

DESCRIPCIÓN

Plásmidos inmunoestimuladores

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los plásmidos inmunoestimuladores. Los plásmidos no comprenden un gen de resistencia a los antibióticos. Los plásmidos pueden comprender un gen marcador seleccionable o detectable que no es un gen de resistencia a los antibióticos (por ejemplo, un gen LacZ). Alternativamente, los plásmidos pueden estar desprovistos de cualquier gen marcador seleccionable o detectable.

Antecedentes de la invención

15 Los motivos CpG no metilados son mucho más frecuentes en el ADN bacteriano que en el ADN de vertebrados. Estos motivos activan los mecanismos de defensa del huésped y conducen a respuestas inmunes innatas y adquiridas. Los motivos CpG y sus efectos inmunoestimuladores son revisados en Krieg, Ann. Rev. Immunol. 20: 709-760 (2002).

20 Un plásmido inmunoestimulador que contiene una cantidad de motivos CpG fue desarrollado previamente y se ha demostrado que es efectivo para provocar respuestas inmunitarias cuando se administra a especies aviares y bovinas en una composición inmunomoduladora que comprende el plásmido y un vehículo catiónico de suministro de liposomas. Véanse las publicaciones de solicitudes de patentes de los Estados Unidos Nos. 2012/0064151 A1 (especies aviares) y 2013/0295167 A1 (especies bovinas), cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad. Este plásmido, pMB75.6, tiene 4.242 pb de longitud y contiene 288 dinucleótidos CpG. Se muestra un mapa de pMB75.6 en la FIG. 1 y se proporciona la secuencia de nucleótidos de pMB75.6 como la SEQ ID NO: 2. Como se describe en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2012/0064151, la composición inmunomoduladora que contiene pMB75.6 provocó una respuesta inmune no específica de antígeno que protegió a pollos de enfermedades infecciosas cuando se administran *in ovo*. Esta respuesta inmune no específica de antígeno fue mejorada aún más con la administración de al menos un agente biológico, tal como una vacuna. Además, se encontró que la composición inmunomoduladora que contiene el plásmido pMB75.6 tiene un efecto adyuvante y provoca un aumento en la eficacia de las vacunas. Del mismo modo, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2013/0295167, la composición inmunomoduladora que contiene pMB75.6 provocó una respuesta inmune no específica de antígeno en el ganado que protegía a los bovinos de enfermedades infecciosas.

40 Sin embargo, como se muestra en la FIG. 1, el plásmido pMB75.6 contiene un gen de resistencia a kanamicina (Kan^R). La selección y producción de sistemas basados en antibióticos se ven cada vez más desfavorecidos debido a la preocupación acerca de la transferencia horizontal del gen de resistencia a los antibióticos a las bacterias en el medio ambiente. La transferencia horizontal potencial de genes de resistencia a antibióticos es especialmente preocupante para los vectores que se administran directamente a un sujeto (por ejemplo, plásmidos inmunoestimuladores tales como pMB75.6 o vectores utilizados para terapia génica o vacunación con ADN). Por tanto, existe una necesidad en la técnica por plásmidos inmunoestimuladores que son capaces de provocar una respuesta inmune en un sujeto al mismo tiempo que carece de genes de resistencia a antibióticos.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a plásmidos inmunoestimuladores. El plásmido inmunoestimulador puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 89% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4, o una combinación de las mismas. En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador puede comprender una molécula de ácido nucleico que tiene al menos 84% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador pueden comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 4.

En otros aspectos, el plásmido inmunoestimulador puede consistir en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 89% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4, o una combinación de las mismas. En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador puede consistir en una molécula de ácido nucleico que tiene al menos 84% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador puede consistir en la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador puede consistir en la secuencia de la SEQ ID NO: 4.

En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador preferiblemente no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable o detectable funcional o de longitud completa. En otros aspectos, el plásmido inmunoestimulador comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable o detectable que no es un gen de resistencia a los antibióticos.

La presente invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los plásmidos inmunoestimuladores, o secuencias de ADN, que se describen en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere además a composiciones inmunomoduladoras que comprenden un vehículo catiónico de suministro de liposoma y cualquiera de los plásmidos inmunoestimuladores, o secuencias de ADN, que se describen en este documento.

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a métodos de uso de los plásmidos inmunoestimuladores, o secuencias de ADN, que se describen en este documento. Los métodos adecuados de uso incluyen la administración terapéutica a un sujeto. Tal administración terapéutica incluye tratamiento profiláctico, tratamiento metafiláctico, y tratamiento posterior a la infección de un sujeto o sujetos.

La presente invención se refiere a métodos para estimular o producir una respuesta inmune en un sujeto. En algunos aspectos, los métodos incluyen la estimulación de una respuesta inmune en un sujeto mediante la administración al sujeto de una composición inmunomoduladora que se describe aquí. En algunos aspectos, los métodos incluyen la estimulación de una respuesta inmune en un sujeto mediante la administración al sujeto de un plásmido inmunoestimulador, o secuencia de ADN, que se describe en este documento.

Otros objetos y características serán evidentes en parte y en parte indicadas aquí más adelante.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento.

La FIG. 1 muestra un mapa del plásmido pMB75.6;

La FIG. 2 muestra un mapa del plásmido pGCMB75.6;

La FIG. 3 muestra un mapa del plásmido pLacZ75.6; y,

La FIG. 4 ilustra gráficamente que las composiciones inmunomoduladoras descritas en este documento aumentan la capacidad de supervivencia de los sujetos receptores estimulados con un virus patógeno (Fig. 4A, y Fig. 4B).

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto una composición que es capaz de provocar una respuesta inmune en un sujeto receptor, así como los métodos de uso. En particular, la presente invención se refiere a composiciones de ácido nucleico novedosas, o composiciones inmunomoduladoras, y usos de las mismas. Se ha descubierto que tales composiciones inmunomoduladoras pueden incluir secuencias de ADN descritas en el presente documento con un contenido mejorado de GC, motivos CpG, y propagado sin incluir genes de resistencia a antibióticos o secuencia codificante. Las secuencias de ácido nucleico de la invención se pueden usar para estimular o potenciar una respuesta inmune en un sujeto para prevenir o tratar enfermedades infecciosas con una seguridad significativamente mejorada sobre otros métodos de prevención y tratamiento conocidos en la técnica. La invención es particularmente útil en el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos, tales como, sin limitación, virus, bacterias, moho, hongos, levaduras, parásitos y otros microbios conocidos en la técnica. Las composiciones y métodos de uso de las composiciones inmunomoduladoras se discuten con más detalle a continuación.

I. Composiciones

Las composiciones útiles en esta invención, tales como las descritas en el presente documento, pueden ser generalmente utilizadas como un tratamiento profiláctico, terapia metafiláctica, o terapia de tratamiento para enfermedades infecciosas. Tales composiciones se denominan aquí como composiciones inmunomoduladoras. Las composiciones inmunomoduladoras incluyen al menos un plásmido inmunoestimulador o secuencia de ADN inmunoestimuladora, capaz de provocar una respuesta inmune en un sujeto receptor. En algunos aspectos, las composiciones inmunomoduladoras pueden incluir también un vehículo de suministro de liposomas.

A. Ácidos nucleicos

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico útiles para el tratamiento o la prevención de los agentes causantes de enfermedades infecciosas. Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento pueden ser incluidas en un plásmido inmunoestimulador, como ADN lineal de doble cadena o de cadena sencilla, secuencia de aminoácidos, ácido ribonucleico (ARN), o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, vectores, y células huésped (in vitro, in vivo o ex vivo), que contienen el plásmido inmunoestimulador o secuencia de ADN inmunoestimuladora.

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a plásmidos inmunoestimuladores, o secuencias de ADN, que no comprenden un gen de resistencia a los antibióticos. Los plásmidos pueden ser desprovistos de cualquiera de los genes marcadores seleccionables o

detectables. Por ejemplo, el plásmido pGCMB75.6 descrito en este documento no comprende ninguno de los genes marcadores seleccionables o detectables funcionales o de longitud completa. La secuencia de pGCMB75.6 se proporciona en la SEQ ID NO: 1.

5 En algunos aspectos, los plásmidos inmunoestimuladores descritos en este documento preferiblemente no comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para un marcador seleccionable o detectable funcional o de longitud completa. En algunos aspectos, los plásmidos inmunoestimuladores no comprenden un gen de resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, los plásmidos no comprenden un gen de resistencia a kanamicina. En algunos
10 aspectos, los plásmidos descritos en este documento preferiblemente no codifican un inmunógeno.

En algunos aspectos, los plásmidos inmunoestimuladores pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica para un gen marcador seleccionable o detectable que no es un gen de resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, el plásmido pLacZMB75.6
15 descrito en este documento comprende un gen LacZ como un marcador detectable. Se proporciona un mapa de pLacZMB75.6 en la FIG. 3 y se proporciona la secuencia de nucleótidos de pLacZMB75.6 como la SEQ ID NO: 4. Como se muestra en la FIG. 3, pLacZMB75.6 es similar a pGCMB75.6, pero contiene un marcador detectable LacZ.

20 Se apreciará que las secuencias de nucleótidos de los plásmidos pGCMB75.6 o pLacZMB75.6 se pueden variar en cierta medida sin afectar adversamente significativamente sus propiedades inmunoestimuladoras. En algunos aspectos, la presente invención se refiere a un plásmido inmunoestimulador que comprende una secuencia de
25 ácido nucleico que tiene al menos 89% de identidad de secuencia con la secuencia de pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). El plásmido inmunoestimulador comprende preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1).
30 En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador comprende más preferiblemente la secuencia de pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1).

