



TÍTULO DE PATENTE NO. 280094

Titular(es):	4LIFE RESEARCH, LC
Domicilio(s):	9850 South 300 West, Sandy, Utah, 84070, E.U.A.
Denominación:	FACTOR DE TRANSFERENCIA A PARTIR DE HUEVOS DE AVE
Clasificación:	Int.Cl.8: C07K1/00; C07K14/435; C07K14/47; C07K14/52
Inventor(es):	WILLIAM J. HENNEN; DAVID T. LISONBEE
Número: PA/a/2003/002541	SOLICITUD Fecha de presentación internacional: 21 de Septiembre de 2001
País: US	PRIORIDAD Fecha: 21 de septiembre de 2000 Número: 09/667,147
Vigencia: Veinte años	
Fecha de Vencimiento: 21 de septiembre de 2021	
LA VIGENCIA DE ESTA PATENTE ES IMPRORRROGABLE Y ESTÁ SUJETA AL PAGO DE LA TARIFA PARA MANTENER VIGENTES LOS DERECHOS.	

Fecha de expedición: 18 de octubre de 2010

EL DIRECTOR DIVISIONAL DE PATENTES


QUÍM. FABIAN R. SALAZAR GARCÍA

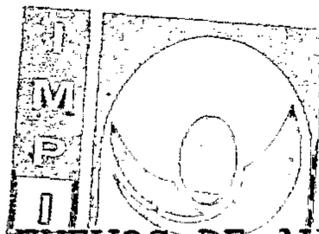


MX/2010/81640

280094
18-10-2010

2003
2541

1



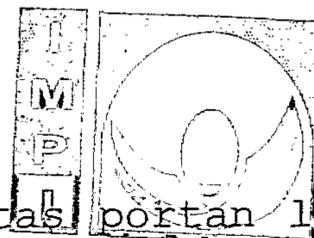
FACTOR DE TRANSFERENCIA A PARTIR DE HUEVOS DE AVE

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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



ratones portan el virus de Hanta, las ratas portan la Plaga Negra, y los ciervos portan la enfermedad de Lyme.

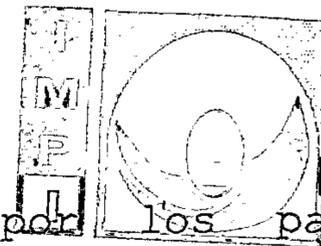
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

El Sistema Inmune

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

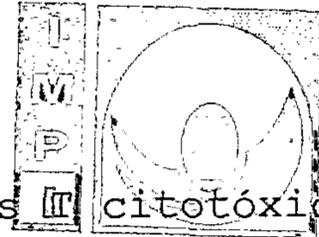
El componente celular de un sistema inmune incluye los así llamados linfocitos, o glóbulos blancos, de los cuales existen varios tipos. Es el componente celular de un sistema inmune maduro que monta típicamente una respuesta
15 primaria, no específica a patógenos invasores, al igual que implicarse en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

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



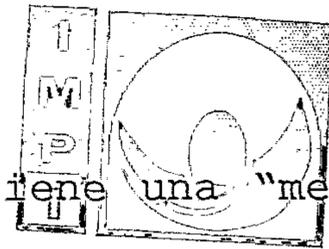
Solamente si una infección por los patógenos invasores continúa eludiendo, la respuesta inmune primaria es una respuesta inmune específica, secundaria a la necesidad del patógeno. Ya que esta respuesta inmune secundaria típicamente se retarda, se conoce también como "hipersensibilidad tipo retardada".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

Las células T son principalmente responsables por la respuesta inmune de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria en un patógeno o agente antígeno. Existen tres tipos de células T: las células auxiliares T, las células supresoras T y las células T de antígeno específico, las



cuales también se refieren como linfocitos citotóxicos (que significa "exterminio de células"), linfocitos T ("CTL"), o células asesinas T. Las células auxiliares T y supresoras T mientras no son específicas para ciertos antígenos, realizan las funciones de condicionamiento (por ejemplo, la inflamación que típicamente acompaña a una infección) que ayudan en la eliminación de patógenos o agentes antígenos de un huésped infectado.

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

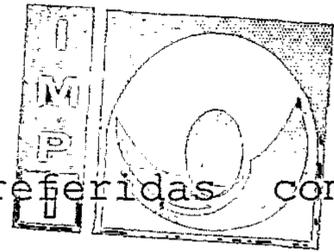


patógeno, el sistema inmune se dice que tiene una "memoria" para ese patógeno.

