de 48 h. post reto, las vacas se monitorearon de cerca para síntomas de enfermedad (temperatura rectal, calor y velocidad de respiración, actividad del tracto alimentario (contracción rumiante) y temperatura de la ubre, dolor, edema y tamaño de la ubre. Se muestreó a 6, 30 y 54 horas los cuartos (únicamente en el ensayo 1) post reto, las vacas fueron ordeñadas y el cuarto izquierdo retado de cada vaca fue tratado. Las vacas no fueron ordeñadas en el siguiente ordeño (noche) y se volvió al esquema de ordeño después (mañana). Se continuaron muestreando los cuartos cada 24-48 horas hasta 15 días por reto. Las vacas se trataron intramamariamente con 40×10^6 unidades del complejo (anti *E. coli*), proporcionado con suspensión en 5 ml de un PBS no pirogénico.

Tal como se muestra en la Fig 10A, la bacteria de *E. coli* fue encontrada en las muestras de leche a lo largo de los 15 días del experimento, lo que indica que la infección avanzó a su fase crónica. No obstante, en las muestras de leche obtenidas de los cuartos tratados, se demostró una clara disminución en la infección bacteriana. También se observó protección significativa del complejo específico de *E. coli* cuando el nivel de SCC y la actividad NAGase se examinaron (Figs. 10B y 10C, respectivamente).

Estos resultados indican claramente que el complejo específico anti *E. coli* de la invención, reduce eficientemente el número de bacterias y el SCC en leche de vacas infectadas y recupera eficientemente los cuartos infectados y protege a las vacas de la mastitis.

Ejemplo 7

Tratamiento in vivo de Carpas que sufren de ulceración causada mediante la Infección de Aeromonas salmonicidas. mediante el uso del complejo
identificador de la invención

El uso eficaz de diferentes complejos identificadores de la invención en el tratamiento de enfermedades de mamíferos, p. ej., mastitis en ganado vacuno, condujo a los presentes inventores a examinar la posibilidad de tratar animales no mamíferos, particularmente, peces, mediante el uso del complejo de la invención. De este modo, los inventores han desarrollado un complejo específico identificado contra *Aeromonas salmonicida*, la cual causa furunculosis en pez macota *Koi*.

La *Aeromonas salmonicida* es un patógeno bacteriano Gram-negativo que es el agente causante de la furunculosis en peces salmónidos, una debilitante y letal enfermedad encontrada en cultivos acuáticos. Las vacunas actuales ofrecen efectividad limitada y son comunes los epizooticos en peces de cultivo. El desarrollo de medidas de control ampliamente efectivas, requieren un entendimiento más completo de las interacciones entre el patógeno y los factores del huésped que contribuyen al estado de la enfermedad.

Los siguientes experimentos se realizaron mediante el uso de Carpas infectadas con *Aeromonas salmonicida* como un sistema modelo. Se utilizaron para este experimento, cuatro tanques (0.5 m³) suministrados con agua fresca a lo largo del experimento (sistema de flujo a través). Cada tanque contenía treinta carpas sanas (de 30 gr cada una) y cinco peces ulcerados (*Koi*) que se mantuvieron juntos por veintiocho días (co-ocupación). Entonces, los *Koi* ulcerados se retiraron

y diez a catorce días después de la co-ocupación las capras infectadas fueron tratadas mediante el uso del complejo específico de *Aeromonas salmonicida* de la invención, el cual comprende como un componente identificador un anticuerpo IgY específico dirigido contra *Aeromonas salmonicida*. A cada uno de los treinta peces en dos de los cuatro tanques que fueron utilizados como los grupos tratados de prueba, se le inyectó dos veces intraperitonealmente (10 a 14 y al día 17 al 19) con 0.5 ml de solución que contenía el complejo de la invención diluido 1:5 [3 mg de IgY/kg de peso corporal (PC) o 450 millones de unidades del complejo por kg/PC] en salina. Los peces de los dos tanques control se trataron con salina y se monitorearon de manera similar a los dos tanques de prueba, para el desarrollo de signos clínicos asociados con la enfermedad ulcerativa de la Carpa.

Al final del estudio como se describió anteriormente, los peces de los grupos control se dividieron en dos grupos. El complejo (450 millones U/kg PC) de la invención que comprende como un componente identificador un anticuerpo IgY específico dirigido contra *Aeromonas*, se adicionó al agua del grupo tratado, en tanto que el otro grupo no fue tratado.