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a un plásmido inmunoestimulador que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 84% de identidad de
35 secuencia con la secuencia de pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). El plásmido inmunoestimulador comprende preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de
40 pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador comprende más preferiblemente la secuencia de pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4).

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a un plásmido inmunoestimulador que consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 89% de identidad de
45 secuencia con la secuencia de pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). El plásmido inmunoestimulador consiste preferiblemente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97% , al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador consiste
50 más preferiblemente de la secuencia de pGCMB75.6 (SEQ ID NO: 1).

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a un plásmido inmunoestimulador que consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 84% de identidad de secuencia con la secuencia de pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). El plásmido

inmunoestimulador consiste preferiblemente en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92% , al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4). En algunos aspectos, el plásmido inmunoestimulador consiste más preferiblemente de la secuencia de pLacZMB75.6 (SEQ ID NO: 4).

Otro aspecto importante de esta invención proporciona secuencias de ADN inmunoestimuladoras o plásmidos inmunoestimuladores capaces de estimular una respuesta inmune que incluye secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de alta rigurosidad a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 4. Las secuencias de ácido nucleico adecuadas incluyen aquellas que son homólogas, sustancialmente similares o idénticas a los ácidos nucleicos de la presente invención. En algunos aspectos, las secuencias homólogas de ácidos nucleicos tendrán una similitud de secuencia de al menos aproximadamente 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% con la SEQ ID NO: 1 o la secuencia complementaria respectiva. En otros aspectos, las secuencias homólogas de ácidos nucleicos tendrán una similitud de secuencia de al menos aproximadamente 84%, 85%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% con la SEQ ID NO: 4 o la secuencia complementaria respectiva. La similitud de secuencia se puede calcular usando una serie de algoritmos conocidos en la técnica, tales como BLAST, descrito en Altschul, S. F., y colaboradores, J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990. Los ácidos nucleicos pueden diferir en la secuencia de los ácidos nucleicos anteriormente descritos debido a la degeneración del código genético. En general, una secuencia de referencia será de 18 nucleótidos, más usualmente 30 o más nucleótidos, y puede comprender toda la secuencia de ácido nucleico de la composición para propósitos de comparación.

Las secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 4 se contemplan en el presente documento. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen condiciones tales como la hibridación a 50°C o superior y 0,1X SSC (cloruro de sodio 15 mM/citrato de sodio 1,5 mM). Otro ejemplo es la incubación durante la noche a 42°C en una solución de 50% de formamida, 5X SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5X solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en 0,1X SSC a aproximadamente 65°C. Los ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas son condiciones de hibridación que son al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, o 95% tan rigurosas como las condiciones específicas anteriores. Otras condiciones de hibridación rigurosas son conocidas en la técnica y también se pueden emplear para identificar homólogos de los ácidos nucleicos de la invención (Current Protocols in Molecular Biology, Unidad 6, pub. John Wiley & Sons, N.Y. 1989).

Los nucleótidos mutantes de las moléculas de ADN descritas en este documento se pueden utilizar, siempre y cuando los mutantes incluyan secuencias de ácido nucleico que mantienen la capacidad de estimular una respuesta inmune como se describe en el presente documento. La secuencia de ADN de tal mutación diferirá usualmente en uno o más nucleótidos o aminoácidos. Los cambios de secuencia pueden ser sustituciones, inserciones, supresiones o una combinación de los mismos. Las técnicas para mutagénesis de genes clonados son conocidas en la técnica. Los métodos para la mutagénesis específica del sitio se pueden encontrar en Gustin y colaboradores, Biotechniques 14: 22, 1993; Barany, Gene 37: 111-23, 1985; Colicelli y colaboradores, Mol. Gen. Genet. 199: 537-9, 1985; y Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press 1989, páginas 15,3 - 15,108 y todos se incorporan en el presente documento por referencia. En resumen, la invención se refiere a secuencias de ácido nucleico capaces de estimular una respuesta inmune en un sujeto y variantes o mutantes de la misma. Además, la

invención abarca los ARN intermediarios codificados por las secuencias de ácido nucleico descritas, así como cualquiera de las secuencias de aminoácidos resultantes codificadas.

5 Cuando la secuencia de nucleótidos del plásmido inmunoestimulador varía de las
secuencias proporcionadas en las SEQ ID NOs. 1 y 4, los dinucleótidos CpG en el plásmido
se dejan preferiblemente intactos. Alternativamente, si la secuencia de nucleótidos del
plásmido se altera de tal manera que se elimina un dinucleótido CpG, se puede alterar la
10 secuencia del plásmido en otra ubicación tal que el número total de dinucleótidos CpG en el
plásmido sigue siendo el mismo. También se pueden introducir otros dinucleótidos CpG,
además de los ya presentes en las secuencias de nucleótidos de pGCMB75.6 o
pLacZMB75.6 en el plásmido. Así, por ejemplo, los plásmidos inmunoestimuladores
descritos en este documento comprenden preferiblemente al menos aproximadamente 200,
15 al menos aproximadamente 220, al menos aproximadamente 240, al menos
aproximadamente 260, al menos aproximadamente 270, al menos aproximadamente 275, al
menos aproximadamente 280, al menos aproximadamente 283, al menos aproximadamente
285, o al menos aproximadamente 288 dinucleótidos CpG. Por ejemplo, el plásmido
inmunoestimulador puede comprender 283 dinucleótidos CpG.

20 En particular, la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que
comprenden cualquiera de los plásmidos inmunoestimuladores o secuencias de ADN
descritas en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

B. Inmunomodulador

25 Las composiciones inmunomoduladoras adecuadas para uso con los plásmidos
inmunoestimuladores descritos en este documento se describen en las publicaciones de las
solicitudes de patente estadounidenses Nos. 2012/0064151 A1 (especies aviares) y
2013/0295167 A1 (especies bovinas), cuyos contenidos se incorpora aquí por referencia en
su totalidad.

30 La composición inmunomoduladora comprende un vehículo de suministro de liposomas, y al
menos uno de los plásmidos inmunoestimuladores, o secuencias de ADN, que se describen
en este documento.

35 Un vehículo adecuado de suministro de liposomas comprende una composición de lípidos
que es capaz de suministrar moléculas de ácido nucleico a los tejidos del sujeto tratado. Un
vehículo de suministro de liposomas es preferiblemente capaz de permanecer estable en un
sujeto durante un período suficiente de tiempo para suministrar una molécula de ácido
nucleico y/o un agente biológico. Por ejemplo, el vehículo de suministro de liposomas es
40 estable en el sujeto receptor durante al menos aproximadamente cinco minutos, durante al
menos aproximadamente 1 hora, o durante al menos aproximadamente 24 horas.

Un vehículo de suministro de liposomas de la presente invención comprende una
composición lipídica que es capaz de fusionarse con la membrana plasmática de una célula
45 para suministrar una molécula de ácido nucleico en una célula. Cuando la molécula de ácido
nucleico codifica una o más proteínas, el complejo de ácido nucleico: liposoma tiene
preferiblemente una eficacia de transfección de al menos aproximadamente 1 picogramo
(pg) de proteína expresada por miligramo (mg) de proteína total de tejido por microgramo
(µg) de nucleico ácido suministrado. Por ejemplo, la eficiencia de la transfección de un
50 complejo de ácido nucleico:liposoma puede ser al menos aproximadamente de 10 pg de
proteína expresada por mg de proteína total de tejido por µg de ácido nucleico suministrado;
o al menos aproximadamente 50 pg de proteína expresada por mg de proteína total de tejido
por µg de ácido nucleico suministrado. La eficiencia de la transfección del complejo puede
ser tan baja como 1 femtogramo (fg) de proteína expresada por mg de proteína total de

tejido por μg de ácido nucleico suministrado, siendo más preferidas las cantidades anteriores.

5 Un vehículo preferido de suministro de liposomas de la presente invención está entre aproximadamente 100 y 500 nanómetros (nm) de diámetro. Por ejemplo, el vehículo de suministro de liposomas puede estar entre aproximadamente 150 y 450 nm o entre aproximadamente 200 y 400 nm de diámetro.

10 Los liposomas adecuados incluyen cualquier liposoma, tales como los utilizados comúnmente, por ejemplo, en los métodos de suministro de genes conocidos por los expertos en la técnica. Los vehículos preferidos de suministro de liposomas comprenden lípidos de vesículas multilamelares (MLV) y lípidos extrudidos. Los métodos para la preparación de MLV son bien conocidos en la técnica. Los vehículos más preferidos de suministro de liposomas comprenden liposomas que tienen una composición de lípidos policationicos (es decir, liposomas catiónicos) y/o liposomas que tienen un esqueleto de colesterol conjugado con polietilenglicol. Los ejemplos de composiciones catiónicas de liposomas incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y colesterol, cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) y colesterol, cloruro de 1-[2-(oleoiloxi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxietil)-imidazolinio (DOTIM) y colesterol, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y colesterol, y combinaciones de los mismos. Una composición más preferida de liposomas para uso como vehículo de suministro incluye DOTIM y colesterol.