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

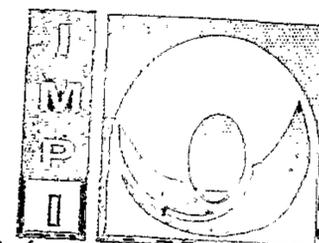
20 El Papel del Factor de Transferencia en el Sistema Inmune

El factor de transferencia es un aislamiento de bajo peso molecular de linfocitos. Estrechamente, los factores de transferencia pueden tener especificidad para antígenos sencillos. Las Patentes Norteamericanas 5,840,700 y 25 5,470,835, de las cuales ambas expedidas a Kirkpatrick et al.



(de aquí en adelante colectivamente referidas como las patentes de "Kirkpatrick"), describen el aislamiento de los factores de transferencia que son específicos para ciertos antígenos. Más ampliamente, los factores de transferencia "específicos" se han generado a partir de cultivos celulares de linfocitos monoclonales. Aún si estos factores de transferencia se generan contra un solo patógeno, tienen especificidad para una variedad de sitios antígenos de ese patógeno. De este modo, estos factores de transferencia se dice que son "patógeno específico" en lugar de antígeno específico. Similarmente, los factores de transferencia que se obtienen de un huésped que se ha infectado con un cierto patógeno, son patógenos específicos. Aunque tales preparaciones con frecuencia se refieren en la técnica como siendo "antígeno específico" debido a su capacidad de producir una respuesta inmune secundaria cuando está presente un antígeno particular, los factores de transferencia que tienen diferentes especificidades también pueden estar presentes. De este modo, aún las preparaciones de factor de transferencia patógeno específico así llamado "antígeno específico" pueden ser específicas para una variedad de antígenos.

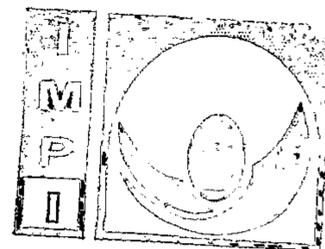
Adicionalmente, se cree que los factores de transferencia de antígeno específico y patógeno específico pueden provocar que un huésped produzca una respuesta inmune



de hipersensibilidad tipo retardada a patógenos o antígenos por los cuales las moléculas del factor de transferencia no son específicas. El factor de transferencia "entra" por lo menos las células T no específicas, las células inductoras T y supresoras T, para un patógeno infeccioso o agente antígeno para facilitar una respuesta inmune de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria al patógeno infeccioso o agente antígeno.

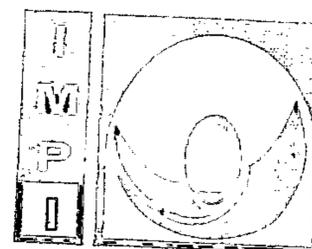
Típicamente, el factor de transferencia incluye un aislamiento de proteínas obtenidas a partir de fuentes de mamíferos inmunológicamente activas y que tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 10,000 daltones (D). Se conoce que cuando el factor de transferencia, cuando se agrega *in vitro*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

Los sistemas inmunes de recién nacidos típicamente no han desarrollado, o "madurado" lo suficiente para defender efectivamente al recién nacido de patógenos invasores. Además, antes del nacimiento, muchos mamíferos son protegidos contra un amplio rango de patógenos por sus madres. De este modo, muchos mamíferos recién nacidos no pueden producir inmediatamente una respuesta secundaria a una variedad de patógenos. Más bien, los mamíferos recién nacidos típicamente se les da inmunidad secundaria contra patógenos por sus



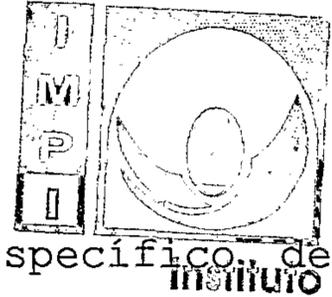
madres. Una forma en la cual las madres se dan ^{donde} que refuerzan los sistemas inmunes de los recién nacidos, es al proporcionar al recién nacido con un conjunto de factores de transferencia. En mamíferos, el factor de transferencia se proporciona por una madre a un recién nacido en el calostro, el cual típicamente se restituye por la leche de la madre después de un día o dos. El factor de transferencia básicamente transfiere la inmunidad específica adquirida de la madre al recién nacido (es decir, la hipersensibilidad tipo retardada). Esta inmunidad transferida típicamente condiciona las células del sistema inmune del recién nacido para reaccionar contra patógenos en una forma de antígeno específico, así como en una forma de antígeno o patógeno no específico, hasta que el sistema inmune del recién nacido es capaz por sí mismo de defender al recién nacido contra los patógenos. De este modo, cuando el factor de transferencia está presente, el sistema inmune del recién nacido se condiciona para reaccionar contra patógenos con una respuesta hipersensible, tal como aquella que ocurre con una respuesta de hipersensibilidad tipo retardada típica. Por consiguiente, el factor de transferencia se dice que "inicia de salto" la capacidad de respuesta de los sistemas inmunes a los patógenos.