Reivindicaciones

1. Un complejo identificador multifuncional para inducir una reacción inmunoestimuladora específica contra al menos un agente patogénico objetivo, caracterizado porque dicho complejo comprende:
 - 5 a. al menos un componente de reconocimiento de objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicho agente objetivo o a cualquier fragmento funcional de dicho agente;
 - b. un componente inmunoactivo que comprende un agente inmunoestimulador; y
 - 10 c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente inmunoactivo, donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo son conservadas
- 15 2. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha reacción inmunoestimuladora, es seleccionada del grupo que consiste de fagocitosis, citotoxicidad celular anticuerpodependiente (ADCC), activación de complemento y estimulación de células T y células B
- 20 específicas.
3. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha reacción inmunoestimuladora es la fagocitosis por leucocitos.
- 25 4. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho agente patológico objetivo, es seleccionado del grupo que

consiste de bacteria, virus, fungus, células malignas, toxinas, venenos, haptenos, contaminantes ambientales y proteínas no deseadas.

5. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque dicho agente patológico es bacteria seleccionada del grupo que consiste de bacteria patogénica de mastitis, bacteria enteropatógena, bacteria de furunculosis patogénica y enfermedad ulcerativa que causa la bacteria.
6. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicha bacteria patogénica de mastitis es seleccionada del grupo que consiste de *Actinomyces*, *E. Coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Estafilococo aureus*, *Streptococo agalactiae*, *Streptococo dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* y *Streptococo uberis*.
7. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicha enfermedad ulcerativa que causa la bacteria es *Aeromonas ssp.* la cual causa la enfermedad ulcerativa en peces.
8. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho componente de reconocimiento del objetivo comprende cualquiera de anticuerpo o cualquiera de los fragmentos funcionales del mismo; ligante y receptor específico para dicho agente patológico o cualquier fragmento funcional de dicho agente.

9. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque dicho componente de reconocimiento del objetivo, comprende un anticuerpo o cualquiera de los fragmentos funcionales del mismo, específico para dicho agente patológico o cualquier fragmento funcional de dicho agente, dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de IgG, IgY e IgM.
10. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque dicho componente de reconocimiento comprende un anticuerpo IgY o cualquier fragmento funcional del mismo, específico para dicho agente patológico o cualquier fragmento funcional de dicho agente.
11. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el componente inmunoactivo comprende un agente inmunoestimulador, el cual induce la fagocitosis.
12. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque dicho agente que induce la fagocitosis es seleccionado del grupo que consiste de opsoninas, las cuales son cualquiera de IgG y C3b, moléculas de proteína que poseen residuos de carbohidrato que interactúan con el receptor de manosa-fucosa de los fagocitos, moléculas de proteína de ligante reconocidas por receptores en macrófagos secuestradores, ligantes para integrinas expresados por fagocitos; glucoproteínas y fucosil transferasa.

13. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque dicho agente que induce la fagocitosis es IgG.
- 5 14. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el componente de conexión es cualquiera de un soporte sólido, un enlazante químico, enlazante polipeptídico, enlazante polisacárido y enlazante lipídico.
- 10 15. Un complejo identificador multifuncional para inducir la fagocitosis específica de al menos una bacteria patogénica objetivo de mastitis en bovinos infectados por dicha bacteria, caracterizado porque dicho complejo comprende:
- 15 a. al menos un componente de reconocimiento de objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicha bacteria patogénica de mastitis o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria;
- b. un componente activo que comprende agente que induce la fagocitosis; y
- 20 c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo son conservadas.

16. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque dicho componente de reconocimiento del objetivo es un anticuerpo IgY específico para al menos una bacteria patogénica de mastitis.
- 5 17. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque dicha bacteria patogénica de mastitis es al menos una bacteria seleccionada del grupo que consiste de *Actinomyces*, *E. Coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Estafilococo aureus*, *Streptococo agalactiae*, *Streptococo dysgalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus*
- 10 *faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Nocardia asteroides* y *Streptococo uberis*
18. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque dicho agente que induce la fagocitosis es una molécula IgG generada en bovinos.
- 15 19. El complejo identificador de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque el componente de conexión es cualquiera de un soporte sólido, un enlazante químico, enlazante polipeptídico, enlazante polisacárido y enlazante lipídico.
- 20 20. Un complejo identificador multifuncional para inducir la fagocitosis específica de al menos una bacteria patogénica objetivo que causa enfermedad ulcerativa en peces infectados por dicha bacteria, caracterizado porque dicho complejo comprende:
- 25 a. al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a

bacteria patogénica *Aeromonas salmonicida*., dicha bacteria patogénica causa enfermedad ulcerativa en peces, o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria;

- b. un componente activo que comprende agente que induce la fagocitosis; y
- c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo son conservadas.