25 Una molécula adecuada de ácido nucleico incluye cualquiera de los plásmidos inmunoestimuladores descritos en este documento. Las secuencias codificadoras de ácido nucleico codifican al menos una porción de una proteína o péptido, mientras que la secuencia no codificadora no codifica ninguna porción de una proteína o péptido. De acuerdo con la presente invención, los ácidos nucleicos "no codificantes" pueden incluir regiones reguladoras de una unidad de transcripción, tales como una región promotora. El término, "vector vacío" se puede usar de forma intercambiable con el término "no codificante", y en particular se refiere a una secuencia de ácido nucleico en ausencia de una porción que codifica proteína, tal como un vector plásmido sin un inserto del gen. No se requiere la expresión de una proteína codificada por los plásmidos descritos en este documento para provocar una respuesta inmune no específica de antígeno; por lo tanto, los plásmidos no necesitan contener ninguna secuencia codificante operativamente unida a una secuencia de control de la transcripción. Sin embargo, se pueden obtener otras ventajas (es decir, específicas de antígeno e inmunidad mejorada) mediante la inclusión en la composición de una secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica un inmunógeno y/o una citoquina. Tal secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno y/o una citoquina puede ser incluida en los plásmidos inmunoestimuladores descritos en este documento, o puede ser incluida en un ácido nucleico separado (por ejemplo, un plásmido separado) en la composición.

45 La formación de un complejo de liposoma con los plásmidos inmunoestimuladores descritos en este documento se puede lograr utilizando métodos estándar en la técnica o como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.693.086, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Una concentración adecuada de un plásmido para añadir a un liposoma incluye una concentración efectiva para suministrar una cantidad suficiente del plásmido en un sujeto de tal manera que se provoca una respuesta inmune sistémica. Por ejemplo, se pueden combinar desde aproximadamente 0,1 μg hasta aproximadamente 10 μg de plásmido con aproximadamente 8 nmol de liposomas, se pueden combinar desde aproximadamente 0,5 μg hasta aproximadamente 5 μg de plásmido con aproximadamente 8 nmol de liposomas, o se pueden combinar aproximadamente 1,0 μg de plásmido con aproximadamente 8 nmol de liposomas. La proporción de plásmido a lípido (μg de plásmido:

nmol de lípido) en una composición puede ser al menos aproximadamente 1:1 de plásmido : lípido en peso (por ejemplo, 1 µg de plásmido : 1 nmol de lípido). Por ejemplo, la proporción de plásmido a lípidos puede ser al menos aproximadamente de 1:5, al menos aproximadamente de 1:10, o al menos aproximadamente de 1:20. Las proporciones expresadas en este documento se basan en la cantidad de lípido catiónico en la composición, y no en la cantidad total de lípido en la composición. La proporción de plásmido a lípidos en una composición de la invención es adecuadamente de aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 1:80 de plásmido : lípido en peso; desde aproximadamente 1:2 hasta aproximadamente 1:40 de plásmido : lípido en peso; desde aproximadamente 1:3 hasta aproximadamente 1:30 de plásmido: lípido en peso; o desde aproximadamente 1: 6 hasta aproximadamente 1:15 de plásmido: lípido en peso.

C. Agente biológico

Cualquiera de las composiciones inmunomoduladoras descritas en el presente documento puede comprender además al menos un agente biológico, además del vehículo de suministro de liposomas, y al menos uno de los plásmidos descritos en este documento.

Los agentes biológicos adecuados son agentes que son efectivos en la prevención o el tratamiento de enfermedades de las aves o de los bovinos. Tales agentes biológicos incluyen proteínas reforzadoras de inmunidad, inmunógenos, vacunas, antimicrobianos o cualquier combinación de los mismos. Las proteínas adecuadas reforzadoras de inmunidad son aquellas proteínas conocidas por reforzar la inmunidad. A modo de un ejemplo no limitante, una citoquina, que incluye una familia de proteínas, es una familia conocida de proteínas reforzadora de la inmunidad. Los inmunógenos adecuados son proteínas que provocan una respuesta inmune humoral y/o celular de tal forma que la administración del inmunógeno a un sujeto monta una respuesta inmune específica del inmunógeno contra las mismas proteínas o similares que se encuentran dentro de los tejidos del sujeto. Un inmunógeno puede incluir un antígeno patogénico expresado por una bacteria, un virus, un parásito o un hongo. Los antígenos preferidos incluyen antígenos derivados de organismos que provocan una enfermedad infecciosa en un sujeto. De acuerdo con la presente invención, un inmunógeno puede ser cualquier porción de una proteína, de origen natural o derivada sintéticamente, que provoca una respuesta inmune humoral y/o celular. Como tal, el tamaño de un antígeno o inmunógeno puede ser tan pequeño como aproximadamente 5 a 12 aminoácidos y tan grande como una proteína de longitud completa, incluyendo cualquier de los tamaños intermedios. El antígeno puede ser una proteína multimérica o proteína de fusión. El antígeno puede ser un antígeno purificado. Alternativamente, la proteína reforzadora de inmunidad o inmunógeno pueden ser codificados por el plásmido inmunoestimulador o por otro ácido nucleico incluido en la composición inmunomoduladora. Cuando la proteína reforzadora de inmunidad o inmunógeno es codificado por una molécula de ácido nucleico en la composición inmunomoduladora, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína reforzadora de inmunidad o inmunógeno se enlaza operativamente a una secuencia de control de la transcripción, de manera que el inmunógeno se expresa en un tejido de un sujeto, provocando de ese modo una respuesta inmune específica del inmunógeno en el sujeto, además de la respuesta inmune no específica. Las técnicas para detectar la inmunogenicidad, tales como la inmunogenicidad del antígeno del patógeno o la actividad de la citoquina son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Cuando el agente biológico es una vacuna, la vacuna puede incluir una vacuna viva, infecciosa, viral, bacteriana o parasitaria o una vacuna de virus muerto, inactivado, viral, bacteriano, parasitario. Una o más vacunas, vacunas de virus vivos o muertos, se pueden usar en combinación con la composición inmunomoduladora de la presente invención. Las vacunas adecuadas incluyen aquellas conocidas en la técnica para especies aviares o bovinas.

Los ejemplos de vacunas para especies aviares incluyen, sin limitación, aquellas que se utilizan en la técnica para la protección contra el virus de la enfermedad de Marek (MDV), el virus de la enfermedad de New Castle (NDV), el virus de la anemia del pollo (CAV), virus de la bursitis infecciosa (IBDV), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus del herpes del pavo (HVT), virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILT), virus de la encefalomiелitis aviar (AEV), el virus de la viruela aviar (FPV), cólera aviar, virus de la influenza aviar (AIV), reovirus, virus de la leucosis aviar (ALV), virus de la reticuloendoteliosis (REV), adenovirus aviar y el virus de la enteritis hemorrágica (HEV), coccidia, y otras enfermedades conocidas en la técnica.

En otro ejemplo, la vacuna puede ser una vacuna como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.427.791, 6.048.535, y 6.406.702. Por ejemplo, se puede utilizar una vacuna para la protección contra la enfermedad de Marek en combinación con la composición inmunomoduladora de la presente invención.

Ejemplos de vacunas para especies bovinas incluyen, sin limitación, las que se utilizan en la técnica para la protección contra la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) (virus del herpes bovino tipo 1 (BHV1)), virus de parainfluenza de tipo 3 (PI3), virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV Tipo 1 y 2), *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, y de otras enfermedades conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una vacuna para la protección contra *Mannheimia haemolytica* en combinación con la composición inmunomoduladora de la presente invención.

El agente biológico puede ser un antimicrobiano. Los antimicrobianos adecuados incluyen: quinolonas, preferiblemente fluoroquinolonas, β -lactamas, y antibióticos lincosamidas estreptográminas macrólidas (MLS).

Las quinolonas adecuadas incluyen benofloxacina, binfloxacina, cinoxacina, ciprofloxacina, clinafloxacina, danofloxacina, difloxacina, enoxacina, enrofloxacina, fleroxacina, gemifloxacina, ibafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, cimiazol, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, orbifloxacina, pazufloxacina, pradofloxacina, perfloxacina, sarafloxacina, esparfloxacina, temafloxacina y tosufloxacina. Las fluoroquinolonas preferidas incluyen ciprofloxacina, daunofloxacina, enrofloxacina, moxifloxacina, y pradofloxacina. Las naftiridonas adecuadas incluyen ácido nalidíxico.

Las β -lactamas adecuadas incluyen penicilinas (por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, penicilina benzatina, bencilpenicilina, carbenicilina, cloxacilina, coamoxiclav [es decir, amoxicilina/ácido clavulánico], dicloxacilina, flucloxacilina, meticilina, mezlocilina, nafcilina, oxacilina, fenoximetilpenicilina, piperacilina, penicilina procaína, temocilina, y ticarcilina); cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefalonio, cefamandol, cefapirina, cefazolina, cefepima, cefixima, cefotaxima, cefoxitina, cefpiroma, cefpodoxima, cefquinoma, ceftazidima, ceftiofur, ceftriaxona, cefuroxima, cefalexina, cefalotina, y defotetano); carbapenemes y penemes (por ejemplo, doripenem, ertapenem, faropenem, imipenem y meropenem); monobactamas (por ejemplo, aztreonam, nocardicina A, tabtoxinina- β -lactama, y tigemonam); y los inhibidores de β -lactamasa (por ejemplo, ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Las β -lactamas preferidas incluyen cefalosporinas, en particular, cefazolina.

Los antibióticos MLS adecuados incluyen clindamicina, lincomicina, pirlimicina, y cualquier antibiótico macrólido. Un antibiótico lincosamida preferido es pirlimicina.

Otros agentes antimicrobianos incluyen aminoglucósidos, clopidol, dimetridazoles, eritromicina, frameticina, furazolidona, halofuginona, 2-piridonas, robenidina, sulfonamidas, tetraciclinas, trimetoprim, diversas pleuromutilinas (por ejemplo, tiamulina y valnemulina), y diversas estreptomicinas (por ejemplo, monensina, narasina y salinomicina).