Gran parte de la investigación que implica el factor de transferencia se ha llevado a cabo en años



recientes. Actualmente, se cree que el factor de transferencia es una proteína con un peso molecular de aproximadamente cuarenta y cuatro (44) aminoácidos. El factor de transferencia se cree que tiene un peso molecular en el margen de aproximadamente 4,000 a aproximadamente 5,000 daltones (D), o aproximadamente 4kD a aproximadamente 5 kD. El factor de transferencia se cree también que incluye tres fracciones funcionales: una fracción inductora; una fracción supresora inmune; y una fracción de antígeno específico. Muchos en la técnica creen que el factor de transferencia también incluye una porción nucleósida, que puede conectarse a la molécula proteínica o separarse de la misma, que puede mejorar la capacidad del factor de transferencia para provocar que un sistema inmune de mamífero produzca una respuesta inmune secundaria. La porción nucleósida puede ser parte de las fracciones inductoras o supresoras del factor de transferencia.

La región de antígeno específico de los factores de transferencia de antígeno específico se cree que comprende aproximadamente ocho (8) a aproximadamente doce (12) aminoácidos. Una segunda región altamente conservada de aproximadamente diez (10) aminoácidos se piensa que es una región de unión de receptor celular T de muy alta afinidad. Los aminoácidos restantes pueden servir para enlazar las dos regiones activas o pueden tener propiedades adicionales, aún

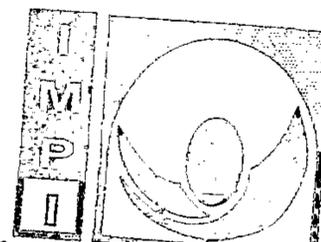


no descubiertas. La región de antígeno específico de una molécula de factor de transferencia, que es análoga a la estructura de antígeno específico conocida de los anticuerpos, pero a una escala de peso molecular mucho más bajo, parece que es hipervariable y se adapta para reconocer una proteína característica en uno o más patógenos. Las fracciones inductoras y supresoras inmunes se cree que imparten un factor de transferencia con su capacidad para condicionar las diversas células del sistema inmune para que las células sean más completamente sensibles al estímulo patógeno en su ambiente.

Fuentes de Componentes del Sistema Inmune no Celulares

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

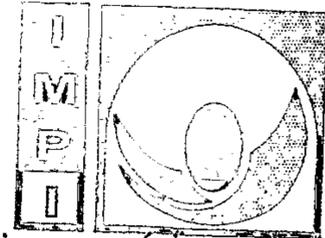
El factor de transferencia también se ha obtenido a partir de una amplia variedad de otras fuentes de mamíferos.



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

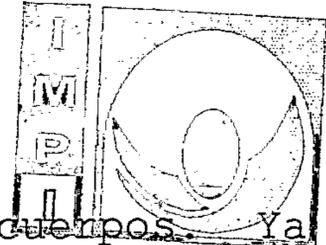
Mientras diferentes mecanismos se utilizan típicamente para generar la producción de anticuerpos, la fuente original para anticuerpos también puede ser los mamíferos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse al inyectar a un ratón, conejo u otro mamífero con un antígeno, obteniendo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

Los anticuerpos contra los patógenos de mamíferos se han obtenido a partir de una amplia variedad de fuentes, incluyendo ratones, conejos, cerdos, vacas, y otros mamíferos. Además, los patógenos que provocan ciertas enfermedades humanas, tales como el resfriado común, se conoce que se originan en aves. Ya que se ha reconocido que



los sistemas inmunes de las aves (es decir, pájaro) y los sistemas inmunes de mamíferos son muy similares, algunos investigadores se han dirigido a las aves como una fuente para generar anticuerpos.