21. Una composición para el tratamiento de un trastorno patológico en un sujeto, que comprende como un ingrediente activo un complejo identificador multifuncional que induce en dicho sujeto una reacción inmunoestimuladora específica al menos a (contra) un agente patológico objetivo, caracterizada porque dicho complejo comprende:

- a. al menos un componente de reconocimiento de objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicho agente patológico o a cualquier fragmento funcional de dicho agente;
- b. un componente activo que comprende un agente inmunoestimulador; y
- c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia dicho al menos un componente identificador y dicho al menos un componente activo, donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo son conservadas.

22. La composición de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizada porque dicha composición además, opcionalmente comprende diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica o veterinariamente aceptables.
- 5
23. La composición de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizada porque dicho trastorno patológico es cualquiera de trastornos inmuno relacionados, infecciones virales, fúngicas o bacterianas y trastornos malignos.
- 10
24. La composición de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizada porque dicho complejo está de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19.
- 15
25. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, caracterizada porque dicho sujeto afectado por el agente patológico es cualquiera de humano, mamífero doméstico, ave doméstica, pez doméstico, pez mascota y exótico.
- 20
26. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque dicho mamífero doméstico es bovino.
27. La composición de acuerdo con la reivindicación 26, caracterizada porque dicho trastorno patológico es una infección bacteriana.
- 25
28. La composición de acuerdo con la reivindicación 27, caracterizada porque dicha infección bacteriana es mastitis.

29. Una composición para el tratamiento de mastitis en bovinos, que comprende como ingrediente activo un complejo identificador multifuncional que induce la fagocitosis específica al menos a una bacteria patogénica de mastitis objetivo en bovinos infectados por dicha bacteria, caracterizada porque dicho complejo comprende:
- a. al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicha bacteria patogénica de mastitis o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria;
 - b. un componente activo que comprende un agente que induce la fagocitosis; y
 - c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo son conservadas
30. La composición de acuerdo con la reivindicación 29, caracterizada porque dicho complejo está de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.
31. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque dicho sujeto es cualquiera de pez doméstico, pez mascota y exótico.

32. La composición de acuerdo con la reivindicación 31, caracterizada porque dicha infección bacteriana es *Aeromonas spp.* infección que causa enfermedad ulcerativa en dicho pez.
- 5 33. Una composición para el tratamiento de la enfermedad ulcerativa en peces, que comprende como ingrediente activo un complejo identificador multifuncional que induce la fagocitosis específica al menos a una bacteria patogénica de *Aeromonas spp.* objetivo en peces infectados por dicha bacteria, caracterizada porque dicho complejo comprende:
- 10 a. al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicha bacteria patogénica de *aeromonas spp.* o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria;
- 15 b. un componente activo que comprende agente que induce la fagocitosis; y
- c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo son
- 20 conservadas
34. Una composición para inducir una fagocitosis específica identificada al menos a un agente patogénico objetivo relacionado con el trastorno patológico en un sujeto que sufre de dicho trastorno, cuya composición
- 25 comprende como un ingrediente activo un complejo identificador multifuncional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, y

opcionalmente comprende además diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

- 5 35. Una composición para inducir una fagocitosis específica de al menos un patógeno bacteriano de mastitis objetivo en un bovino que sufre de mastitis, cuya composición comprende como un ingrediente activo un complejo identificador multifuncional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, y opcionalmente comprende además diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.

10

36. Una composición para inducir una fagocitosis específica de al menos un patógeno bacteriano de *Aeromonas spp.* objetivo en un pez que sufre de enfermedad ulcerativa, cuya composición comprende como un ingrediente activo un complejo identificador multifuncional de acuerdo con la
- 15 reivindicación 20, y opcionalmente comprende además diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéutica y/o veterinariamente aceptables

15

37. Un método para el tratamiento de una condición patológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz
- 20 de un complejo identificador o una composición farmacéutica que comprende el mismo, caracterizado porque dicho complejo comprende:

20

a. al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicho agente patológico o a cualquier fragmento funcional de dicho agente;

25

b. un componente activo que comprende un agente inmunoestimulador;

y

- c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia al menos uno de dicho componente identificador y al menos uno de dicho componente activo, donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo son conservadas.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 37, caracterizado porque dicha composición está así definida en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, 25 a 29 y 31 a 33.