II. Métodos

Un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones inmunomoduladoras, plásmidos inmunoestimuladores (o secuencia de ADN), y métodos que provocan una inmunidad protectora a sujetos no infectados, inmunidad protectora a sujetos infectados, una mayor inmunidad a sujetos no infectados, una mayor inmunidad a sujetos infectados, inmunidad terapéutica a sujetos infectados, o combinaciones de los mismos. Como tales, las composiciones de la invención se pueden usar para inmunizar profilácticamente a un sujeto o se utilizan para tratar a un sujeto. Los métodos aquí descritos incluyen la administración de un plásmido inmunoestimulador, o secuencia de ADN, descrita en este documento a un sujeto.

A. Métodos de estimulación inmune

La presente invención se relaciona con métodos para provocar una respuesta inmune en un sujeto receptor. Los métodos comprenden administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una composición inmunomoduladora para provocar una respuesta inmune. En algunos aspectos, la composición inmunomoduladora provoca una respuesta inmune no específica de antígeno que es efectiva por sí sola. En algunos aspectos, la composición inmunomoduladora mejora el funcionamiento de al menos un agente biológico tal como una vacuna, cuando se administra antes de dicha vacuna, se administra conjuntamente con una vacuna, se administra después de la vacunación, o se mezcla con la vacuna. En algunos aspectos, los métodos proporcionan nuevas estrategias de tratamiento para proteger a los sujetos receptores de enfermedades infecciosas y el tratamiento de las poblaciones que tienen enfermedades infecciosas. En algunos aspectos, los métodos proporcionan una protección más rápida, más duradera y mejor contra una enfermedad cuando se utiliza el inmunomodulador en combinación con una vacuna, en comparación con el uso de la vacuna sin la composición inmunomoduladora.

Se puede provocar una respuesta inmune en un sujeto receptor mediante la administración de una cantidad efectiva de una composición inmunomoduladora, que incluye cualquiera de los vehículos de suministro de liposomas descritos en este documento, cualquiera de los plásmidos inmunoestimuladores (para secuencias de ADN) que se describen en el presente documento, y cualquiera de los agentes biológicos descritos en este documento. Se contempla que el agente biológico pueda ser mezclado con o administrado conjuntamente con el inmunomodulador o independientemente del mismo. La administración independiente puede ser antes o después de la administración del inmunomodulador. También se contempla que se pueda usar más de una administración del inmunomodulador o agente biológico para extender una mayor inmunidad. Además, se puede administrar conjuntamente más de un agente biológico con el inmunomodulador, administrado antes del inmunomodulador, administrado después de la administración del inmunomodulador, o simultáneamente con el inmunomodulador.

Se puede administrar a un sujeto una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones inmunomoduladoras descritas en el presente documento. La cantidad efectiva es suficiente para provocar una respuesta inmune en el sujeto receptor. Dicha cantidad efectiva es cualquier cantidad que causa una respuesta inmune en un sujeto receptor. Los métodos para medir una respuesta inmune son conocidos en la técnica. Además, un experto en la técnica reconocerá que la cantidad efectiva dependerá de la edad, estadio de la infección, así como de otros factores conocidos en la técnica. Las cantidades efectivas adecuadas pueden variar desde aproximadamente 0,1 µg hasta 1000 µg por sujeto. En algunos aspectos, la cantidad efectiva puede variar desde aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 10 µg, desde aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 5 µg, desde aproximadamente 0,5 µg hasta aproximadamente 5 µg, desde aproximadamente 0,25 µg hasta aproximadamente 5 µg, desde aproximadamente 0,05 µg hasta sobre 10 µg, desde

aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 15 µg, desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 15 µg, desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 20 µg, desde aproximadamente 20 µg hasta aproximadamente 30 µg, desde aproximadamente 30 µg hasta aproximadamente 40 µg, desde aproximadamente 40 µg hasta aproximadamente 50 µg, desde aproximadamente 50 µg hasta aproximadamente 70 µg, desde aproximadamente 70 µg hasta aproximadamente 90 µg, desde aproximadamente 50 µg hasta aproximadamente 100 µg, desde aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 150 µg, desde aproximadamente 150 µg hasta aproximadamente 200 µg, desde aproximadamente 200 µg hasta aproximadamente 250 µg, desde aproximadamente 250 µg hasta aproximadamente 300 µg, desde aproximadamente 300 µg hasta aproximadamente 350 µg, desde aproximadamente 350 µg hasta aproximadamente 400 µg, desde aproximadamente 400 µg hasta aproximadamente 450 µg, desde aproximadamente 450 µg, hasta aproximadamente 500 µg, desde aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 550 µg, desde aproximadamente 550 µg hasta aproximadamente 600 µg, desde aproximadamente 600 µg hasta aproximadamente 650 µg, desde aproximadamente 650 µg hasta aproximadamente 700 µg, desde aproximadamente 700 µg hasta aproximadamente 750 µg, desde aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 800 µg, desde aproximadamente 800 µg hasta aproximadamente 850 µg, desde aproximadamente 850 µg hasta aproximadamente 900 µg, desde aproximadamente 900 µg hasta aproximadamente 950 µg, desde aproximadamente 950 µg hasta aproximadamente 1000 µg. Preferiblemente, en algunos aspectos, la cantidad efectiva varía desde aproximadamente 0,5 µg hasta aproximadamente 10 µg. Incluso, preferiblemente en otros aspectos la cantidad efectiva varía desde aproximadamente 50 µg hasta aproximadamente 100 µg. Y, preferiblemente, en otros aspectos, la cantidad efectiva varía desde aproximadamente 40 µg hasta aproximadamente 70 µg.

En algunos aspectos, se puede provocar una respuesta inmune en un miembro de la especie aviar mediante la administración de una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones inmunomoduladoras descritas en el presente documento al miembro de la especie aviar. La cantidad efectiva es suficiente para provocar una respuesta inmune en el miembro de la especie aviar. Por ejemplo, la cantidad efectiva del inmunomodulador para una especie aviar puede ser de aproximadamente 0,05 µg hasta aproximadamente 10 µg, de aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 5 µg, de aproximadamente 0,5 µg hasta aproximadamente 1,5 µg, o de aproximadamente 1,0 µg hasta aproximadamente 10 µg. A modo de ejemplo, las cantidades efectivas adecuadas para un sujeto que sea de la especie aviar pueden ser de aproximadamente 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg, 0,4 µg, 0,5 µg, 0,6 µg, 0,7 µg, 0,8 µg, 0,9 µg, 1,0 µg, 1,2 µg, 1,4 µg, 1,6 µg, 1,8 µg, 2,0 µg, 2,5 µg, 3,0 µg, 3,5 µg, 4,0 µg, 4,5 µg, 5,0 µg, 5,5 µg, 6,0 µg, 6,5 µg, 7,0 µg, 7,5 µg, 8,0 µg, 8,5 µg, 9,0 µg, 9,5 µg, 10,0 µg, 9,5 µg, 10,0 µg, 10,5 µg, 11,0 µg, 12 µg, 13 µg, 14 µg o 15 µg.

En algunos aspectos, se puede provocar una respuesta inmune en un miembro de la especie bovina mediante la administración de una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones inmunomoduladoras descritas en este documento a los miembros de la especie bovina. La cantidad efectiva es suficiente para provocar una respuesta inmune en el miembro de la especie bovina. Por ejemplo, la cantidad efectiva del inmunomodulador para una especie bovina puede ser de aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 1000 µg por animal, de aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 500 µg por animal, de aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 100 µg por animal, de aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 50 µg por animal, o de aproximadamente 40 µg hasta aproximadamente 60 µg por animal. A modo de ejemplo, las cantidades efectivas adecuadas para un sujeto que es de la especie bovina pueden ser de aproximadamente 30 µg, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg, 55 µg, 60 µg, 65 µg, 70 µg, 75 µg, 80 µg, 85 µg, 90 µg, 95 µg, 100 µg, 110 µg, 120 µg, 130 µg, 140 µg, 150 µg, 160 µg, 170 µg, 180 µg, 190 µg, 200 µg o hasta 500 µg, o hasta 1000 µg.

B. Condiciones de uso

5 Los métodos de la invención provocan una respuesta inmune en un sujeto de tal forma que el sujeto está protegido de una enfermedad que es susceptible de provocar una respuesta inmune. Como se utiliza en la presente memoria, la frase "protegido de una enfermedad" se refiere a la reducción de los síntomas de la enfermedad; la reducción de la ocurrencia de la enfermedad; la reducción de la gravedad clínica o patológica de la enfermedad; o la reducción del desprendimiento de un patógeno que causa una enfermedad. La protección de un sujeto puede referirse a la capacidad de una composición terapéutica de la presente invención, cuando se administra a un sujeto, para prevenir que se produzca una enfermedad, la cura y/o el alivio o reducción de los síntomas de la enfermedad, signos clínicos, patología, o causas. Por ejemplo, sin limitación, los signos clínicos de la enfermedad respiratoria bovina (BRD) incluyen lesiones pulmonares, aumento de la temperatura, depresión (por ejemplo anorexia, la reducción de la capacidad de respuesta a los estímulos externos, orejas caídas), descarga nasal, y el carácter de la respiración (por ejemplo, la frecuencia respiratoria, el esfuerzo al respirar). Las composiciones inmunomoduladoras descritas en este documento se pueden administrar a ganado vacuno del que se sospecha que está expuesto a BRD para prevenir o reducir la gravedad de los signos clínicos descritos anteriormente de BRD. A modo de ejemplo adicional, sin limitación, los signos clínicos de la enfermedad de Marek en sujetos aviares incluyen reducción de la capacidad de eclosión y supervivencia de las aves. Las composiciones inmunomoduladoras descritas en el presente documento se pueden administrar a sujetos aviares de los que se sospecha que están expuestos al virus de la enfermedad de Marek para prevenir o reducir la gravedad de los signos clínicos antes descritos de la enfermedad de Marek.