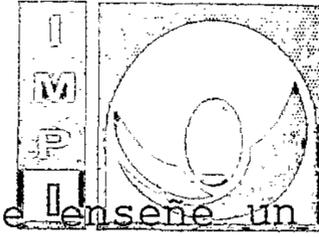
5 La Patente Norteamericana 5,080,895, expedida para Tokoro, el 14 de enero de 1992 (de aquí en adelante "la Patente '895"), describe un método que incluye inyectar a gallinas con patógenos que provocan enfermedades infecciosas intestinales en mamíferos neonatos. Las gallinas entonces
10 producen anticuerpos que son específicos para estos patógenos, los cuales están presentes en los huevos puestos por las gallinas. La Patente '895 describe composiciones que incluyen estos anticuerpos de patógeno específico y el uso de las mismas para tratar y evitar enfermedades intestinales en
15 lechones y terneros neonatos. Además, la Patente '895 asume que una sustancia similar al factor de transferencia de patógeno específico se pasa desde una gallina a sus huevos. No obstante, la Patente '895 no describe que tal sustancia similar al factor de transferencia de hecho estuvo presente
20 en los huevos, o que una composición libre de anticuerpos derivada de los huevos que se asumieron contenían esta sustancia similar al factor de transferencia realmente trató o evitó enfermedades intestinales en los mamíferos neonatos. De hecho, la Patente '895 describe el uso de un filtro con
25 orificios de aproximadamente 0.45 μm de diámetro para aislar



el factor de transferencia de los anticuerpos. Ya que aquellos con experiencia en la técnica están enterados sin embargo, los anticuerpos, moléculas más grandes, virus y aún algunas bacterias pasarán a través de los poros de un filtro de 0.45 μm . En realidad, no es probable que alguna de las moléculas proteínicas individuales que tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 12,000 D se separarán por tal filtro. Basándose en el tamaño del poro del filtro utilizado, sin embargo, es más probable que ninguna de las moléculas proteínicas individuales, incluyendo anticuerpos, se eliminaran por el filtro.

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

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

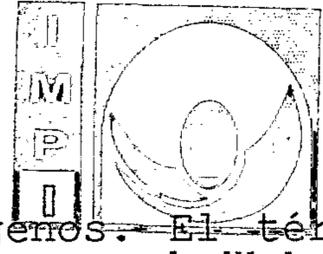


No se sabe de ninguna técnica que enseñe un método para generar el factor de transferencia en una fuente no mamífera, un método eficiente para obtener el factor de transferencia de tal fuente no mamífera, tal como una fuente de ave, un método para utilizar tal factor de transferencia para tratar o evitar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

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención incluye un método para generar la producción del factor de transferencia en una fuente no mamífera y obtener el factor de transferencia de una fuente no mamífera. Además, las composiciones que incluyen el factor de transferencia no mamífero también se encuentran dentro del alcance de la presente invención, ya que son métodos para utilizar estas composiciones.

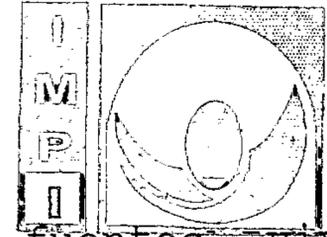
El factor de transferencia no mamífero generado, obtenido y utilizado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquiera de antígeno no específico o antígeno específico (es decir, configurado para enlazar o reconocer uno o más antígenos). A menos que se indique lo contrario, el término "factor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



para patógenos particulares o agentes antígenos. El término "no específico", como se utiliza en la presente a los factores de transferencia, se refiere a ambos factores de transferencia que no son específicos para antígenos particulares y a mezclas que incluyen factores de transferencia con diferentes especificidades de antígeno.

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

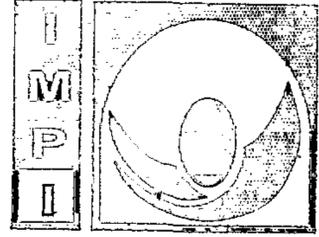
Por otro lado, el factor de transferencia de antígeno específico se genera por la exposición de una fuente animal no mamífera a uno o más antígenos. Los antígenos de varios tipos de patógenos, que incluyen, pero no se limitan a bacterias, virus, hongos y parásitos se ha encontrado por la invención que inducen la producción del factor de transferencia no específico en fuentes no mamíferas. El factor de transferencia de antígeno específico se ha generado por fuentes animales no mamíferas por ambos antígenos



naturales (incluyendo a partir de las fuentes vivas, inactivas, y atenuadas) y antígenos sintéticos.