39. El método de acuerdo con la reivindicación 32, caracterizado porque dicho complejo es así definido como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

40. El método de acuerdo con la reivindicación 37, caracterizado porque dicho sujeto afectado por el agente patógeno es cualquiera de humano, mamífero doméstico, ave doméstica, pez doméstico, pez mascota y exótico.

41. El método de acuerdo con la reivindicación 40, caracterizado porque dicho trastorno es cualquiera de trastornos inmuno relacionados, infecciones virales, fúngicas o bacterianas y trastornos malignos.

42. El método de acuerdo con la reivindicación 41, caracterizado porque dicho trastorno patológico es una infección bacteriana.

43. Un método para el tratamiento de mastitis en bovinos, que comprende administrar a dicho bovino que lo requiere, una cantidad terapéuticamente

eficaz de un complejo identificador capaz de inducir la fagocitosis específica identificada al menos a una bacteria patogénica de mastitis objetivo en dicho bovino infectado, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, caracterizado porque dicho complejo comprende:

- 5 a. al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula, la cual se enlaza específicamente a dicha bacteria patogénica de mastitis o a cualquier fragmento funcional de dicha bacteria;
- 10 b. un componente activo que comprende agente que induce fagocitosis;
- y
- c. opcionalmente, un componente de conexión que asocia dicho al menos un componente identificador y dicho al menos un componente activo, donde las funciones biológicas independientes de dicho componente identificador y dicho componente activo son
- 15 conservadas

44. El método de acuerdo con la reivindicación 43, caracterizado porque dicho complejo esta así definido en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.

- 20 45. Un método para el tratamiento de enfermedad ulcerativa en peces, que comprende administrar a dicho pez que lo requiere, una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo identificador capaz de inducir la fagocitosis específica identificado al menos a una bacteria patogénica de *Aeromonas salmonicida* objetivo en dicho pez infectado de acuerdo con la
- 25 reivindicación 20, o de una composición farmacéutica que comprende el mismo.

46. El uso de un complejo identificador multifuncional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno patológico en un sujeto que lo requiere.

5

47. El uso de acuerdo con la reivindicación 46, caracterizado porque dicho trastorno patológico es cualquiera de trastornos inmuno relacionados, infecciones virales, fúngicas o bacterianas y trastornos malignos.

10

48. El uso de acuerdo con la reivindicación 47, caracterizado porque dicho trastorno patológico es una infección bacteriana.

49. El uso de un complejo identificador multifuncional, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de mastitis en bovinos.

15

50. El uso de un complejo identificador multifuncional, de acuerdo con la reivindicación 20, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedad ulcerativa en peces.

20

Resumen

La presente invención se refiere a un complejo identificador multifuncional para inducir una reacción inmunoestimuladora, preferiblemente, fagocitosis, contra al menos un agente patogénico objetivo. El complejo de la invención comprende al menos un componente de reconocimiento del objetivo que comprende una molécula que se enlaza específicamente al agente objetivo deseado, un componente inmunoactivo que comprende un agente inmunoestimulador, y opcionalmente, un componente de conexión que asocia el componente identificador y el componente inmunoactivo. El complejo de la invención proporciona una prevención y tratamiento terapéuticamente eficaz de varios trastornos patogénicos, tal como mastitis en vacas y furunculosis en peces. La invención además se refiere a composiciones que comprenden el complejo identificador, métodos de tratamiento y usos del mismo.