Como tal, la protección de un sujeto de una enfermedad abarca tanto la prevención de la ocurrencia de la enfermedad (tratamiento profiláctico) como el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad (tratamiento terapéutico). En particular, la protección de un sujeto de una enfermedad se logra provocando una respuesta inmune en el sujeto mediante la inducción de una respuesta inmune beneficiosa o de protección que puede, en algunos casos, suprimir, reducir, inhibir, o bloquear adicionalmente una respuesta inmunitaria hiperactiva o perjudicial. El término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de la salud normal de un sujeto e incluye un estado cuando los síntomas de la enfermedad están presentes, así como las condiciones en las que (por ejemplo, infección, mutación génica, defecto genético, etc.) se ha producido una desviación, pero los síntomas no se manifiestan aún.

Los métodos de la invención se pueden usar para la prevención de una enfermedad, la estimulación de la inmunidad de células efectoras frente a la enfermedad, la eliminación de la enfermedad, el alivio de la enfermedad, y la prevención de una enfermedad secundaria que resulta de la aparición de una enfermedad primaria.

En algunos aspectos, los métodos descritos en este documento pueden ser utilizados para mejorar la respuesta inmune adquirida del sujeto cuando se administra conjuntamente con una vacuna frente a la administración de la vacuna misma. En general, una vez administrada la vacuna no protege de inmediato al sujeto ya que toma tiempo para estimular la inmunidad adquirida. El término "mejorar" se refiere, en la presente invención, a la provocación de una respuesta inmune innata en el sujeto hasta que la vacuna comienza a proteger al sujeto y/o para prolongar el período de protección, a través de la inmunidad adquirida, dada por la vacuna.

En algunos aspectos, los métodos de la invención incluyen la administración de la composición para proteger contra la infección causada por una amplia variedad de

- patógenos. La composición administrada puede incluir o no un antígeno específico para provocar una respuesta específica. Se contempla que los métodos de la invención protegerán el sujeto receptor de la enfermedad resultante de agentes microbianos infecciosos, incluyendo, sin limitación, virus, bacterias, hongos y parásitos. Un experto en la materia reconocerá y apreciará que una composición inmunomoduladora, como se describe en el presente documento, es efectiva contra numerosos agentes infecciosos, que son demasiado numerosos para enumerarlos. Los agentes infecciosos proporcionados en este documento se proporcionan a modo de ejemplo y sin limitación del alcance de uso.
- 5 Los ejemplos de enfermedades virales infecciosas en especies aviares incluyen, sin limitación, las que resultan de la infección con el virus de la anemia infecciosa del pollo (CIAV), el virus de la enfermedad de Marek (MDV), el virus del herpes del pollo (HCV), el virus del herpes del pavo (HTV), virus de la enfermedad infecciosa de la Bursa (IBDV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), el virus de la laringotraqueítis infecciosa (laringotraqueítis), paramixovirus tipo 3, encefalomiélitis aviar (AEV), el virus de la viruela aviar (FPV), cólera aviar, virus de la influenza aviar (AIV), reovirus, virus de la leucosis aviar (ALV), virus de la reticuloendoteliosis (REV), adenovirus aviar, virus de la enteritis hemorrágica (HEV), virus de la neumonía, virus de la viruela de la paloma, recombinantes de los mismos, y otros virus conocidos en la técnica.
- 10 Los ejemplos de infecciones bacterianas en especies de aves incluyen, sin limitación, aquellas que resultan de la infección con bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, u hongos tales como *Bordetella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium colinum*, *Clostridium perfringens*, *Erysipelothrix insidiosa*, *Escherichia coli*, *Haemophilus gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, y otras bacterias conocidas en la técnica.
- 15 Los ejemplos de infecciones por hongos o moho en especies aviares incluyen, sin limitación, las que resultan de la infección por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumiga*, *Candida albicans* y otros hongos infecciosos o mohos conocidos en la técnica. Los ejemplos de condiciones de enfermedad incluyen, sin limitación, aquellas derivadas de las toxinas de las bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, u hongos tales como las toxinas de *Clostridium botulinum*, las toxinas de *Clostridium perfringens*, enterotoxinas de *Escherichia coli*, micotoxinas de *Fusarium*, leucotoxinas de *Pasteurella*, toxinas de *Staphylococcus*, y otras toxinas conocidas en la técnica.
- 20 Los ejemplos de parásitos en especies aviares incluyen, sin limitación, *Ascaridia galli*, *Capillaria annulata*, *Capillaria contorta*, *Capillaria obsignata*, *coccidia spp.*, *Eimeria meleagridis*, *Heterakis gallinae*, *Syngamus trachea*, y otros parásitos conocidos en la técnica.
- 25 Los ejemplos de enfermedades infecciosas virales en especies bovinas incluyen, sin limitación, las que resultan de la infección con el virus de la lengua azul, adenovirus bovino, calicivirus bovino, coronavirus bovino (BCV), enterovirus bovino, virus del herpes bovino tipo 1 (VHB1), virus del herpes bovino tipo 4 (BHV4), virus de la leucemia bovina, parvovirus bovino, reovirus bovino, virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), rinovirus bovino, virus de la diarrea viral bovina tipo 1 (BVDV1), virus de la diarrea viral bovina de tipo 2 (BVDV2), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), virus de la fiebre catarral maligna, virus de parainfluenza tipo 3 (PIV3), virus de la rabia, virus de la estomatitis vesicular (VSV), recombinantes de los mismos, y otros virus conocidos en la técnica.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50

Los ejemplos de infecciones bacterianas en especies bovinas incluyen, sin limitación, las que resultan de la infección con bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, o micobacterias tales como *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus anthrax*, *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*,
5 *Clostridium chauveoi*, *Clostridium colinum*, *Clostridium hemolyticum*, *Clostridium novyi*,
Clostridium perfringens, *Clostridium septicum*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium*,
Escherichia coli, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium spp.*, *Histophilus somni*,
Histophilus spp., *Leptospira spp.*, *Mannheimia haemolytica*, *Moraxella spp.*, *Muellerius spp.*,
10 *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium spp.*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma bovis*,
Mycoplasma dispar, *Mycoplasma spp.*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella spp.*,
Treponema spp., *Ureaplasma diversum* y otras bacterias conocidas en la técnica.

Los ejemplos de infecciones por hongos o mohos de la especie bovina incluyen, sin limitación, las que resultan de la infección con *Actinobacterim spp.*, *Aspergillus spp.*, y
15 *histomonas spp.*, y otras infecciones por hongos o moho conocidas en la técnica.

Los ejemplos de parásitos de las especies bovinas incluyen, sin limitación, *Anaplasma spp.*,
Anaplasma marginale, *Babesia spp.*, *Chorioptes spp.*, *Cooperia*, *Cisticerco spp.*, *Damalinia*
20 *bovis*, *Dermatophilus spp.*, *Dictylocaulus spp.*, *Eimeria spp.*, *Eperythrozoon spp.*,
Fascioloides spp., *Haemonchus spp.*, *Melophagus spp.*, *Muellerius spp.*, *Nematodirus spp.*,
Neospora spp., *Oestrus spp.*, *Ostertagia spp.*, *Psoroptes spp.*, *Sarcoptes spp.*, *Serpens*
spp., *Strongyloides spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trichophyton spp.*, *Trichostrongylus*, *Trichuris*
spp., y *Tritrichomonas spp.*, y otros parásitos conocidos en la técnica.

Los ejemplos de agentes causantes de enfermedades infecciosas en especies bovinas
25 también incluyen aquellos agentes que causan mastitis, metritis, criptosporidiosis, y
cualquier otra enfermedad infecciosa a la que es susceptible la especie bovina.

30 C. Administración

Están disponibles una variedad de rutas de administración. El modo particular seleccionado
dependerá, por supuesto, de los agentes biológicos particular seleccionados, de la edad y el
estado general de salud del sujeto, la condición particular a tratar y la dosificación requerida
35 para la eficacia terapéutica. Los métodos de esta invención pueden ponerse en práctica
usando cualquier modo de administración que produzca niveles efectivos de una respuesta
inmunitaria sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Las composiciones se
pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse
por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica.

La composición inmunomoduladora se puede administrar por vía intravenosa, por vía
40 intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, mediante aerosol, *in ovo* por el
método del folículo de la pluma, por vía oral, intraocular, intratraqueal, intranasal, o por otros
métodos conocidos en la técnica. En un aspecto, el inmunomodulador se administra por vía
subcutánea. En otro aspecto, el inmunomodulador puede administrarse por vía
45 intramuscular. En otro aspecto, el inmunomodulador se administra como un aerosol. En otro
aspecto, el inmunomodulador puede administrarse por vía oral.

En un aspecto, el inmunomodulador se puede administrar por sí mismo al sujeto antes de la
50 exposición (o la infección). En otro aspecto, el inmunomodulador se puede administrar por sí
mismo al sujeto después de la exposición (o infección). En otro aspecto, el
inmunomodulador se puede administrar por sí mismo al sujeto al mismo tiempo que la
exposición (o infección).