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

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



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

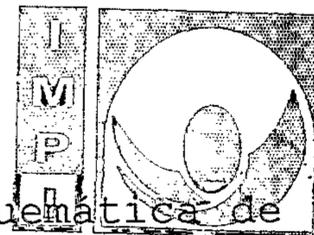
no mamífera.

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

Otras características y ventajas de la presente invención se volverán aparentes para aquellos expertos en la técnica a través de la consideración de la descripción seguida, los dibujos anexos y las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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



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

**Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial**

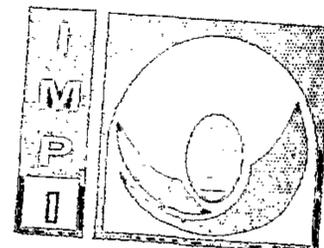
la Figura 2 es una representación esquemática de un método ejemplar para generar un factor de transferencia no mamífero directamente en los huevos de una fuente animal no mamífera;

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

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

MEJOR MODO O MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

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



ciertos patógenos, si la cría se infecta con estos patógenos.

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

Ya que algunos sistemas inmunes de aves portan algunas resemblanzas a los sistemas inmunes de los mamíferos, se cree que el factor de transferencia también es un componente de los sistemas inmunes de las aves, así como de los sistemas inmunes de otros vertebrados no mamíferos. Además, se cree que aunque las madres no mamíferas no proporcionan el calostro a sus crías recién nacidas, estos animales aún pueden transferir la inmunidad a sus crías por medio del factor de transferencia. En aves y otros vertebrados que ponen huevos, la oportunidad principal de la madre para proporcionar el factor de transferencia a sus crías es en la yema del huevo, que suministra al embrión que crece con los nutrientes necesarios durante el crecimiento.

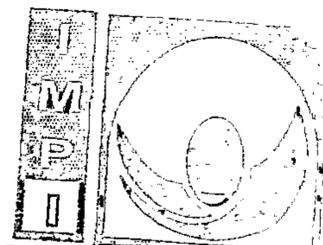


De este modo, se ha creído por mucho tiempo que el factor de transferencia de antígeno no específico y antígeno específico puede obtenerse a partir de huevos.

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

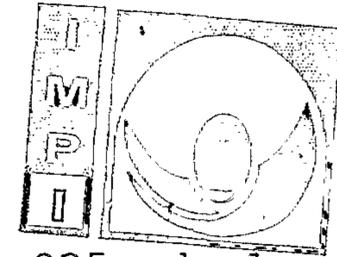
Alternativamente, con referencia a la Figura 2, un huevo 14' de un animal no mamífero puede exponerse directamente a uno o más agentes 12 antígenos, tales como por inyección o de otra manera, como se conoce en la técnica.

Con referencia a la Figura 3, después de que la fuente 10 no mamífera o los huevos 14' no mamíferos que se expusieron directamente a uno o más agentes 12 antígenos se les ha proporcionado una oportunidad adecuada para producir

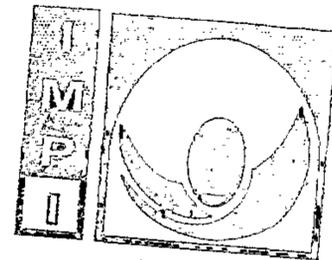


una respuesta inmune de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria a los agentes 12 antígenos, los huevos 14 se recolectan. Las yemas 16 y las claras 18 de los huevos 14 entonces se separan entre sí, y varios procesos de filtración se llevan a cabo sobre las yemas 16 para obtener una fracción 20 soluble en agua de las mismas que incluye el factor de transferencia. Las proteínas de peso molecular más grande, tales como anticuerpos, también pueden removerse de la fracción 20 soluble en agua de las yemas 16 mediante procesos conocidos, tales como por filtración sobre la base del peso molecular o al provocar que estas proteínas de peso molecular más grande se precipiten fuera de la solución (por ejemplo, en alcohol etílico frío), luego removiendo el precipitado 21 de la fracción 20 soluble en agua (por ejemplo, por filtración) para proporcionar una solución 22 que contiene el factor de transferencia, sustancialmente libre de anticuerpos,. Alternativamente, las yemas 16 y los huevos 18 no necesitan separarse.