1/9

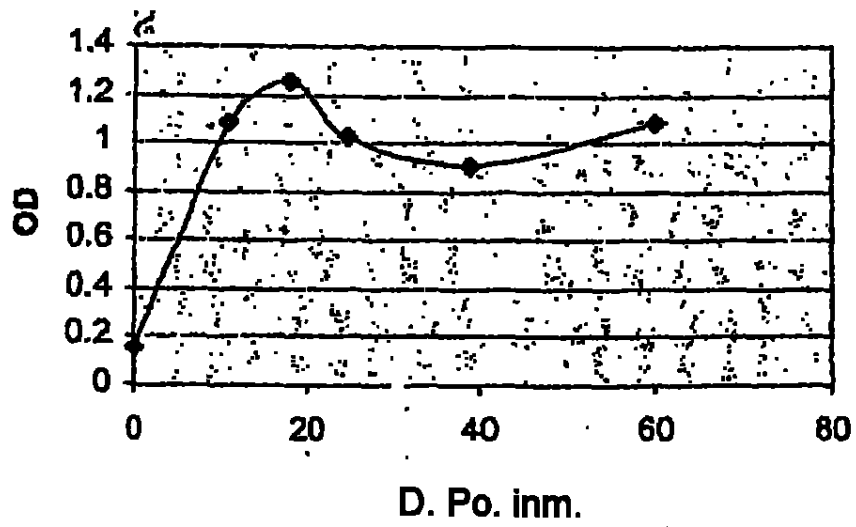


Fig. 1

2/9

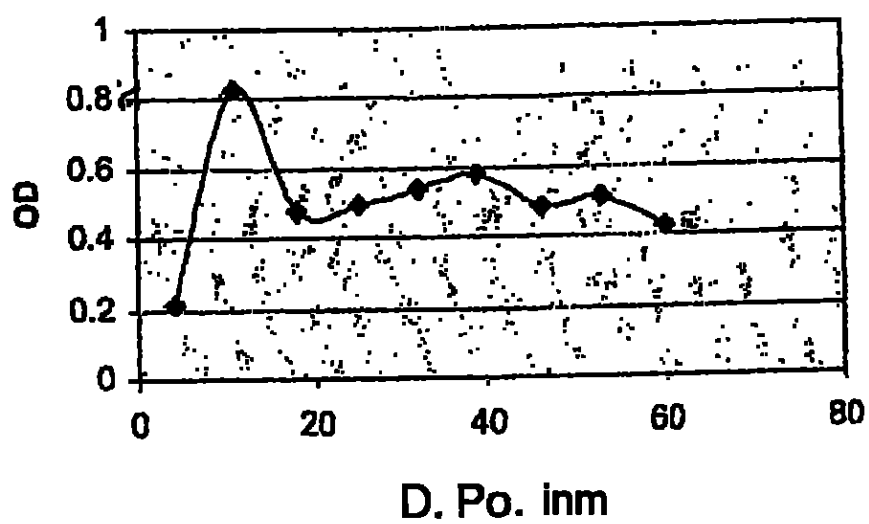


Fig. 2

3/9