- En algunos aspectos, la composición inmunomoduladora puede ser administrada conjuntamente al mismo tiempo que la vacunación antes de la exposición. En algunos aspectos, la composición inmunomoduladora puede administrarse conjuntamente al mismo tiempo que la vacunación, al mismo tiempo de la exposición (o infección). En algunos aspectos, la administración conjunta puede incluir la administración de la vacuna y el inmunomodulador en la misma ubicación general en el sujeto en dos sitios diferentes próximos entre sí (es decir, inyecciones próximas entre sí en el cuello del sujeto), en lados opuestos del sujeto en la misma ubicación general (es decir, una a cada lado del cuello), o en diferentes ubicaciones del mismo sujeto. En algunos aspectos, la composición inmunomoduladora se puede administrar antes de la vacunación y la exposición. En algunos aspectos, la composición inmunomoduladora puede administrarse después de la vacunación, pero antes de la exposición. La composición inmunomoduladora puede administrarse después de la exposición de un sujeto que ha sido vacunado antes de la exposición (o infección).
- Un experto en la técnica reconocerá que las vías de administración pueden variar dependiendo del sujeto y la salud o estado del sujeto. Las vías de administración previstas para las especies aviares y bovinas son a título de ejemplo y se proporcionan sin limitación.
- La vacunación de las especies de aves se puede realizar a cualquier edad. Las vacunas se pueden administrar a los embriones de 18 días de edad (*in ovo*) y mayores para un microorganismo vivo y 3 semanas o más para un microorganismo inactivado u otro tipo de vacuna. Para la vacunación *in ovo*, se puede administrar la vacunación en el último cuarto del desarrollo. La vacuna se puede administrar por vía subcutánea, por el método del folículo de la pluma, mediante aerosol, por vía oral, intraocular, intratraqueal, intranasal, *in ovo*, o por otros métodos conocidos en la técnica. Las vacunas orales pueden administrarse en el agua potable. Además, se contempla que los métodos de la invención se pueden usar con base en esquemas de vacunación de rutina.
- La composición inmunomoduladora se puede administrar también a una especie aviar por vía subcutánea, por el método del folículo de la pluma, mediante aerosol, por vía intraocular, por vía intratraqueal, intranasal, *in ovo*, o por otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la composición inmunomoduladora se puede administrar *in ovo*. Alternativamente, la composición inmunomoduladora puede administrarse como un aerosol.
- La composición inmunomoduladora puede administrarse *in ovo* a un embrión aviar en el último trimestre de su desarrollo. Por ejemplo, la composición inmunomoduladora se puede administrar *in ovo* a un embrión de 18 días de edad, o 19 días de edad. La administración al huevo puede ser antes de la exposición (o infección) o después de la exposición.
- El inmunomodulador se puede administrar a un animal de la especie aviar o bovina desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 14 días antes de la exposición o desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 14 días después de la exposición. Por ejemplo, el inmunomodulador se puede administrar desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7 días antes de la exposición o desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7 días después de la exposición. El inmunomodulador se administra adecuadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días antes de la exposición o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días después de la exposición.
- La vacunación de la especie bovina se puede realizar a cualquier edad. La vacuna se puede administrar por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, mediante aerosol, por vía oral, intraocular, intratraqueal, intranasal, o por otros métodos conocidos en la técnica. Además, se contempla que los métodos descritos en este documento puedan ser utilizados con base en esquemas de vacunación de rutina.

Otros sistemas de administración pueden incluir liberación en el tiempo, liberación retardada, o sistemas de suministro de liberación prolongada. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de las composiciones, aumentando por lo tanto la comodidad.

5 Muchos tipos de sistemas de liberación están disponibles y son conocidos por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, polioctoésteres, ácido polihidroxibutírico, y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la patente de los

10 Estados Unidos No. 5.075.109.

Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di, y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas de

15 silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de erosión en los que un agente de la invención está contenido en una forma dentro de una matriz tales como los descritos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.452.775, 4.675.189, y 5.736.152, y

20 los sistemas de difusión en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 3, 854,480, 5,133,974, y 5,407,686. Además, se pueden utilizar sistemas de suministro con base en una bomba, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

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

30 Definiciones

El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad efectiva de inmunomodulador para

35 tratar o prevenir una enfermedad infecciosa es la cantidad necesaria para provocar el desarrollo de una respuesta inmune después de la exposición al microbio, causando así una reducción en la cantidad de microbios dentro del sujeto y, preferiblemente, la erradicación del microbio. La cantidad efectiva para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se está tratando, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o condición. Un experto en la técnica

40 puede determinar empíricamente la cantidad efectiva de inmunomodulador sin necesidad de experimentación indebida.

El término "citoquina" se refiere a una familia de proteínas que refuerzan el sistema inmune. La familia de citoquinas incluye un factor de crecimiento hematopoyético, interleuquinas,

45 interferones, moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas, moléculas de la familia del factor de necrosis tumoral y las quimiocinas (es decir, proteínas que regulan la migración y activación de las células, en particular células fagocíticas). Los ejemplos de citoquinas incluyen, sin limitación, interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), interleucina 18 (IL-18), interferón α (IFN α), y el interferón γ (IFN γ).

50

El término "provocan" puede utilizarse de manera intercambiable con los términos activan, estimulan, generar o sobrerregulan.

El término "provocar una respuesta inmune" en un sujeto se refiere a controlar específicamente o influir en la actividad de la respuesta inmune, y puede incluir la activación de una respuesta inmune, sobreexpresión de una respuesta inmune, la mejora de una respuesta inmune y/o alteración de una respuesta inmune (por ejemplo, provocando un tipo de respuesta inmune que a su vez cambia el tipo predominante de la respuesta inmunitaria en un sujeto de una que es perjudicial o inefectiva a una que es beneficiosa o de protección).

[0088] El término "operativamente enlazado" se refiere al enlazamiento de una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la transcripción de una manera tal que la molécula puede ser expresada cuando se transfecta (es decir, se transforma, transduce o transfecta) en una célula huésped. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, alargamiento y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son las que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, reforzadoras, operadoras y represoras. Se conocen una variedad de tales secuencias de control de la transcripción por parte de los expertos en la técnica. Las secuencias preferidas de control de la transcripción incluyen aquellas que funcionan en células de aves, peces, mamíferos, bacterias, virus, plantas, e insectos. Aunque se pueden utilizar cualquiera de las secuencias de control de la transcripción con la invención, las secuencias pueden incluir secuencias de control de la transcripción de origen natural asociadas con una secuencia que codifica un inmunógeno o proteína estimuladora del sistema inmunológico.

Los términos "molécula de ácido nucleico" y "secuencia de ácido nucleico" se pueden utilizar indistintamente e incluyen ADN, ARN, o derivados ya sea de ADN o de ARN. Los términos también incluyen oligonucleótidos y secuencias más grandes tales como plásmidos, tales como los plásmidos inmunoestimuladores descritos en este documento, y que incluyen tanto moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína o un fragmento de la misma, como moléculas de ácido nucleico que comprenden las regiones reguladoras, intrones, u otro ADN o ARN no codificante. Típicamente, un oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 nucleótidos, y más típicamente, es al menos aproximadamente de 5 nucleótidos de longitud. La molécula de ácido nucleico se puede derivar de cualquier fuente, incluyendo mamíferos, peces, bacterias, insectos, viral, planta, fuentes sintéticas o combinaciones de los mismos. Una molécula de ácido nucleico puede ser producida por métodos comúnmente conocidos en la técnica, tales como tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación, clonación) o síntesis química. Las moléculas de ácido nucleico incluyen moléculas naturales de ácido nucleico y homólogos de los mismos, incluyendo, pero no limitado a, variantes alélicas naturales y moléculas de ácido nucleico modificadas en las que han sido insertados, suprimidos, sustituidos, o invertidos nucleótidos, de tal manera que dichas modificaciones no interfieren sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico para provocar una respuesta inmune útil en los métodos de la presente invención. Un homólogo de ácido nucleico puede ser producido usando una cantidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989), que se incorpora en el presente documento por referencia.

Los términos "marcador seleccionable" y "gen marcador seleccionable" se refieren a un gen que codifica un producto que protege el organismo en el que se expresa el gen a partir de un agente selectivo (por ejemplo, un antibiótico) o una condición que normalmente mataría el organismo o inhibiría su crecimiento. Los genes marcadores seleccionables son más comúnmente genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, genes de resistencia a kanamicina, genes de resistencia a ampicilina, genes de resistencia a cloranfenicol, genes de resistencia a tetraciclina, etc.). Así, por ejemplo, cuando las células de *E. coli* se someten

a un procedimiento de transformación para introducir un plásmido que codifica un gen de resistencia a kanamicina y luego crecen en o sobre un medio que contiene kanamicina, sólo sobrevivirán las células de *E. coli* que han incorporado con éxito el plásmido y expresaron el gen de resistencia a la kanamicina. Los términos "marcador seleccionable" y "gen marcador seleccionable" también incluyen genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de un compuesto que es esencial para el crecimiento de un organismo. Cuando se introducen en un organismo auxotrófico que es incapaz de sintetizar el compuesto esencial, tales genes permiten que el organismo crezca en un medio que ha sido complementado con el compuesto esencial. Por ejemplo, las células bacterianas que son auxotróficas para el aminoácido lisina debido a una mutación en, o la ausencia de una enzima implicada en la biosíntesis de la lisina, normalmente no son capaces de crecer en medios que no han sido complementados con lisina. Cuando se someten tales bacterias a un procedimiento de transformación para introducir un plásmido que codifica la enzima implicada en la biosíntesis de lisina, las bacterias que han incorporado exitosamente el plásmido y expresaron la enzima sobrevivirán cuando se cultivan en medios que no han sido complementados con lisina. Los términos "marcador seleccionable" y "gen marcador seleccionable" incluyen además genes que permiten la selección de veneno/antídoto. Por ejemplo, el gen *ccdB* codifica una proteína que se une a la ADN girasa, una enzima esencial para la división celular. Tras la unión de la ADN girasa, el producto del gen *ccdB* perjudica la replicación del gen e induce la muerte celular. Por lo tanto, las bacterias que expresan el producto del gen *ccdB* no pueden sobrevivir. El gen *ccdA* codifica una proteína (el "antídoto") que actúa como un inhibidor natural del producto del gen *ccdB*. Por lo tanto, cuando las bacterias que tienen el gen *ccdB* en su genoma bacteriano son sometidas a un procedimiento de transformación para introducir un plásmido que codifica el producto del gen *ccdA*, sólo las células que incorporan exitosamente el plásmido y expresan el gen *ccdA* sobrevivirán.