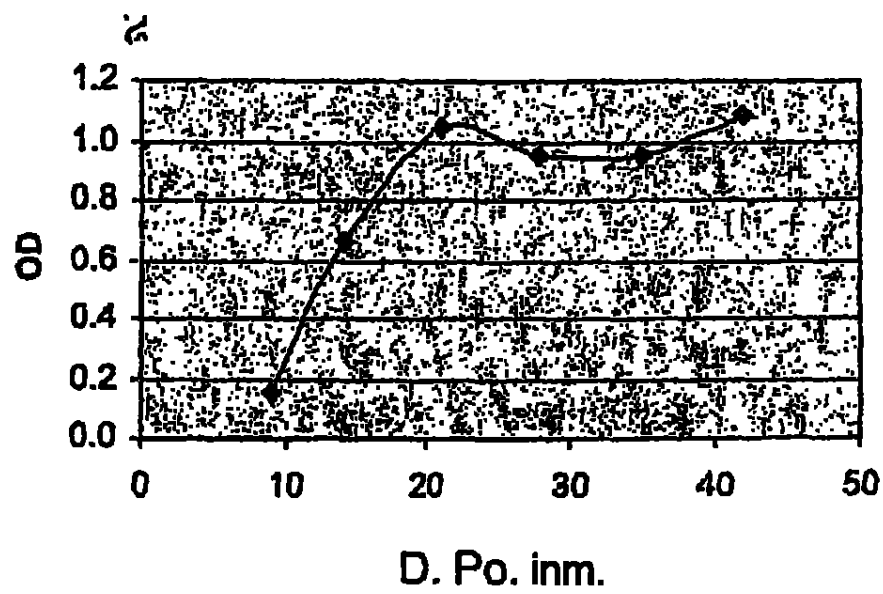


Fig. 3

4/9

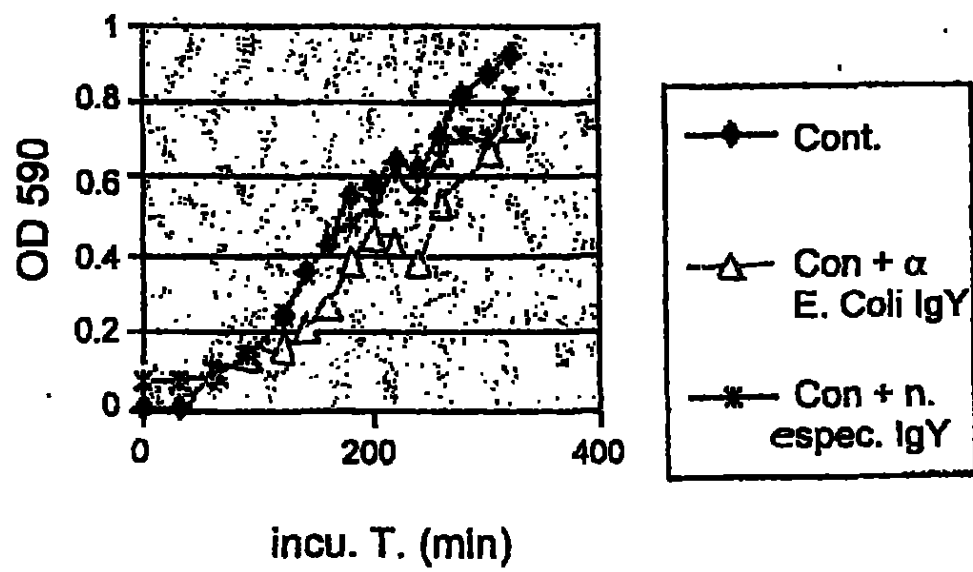


Fig. 4

5/9