Los términos "marcador detectable" y "gen marcador detectable" se refieren a un gen que codifica un producto que le permite a un observador distinguir entre las células que expresan el gen marcador detectable y las células que no expresan el gen marcador detectable. Los sistemas de genes marcadores detectables son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, genes *lacZ* y genes que codifican proteínas fluorescentes como la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína fluorescente amarilla (YFP), la proteína fluorescente roja (RFP), la proteína fluorescente azul (BFP), o la proteína fluorescente cian (CFP).

Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" se refiere a un organismo vivo que tiene un sistema nervioso central. En particular, los sujetos incluyen, pero no se limitan a, sujetos o pacientes humanos y animales de compañía. Los ejemplos de animales de compañía pueden incluir mamíferos domesticados (por ejemplo, perros, gatos, caballos), mamíferos con un importante valor comercial (por ejemplo, especies de aves, especies bovinas, vacas lecheras, ganado de carne, animales deportivos), mamíferos con valor científico significativo (por ejemplo, especímenes libres o en cautiverio de especies en peligro de extinción), o mamíferos que de uno u otro modo tienen valor. Los sujetos adecuados también incluyen: ratones, ratas, perros, gatos, ungulados, tales como vacas, cerdos, ovejas, caballos y cabras, lagomorfos tales como conejos y liebres, otros roedores y primates tales como monos, chimpancés y monos. Los sujetos pueden ser cualquier miembro de la especie aviar, ya sea doméstico o salvaje, y pueden ser levantados con fines comerciales para cría, producción de carne o huevos. Los ejemplos de especies aviares incluyen, sin limitación, pollos, pavos, gansos, patos, faisanes, codornices, palomas, avestruces, pájaros enjaulados, pájaros y aviarios en colecciones de zoológicos y similares. Los sujetos pueden ser cualquier miembro de la especie bovina, ya sea doméstico o salvaje, y pueden ser levantados con fines comerciales para la cría, producción de carne o de leche. Los ejemplos de especie bovina incluyen, sin limitación, antílopes, búfalos, yaks, ganado, bisontes, y similares. Las especies de ganado incluyen, sin limitación, vacas, toros, bueyes, novillas, ganado vacuno, ganado lechero, y similares. Los sujetos pueden ser cualquier miembro de

una especie de acuicultura, incluyendo, sin limitación, cualquier especie de peces, crustáceos, moluscos, que viven en agua dulce o salada. En algunos aspectos, los sujetos pueden ser diagnosticados con una enfermedad infecciosa, pueden estar en riesgo de una enfermedad infecciosa, o pueden estar experimentando una enfermedad infecciosa. Los sujetos pueden ser de cualquier edad incluyendo en el útero, recién nacidos, adolescentes, adultos, de edad media, o de edad avanzada.

Ejemplos

- Se presentan los siguientes ejemplos no limitantes para ilustrar adicionalmente la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación del plásmido pGCMB75.6.

- En la FIG. 2 se muestra un mapa de pGCMB75.6. En pGCMB75.6, el gen de resistencia a la kanamicina de pMB75.6 (véase la FIG. 1) ha sido sustituido por la secuencia no codificante de *E. coli* K-12. Para generar el plásmido pGCMB75.6, se introdujo un sitio de restricción cortador único *Ascl* en pMB75.6 en un sitio 5' del gen de resistencia a la kanamicina para generar pMB75.6_*Ascl* (SEQ ID NO: 3). Para introducir el sitio de restricción de *Ascl*, se mutó una adenina presente en la secuencia de pGCMB75.6 por una guanina, cambiando así la secuencia AGCGCGCC en el plásmido pGCMB75.6 por GGCGCGCC. Esta modificación se realizó utilizando un enfoque basado en mutagénesis por ligación durante la amplificación. Se usó un único cebador, que porta el sitio de restricción de *Ascl* en su parte media.

- Se sintetizó un fragmento de *Ascl* (GGCGCGCC) / *XhoI* (CTCGAG) de 1.779 nt por parte de Life Technologies GmbH (Darmstadt, Alemania). Este fragmento contenía cinco regiones que comprenden la secuencia no codificante de *E. coli* K-12 (intercambios 1-5, abreviado como "exc. 1", "exc. 2", etc. en la FIG. 2), un origen de replicación F1, y un gen *lacZ* truncado (véase la FIG. 2). En el caso del intercambio 4, se cambió manualmente la secuencia de *E. coli* en varias posiciones con el fin de aumentar el contenido de GC del plásmido. Además, en el intercambio 2, se cambió un solo nucleótido para eliminar un sitio de restricción de *DraI*, de modo que sólo habría un solo sitio *DraI* en el plásmido.

- Como se muestra en la FIG. 2, pGCMB75.6 contiene varios elementos reguladores (un origen F1 de replicación, un promotor de CMV, y un origen de replicación de pUC) y un sitio de clonación múltiple. pGCMB75.6 también contiene un gen *lacZ* truncado. Sin embargo, pGCMB75.6 no comprende ningún gen marcador seleccionable o detectable de longitud completa o funcional. pGCMB75.6 tiene 4242 pb de longitud y contiene 283 dinucleótidos CpG.

- Un clon positivo, que porta el nuevo sitio *Ascl* introducido (pMB75.6_*Ascl*) fue digerido con *Ascl* (GGCGCGCC) / *XhoI* (CTCGAG) para generar un fragmento de 2463 que contiene el promotor de CMV, un sitio de clonación múltiple, y el origen de replicación pUC (véase la FIG. 2). El fragmento *Ascl* (GGCGCGCC) / *XhoI* (CTCGAG) sintetizado de 1779 nt fue digerido con *Ascl* / *XhoI* también.

- Ambos fragmentos (el fragmento de vector de 2463 nt y el fragmento de inserto de 1779 nt) se eluyeron en gel a partir de un gel de agarosa al 1% usando el kit de extracción en gel QIAquick de Qiagen. Se realizó una ligación usando 600 ng del fragmento de 1779 nt y 400 ng del fragmento del vector pMB75.6_*Ascl* de 2463 nt en un volumen total de 20 µl, durante la noche a 16°C. A continuación, se dializaron 20 µl durante 2 horas contra 20 ml de H₂O en hielo, y después se mezclaron con 5 µl de células de *E. coli* DH5α electrocompetentes y 40 µl de H₂O (Invitrogen F-80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-

mk+) gal- phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1; Lote No. 1376481, parte no. de 44-0097). Después de la transformación y 1 h de regeneración en medio SOC, se sembraron las células en placas de LB sin kanamicina a una dilución 10^{-4} . Esta dilución permitió el aislamiento de clones individuales.

Se realizó una PCR de colonias en clones individuales usando los siguientes cebadores listados en la Tabla 1.

Tabla 1. cebadores de PCR

AH-13 rev	GTGCGCGGAACCCCTATTTG (SEQ ID NO: 5)
AH-22 for	GCGTACCCGCCGTTCTCATC (SEQ ID NO: 6)

Las ubicaciones de los cebadores AH-13 rev y AH-22 for se muestran en la FIG. 2. Se usó una premezcla que contienen Taq polimerasa. Se cargaron las reacciones de PCR en un gel de agarosa al 1% que contiene bromuro de etidio. Los clones positivos que portaban el plásmido correcto (pGCMB75.6) mostraron un producto de 606 pb.

Un total de más de 10.000 clones fueron seleccionados para identificar los tres clones positivos. Los tres clones positivos fueron transferidos inmediatamente a placas LB sin utilizar y se utilizaron para crear 3 Bancos de Células de Investigación (RCB; Sys 3733, Sys 3734 y Sys 3735).

En forma paralela, se inoculó medio con estos tres clones y se generó el ADN del plásmido. Se realizó la certificación de la secuencia completa de cada uno de los tres subclones usando los siguientes cebadores enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. PCR para la certificación de la secuencia

AH-12 for	GTCTGACGCTCAGTGGAAACG (SEQ ID NO: 7)
AH-13 rev	GTGCGCGGAACCCCTATTTG (SEQ ID NO: 5)
AH-15	GTTCCAGTTTGAACAAGAGTC (SEQ ID NO: 8)
AH-16	GGCAATTAGCCATATTAGTC (SEQ ID NO: 9)
AH-17	GCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG (SEQ ID NO: 10)
AH-18	GATCATAATCAGCCATACCAC (SEQ ID NO: 11)
AH-19	CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC (SEQ ID NO: 12)
AH-20	CCACAGGTGTCCACTCCCAGGTTC (SEQ ID NO: 13)
AH-21 rev	CTAGTCAAGGCACTATACATC (SEQ ID NO: 14)
AH-22 for	GCGTACCCGCCGTTCTCATC (SEQ ID NO: 6)
AH-23	TCCACAGAATCAGGGGATAACG (SEQ ID NO: 15)

Ejemplo 2: Generación del plásmido pLacZMB75.6.