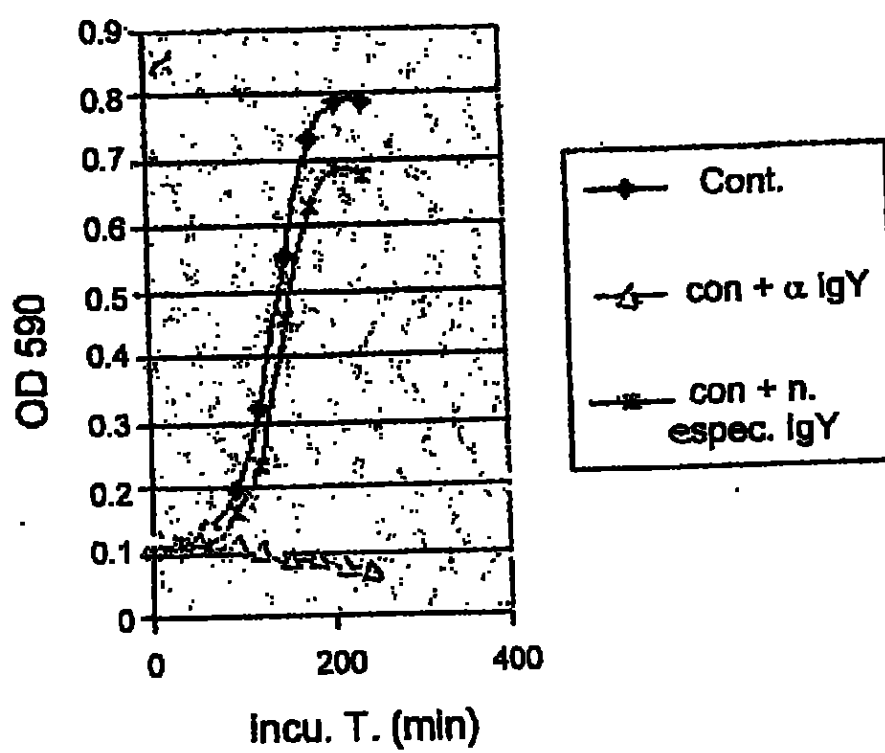


Fig. 5

6/9

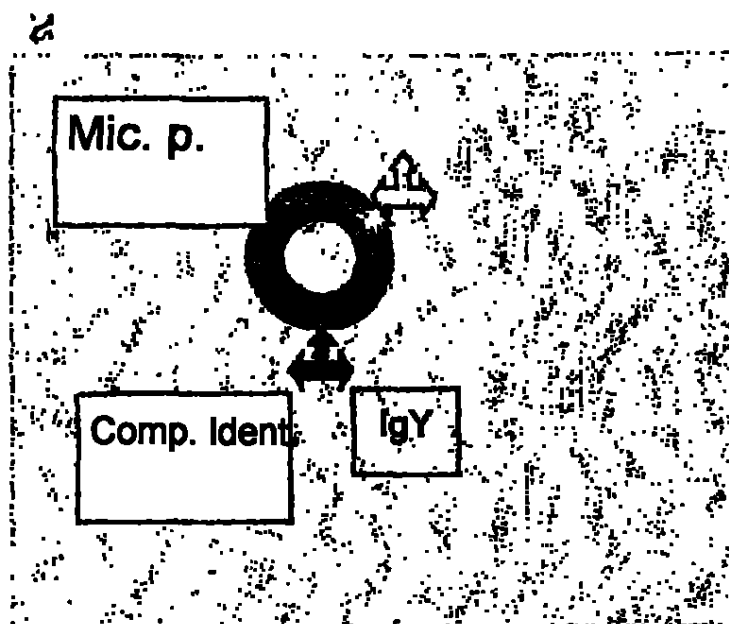
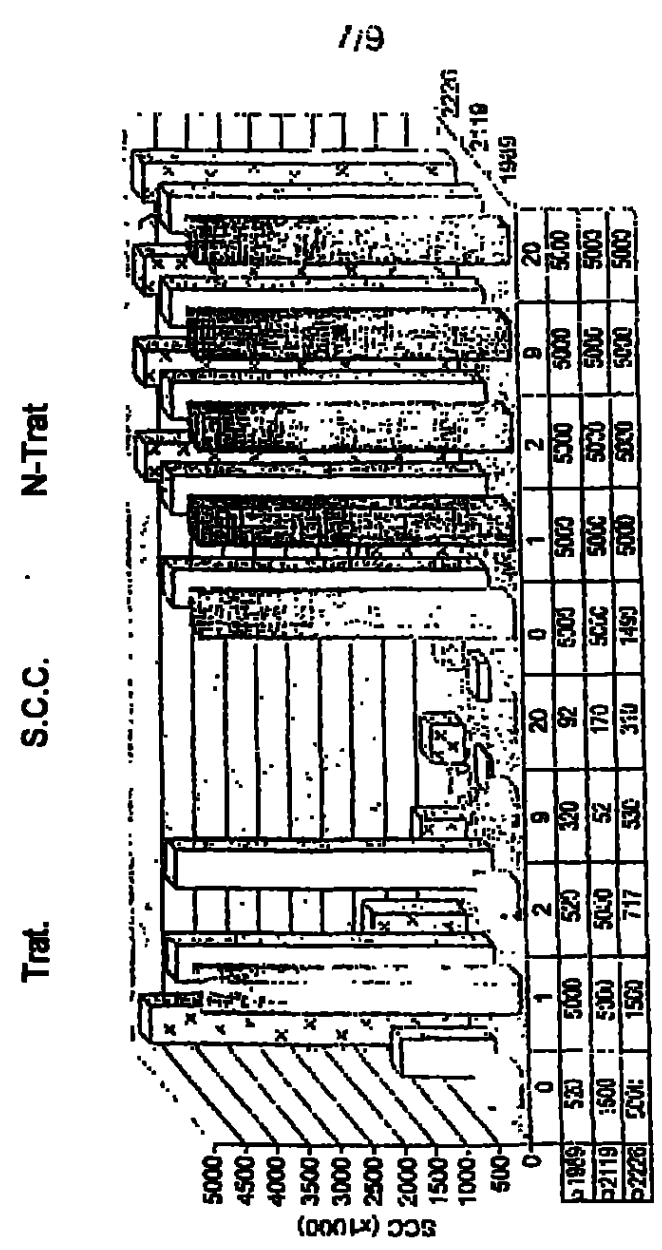