Para generar el plásmido pLacZMB75.6 (FIG. 3; SEQ ID NO: 4.), se sintetizó un fragmento XhoI (CTCGAG) / DraI (TTTAAA) de 1307 nt por parte de Life Technologies GmbH (Darmstadt, Alemania). Este fragmento de 1307 nt contenía una porción del gen lacZ (265 nt). Por lo tanto, cuando se ligó en pGCMB75.6, este fragmento alarga el gen LacZ truncado localizado secuencia arriba del sitio de restricción XhoI y permite que el gen LacZ sea

expresado (compárese la FIG. 2 y la FIG. 3). Además, se intercambiaron 91 nt del sitio de clonación múltiple con la secuencia no codificante de *E. coli*, con el fin de eliminar la homología de secuencia con la región del gen LacZ recién introducido y evitar la recombinación. Además, se eliminó la región 5' del promotor de CMV (265 nt) con el fin de generar un plásmido del mismo tamaño que el plásmido pGCMB75.6.

pGCMB75.6 y el fragmento sintetizado de 1311 nt fueron ambos digeridos con XhoI y DraI. Ambos fragmentos fueron eluidos en gel a partir de un gel de agarosa al 1% usando el kit de extracción en gel QIAquick de Qiagen.

Se realizó una ligación usando 240 ng del fragmento de 1311 nt y 240 ng del fragmento de vector en un volumen total de 20 µl, durante la noche a 16°C. Se mezclaron 3 µl con 10 ml de células de *E. coli* DH5α electrocompetentes (Invitrogen F-f80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1; Lote no. 1376481, Parte no. 44-0097) y 40 ml de una solución de glicerina al 10%. Después de la transformación y 1 h de regeneración en medio SOC, se sembraron las células en placas LB X-gal / IPTG sin kanamicina a una dilución 10⁻² y 10⁻⁴. Esta dilución permitió el aislamiento de clones individuales.

La identificación de las colonias con el plásmido se realizó a través de la selección azul / blanco y PCR de colonias para confirmar utilizando los siguientes cebadores enlistados en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores de PCR para la confirmación de la colonia

AH-15	GTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTC (SEQ ID NO: 8)
AH-39	GCTCACTCATTAGGCACCCCAGG (SEQ ID NO: 16)

Los lugares de los cebadores AH-15 y AH-39 se muestran en la FIG. 3. Se utilizó una premezcla que contiene Taq polimerasa. Las reacciones de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% que contiene bromuro de etidio. Los clones positivos que portaban el plásmido correcto (pLacZMB75.6) mostraron un producto de 777 pb.

Se identificaron cuatro clones positivos y se transfieren inmediatamente a placas LB sin usar y se utilizaron para crear bancos de células de investigación (RCB; Sys 3736, Sys 3737, Sys 3738 y Sys 3739).

En paralelo, se inoculó medio con estos cuatro clones y se generó el ADN del plásmido. Se hizo la certificación de la secuencia completa de cada uno de los cuatro subclones usando los mismos cebadores que para pGCMB75.6 pero en lugar de utilizar el cebador AH-16 (SEQ ID NO: 10) se utilizó el cebador AH-24 (Véase la Tabla 4).

Tabla 4. Cebador de PCR para AH-24

AH-24	CGCGTAATACGACTCACTATAG (SEQ ID NO. 17)
-------	--

Ejemplo 3: Composición del inmunomodulador

El inmunomodulador es una composición que comprende un lípido catiónico y la secuencia de ADN no codificante descrita en este documento. Se formularon los componentes del lípido inmunomodulador sintético cloruro de [1-[2-[9-(Z)-octadecenoiloxi]-2-[8](Z)-heptadecenil]-3-[hidroxietil]imidazolinio (DOTIM) y un colesterol lípido neutro sintético para

producir liposomas de aproximadamente 200 nm de diámetro (véase, la patente de los Estados Unidos No. 6.693.086). El componente de ADN es pGCMB75.6 o pLacZMB75.6. Estando negativamente cargado, el ADN del plásmido asociado con los liposomas cargados positivamente (catiónicos) (véase, la patente de los Estados Unidos No. 6.693.086).

Ejemplo 4: Administración de la composición de inmunomodulador al modelo de mamífero de mayor supervivencia en la exposición al virus.

La eficacia de las composiciones inmunomoduladoras descritas en este documento se evaluó en un modelo de mamífero retado con patógenos. A los ratones se les administró la composición inmunomoduladora, que contenía ADN de pGCMB75.6 y liposomas catiónicos, a través de inyección intraperitoneal. Se administró la composición inmunomoduladora en concentraciones de 0,01 µg, 0,02 µg, 0,04 mg, y 1,00 µg. A los ratones de control se les administró solución de NaCl al 0,9% mediante inyección intraperitoneal. Veinticuatro horas después de la administración de inmunomodulador, todos los animales fueron retados con aplicación viral a través de inyección intraperitoneal (0,2 ml $10^{3,4}$ KID₅₀/ml). El virus del reto era pseudorrabia (PR). Las tasas de supervivencia se representan en la FIG. 4. Los ratones que recibieron una composición inmunomoduladora descrita en este documento tuvieron tasas de supervivencia mayores dependiendo de la dosis que los ratones de control.

Ejemplo 5: Administración de composición inmunomoduladora a un modelo aviar aumentó de capacidad de eclosión y de supervivencia con la exposición al patógeno.

La eficacia de las composiciones inmunomoduladoras descritas en este documento se evaluó en un modelo aviar expuesto al patógeno mediante aerosol el día E19 (día embrionario 19). Se administró a los huevos de gallina una composición inmunomoduladora, que contenía ADN de pGCMB75.6 y liposomas catiónicos, a través de la administración *in ovo* el día E18 (día embrionario 18). Los huevos de control recibieron un diluyente de control como placebo (D5W) (*in ovo*). Se usó caldo BHI (aerosol) como simulador de reto (T1). Los detalles de los grupos de tratamiento del estudio se proporcionan en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Descripciones del tratamiento con una composición inmunomoduladora aviar.

Grupo de tratamiento	Número de huevos en el estudio en E18 ¹	Administración in ovo (Día E18)	Descripción del reto por atomización (Día E19)	Número de pisos ²	Número de bandejas /bandejas menores ³ de eclosiones	Número de corrales ⁴
T1	896	Diluyente de control del placebo (D5W)	Caldo BHI (simulador)	56	7/14	14
T2	896	Diluyente de control del placebo (D5W)	APEC ⁵	56	7/14	14
T3	896	1,0 mcg JV-77/huevo	APEC ⁵	56	7/14	14
T4	896	0,1 mcg JV-77/huevo	APEC ⁵	56	7/14	14

T5	896	1,0 mcg Lote X5872/huevo	APEC ⁵	56	7/14	14
T6	896	0,1 mcg Lote X5972/huevo	APEC ⁵	56	7/14	14
T7	896	1,0 mcg Lote X5928/huevo	APEC ⁵	56	7/14	14
T8	896	0,1 mcg Lote X5928/huevo	APEC ⁵	56	7/14	14

¹ Día 18 de incubación de los huevos; ² 16 huevos por piso; ³ 64 huevos por bandeja menor (dividida para dar cabida a dos grupos por bandeja); ⁴ Los pollitos nacidos de cada sección de la bandeja se transfirieron a un corral; ⁵ Escherichia coli patógeno aviar (APEC).

- 5 El componente de ADN de la composición inmunomoduladora incluía uno de los tres clones aislados del ADN de pGCMB75.6 (es decir Jv77, X5872 o X5928). Como se puede observar a partir de los resultados resumidos en la Tabla 6 a continuación, tanto la capacidad de eclosión como la capacidad promedio de supervivencia se mejoraron cuando se administró una composición inmunomoduladora descrita en este documento en comparación con los
- 10 huevos que reciben tratamiento de control.

Tabla 6. Capacidad de eclosión y tasas de supervivencia de las aves*

Grupo de tratamiento	N	Mortalidad en la eclosión (promedio)	Mortalidad en la eclosión (Diferencia con el reto de control)	Mortalidad después de la eclosión (promedio)	Mortalidad después de la eclosión (Diferencia con el reto de control)	Mortalidad total (promedio)	Mortalidad total (Diferencia con el reto de control)
01-Control sin reto	14	12,5%		0,7%		13,2%	
02-Reto de control	14	22,5%		27,8%		43,5%	
03-Jv77: reto con 1,0 µg	14	20,2%	-2,3%	26,5%	-1,3%	40,6%	-2,9%
04-Jv77: reto con 0,1 µg	14	20,8%	-1,7%	22,4%	-5,4%	38,6% (p=0,0368)	-4,9%
05-X5872: reto con 1,0 µg	14	17,6% (p=0,0110)	-4,9%	22,1%	-5,7%	36,3% (p=0,0023)	-7,2%
06-X5872: reto con 0,1 µg	14	23,0%	0,5%	24,6%	-3,2%	42,0%	-1,5%
07-X5928: reto con 1,0 µg	14	15,5% (p=0,0003)	-7,0%	22,3%	-5,5%	33,9% (p<0,0001)	-9,6%
08-X5928: reto con 0,1 µg	14	21,2%	-1,3%	27,7%	-0,1%	43,0%	-0,5%

* Todas las pruebas de validación fueron superadas (comparación entre dos grupos de control). Diferencia significativa en comparación con el grupo de reto de control.

5 Cuando se introducen elementos de la presente invención o la(las) forma(s) de realización(es) preferida(s) de la misma, los artículos "un", "uno, una", "el, la" y "dicho(a)" pretenden significar que están presentes uno o más de los elementos. Los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" pretenden ser inclusivos y significan que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

En vista de lo anterior, se observará que se logran los diversos objetivos de la invención y se logran otros resultados ventajosos.

10 Ya que pueden hacerse diversos cambios en los anteriores productos, composiciones y métodos sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y mostrada en los dibujos adjuntos deberá interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitativo.

15