Fig. 6



D. Po. trat.

Fig. 7

8/9

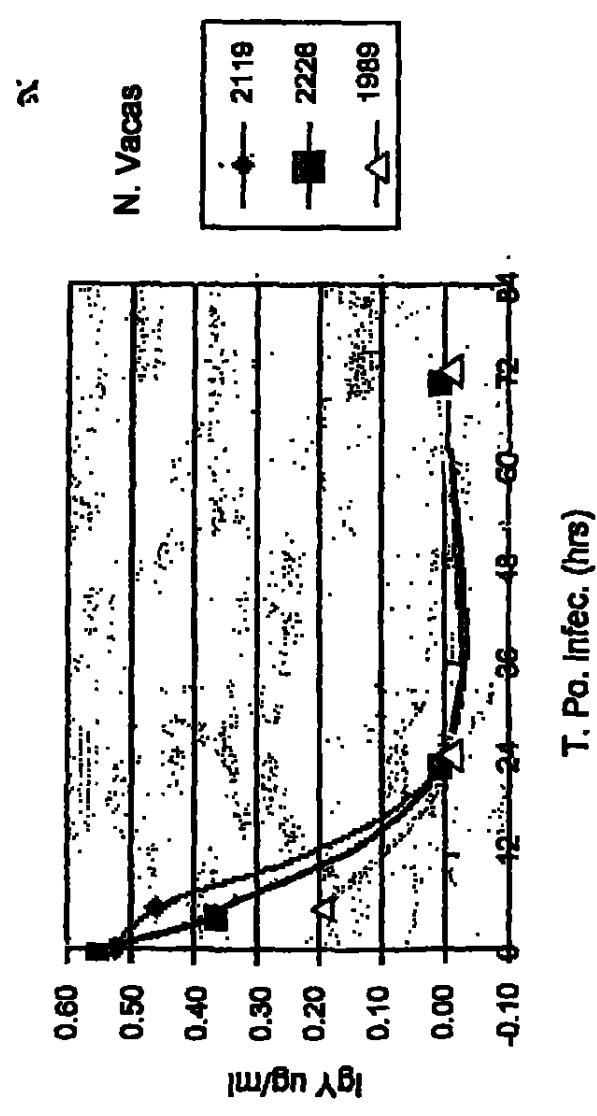


Fig. 8

9/9

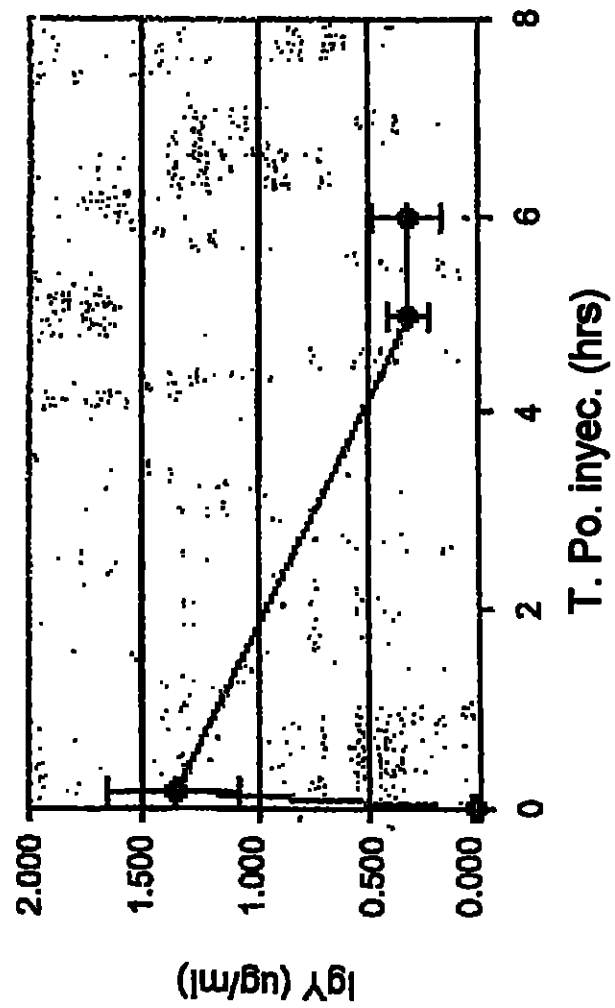


Fig. 9

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable.

Fecha

2020

Bogotá D C

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS
Apoderado
YAMIT BIOTECHNOLOGIES LTD.

Oficio N° **10064**

ASUNTO:

Radicación N°	04-100868
Solicitud internacional	PCT/IL2003/000196
Fecha inicio fase nacional	2004-10-10
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.
- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k Decisión 486).
- El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al Capítulo I ó II del PCT, porque la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 202063