Además, el factor de transferencia no mamífero de antígeno específico presente en la fracción 20 soluble en agua de las yemas 16 o en la solución 22 puede purificarse sustancialmente a partir de otros constituyentes de la fracción 20 soluble en agua o la solución 22 por técnicas conocidas, tal como mediante el uso de penetración por gel o técnicas de cromatografía de afinidad descritas en las



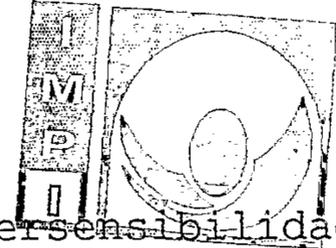
Patentes Norteamericanas 5,840,700 y 5,470,835, de las cuales
ambas expedidas a Kirkpatrick et al. (de aquí en adelante
referidas colectivamente como "las Patentes de Kirkpatrick"),
descripciones de las cuales ambas se incorporan en la
5 presente para esta referencia en sus totalidades. La técnica
descrita en las Patentes de Kirkpatrick se utiliza para
aislar las biomoléculas, tales como el factor de
transferencia y los anticuerpos, de los otros constituyentes
de una solución sobre la base de la especificidad de estas
10 biomoléculas para uno o más antígenos u otros agentes de
enlace específicos. De este modo, cuando la técnica descrita
en las Patentes de Kirkpatrick se utiliza en la fracción 20
soluble en agua que contiene el factor de transferencia y
anticuerpos de la yema 16 de huevo, tanto el factor de
15 transferencia como el anticuerpo pueden aislarse del resto de
la fracción 20 soluble en agua con la solución 24 resultante
incluyendo el anticuerpo y el factor de transferencia. Si,
por otro lado, la técnica descrita en las Patentes de
Kirkpatrick se lleva a cabo sobre una solución 22 que
20 contiene el factor de transferencia, sustancialmente libre de
anticuerpos, el producto será una solución 26 sustancialmente
pura del factor de transferencia específico para uno o más
antígenos. Desde luego, otros métodos para obtener el factor
de transferencia a partir de huevos también se encuentra
25 dentro del alcance de la presente invención, incluyendo



métodos para obtener el factor de transferencia a partir de varias preparaciones de huevo, incluyendo huevos enteros, en polvo o liofilizados o yemas de huevo.

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

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

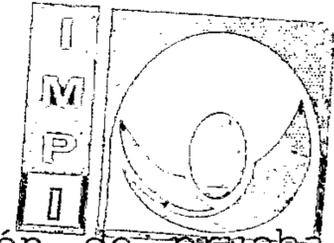


Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

permite generar su propia respuesta de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria al antígeno 36.

Aproximadamente veinticuatro (24) horas antes de la prueba de cojinetes de ratón, los ratones de una primera población de prueba, que también incluye seis ratones c/BALB hembras que tienen aproximadamente de nueve (9) a aproximadamente diez (10) semanas (es decir, aproximadamente la misma edad que los ratones de la población de control positiva), también se anestesian con isoflurano.

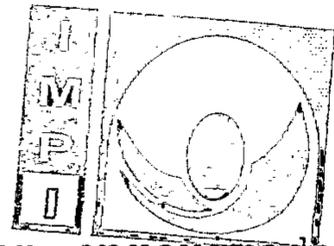
Aproximadamente 0.5 ml de una solución 20, 24 que incluye una preparación que contiene el factor de transferencia de aves y el anticuerpo de aves, reconstituida en agua destilada, entonces se administra por inyección subcutánea en la parte posterior del cuello 40 de cada ratón 30 de la primera población de prueba. Al comparar los resultados obtenidos de estos ratones con los resultados obtenidos de los ratones de una segunda población de prueba que se había tratado con una preparación sustancialmente libre de anticuerpos, puede determinarse las contribuciones relativas del factor de transferencia y el anticuerpo para la tumefacción. Ya que los anticuerpos no producen una respuesta inmune secundaria, se creyó antes de llevar a cabo los experimentos descritos en la presente que la medida de la respuesta inmune secundaria en la primera y segunda poblaciones de prueba de los ratones podría ser muy similar.



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

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

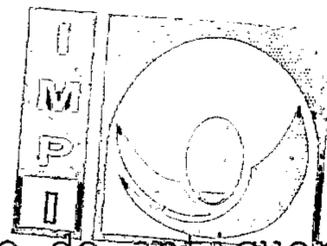
Para poder llevar a cabo el ensayo de cojinetes de ratón, los ratones de cada una de las cuatro poblaciones se anestesian y se miden las distancias a través de cada cojinete trasero derecho más grande y el cojinete trasero izquierdo más grande de cada ratón, tal como con un calibre de Starrett. El cojinete trasero derecho entonces se inyecta subcutáneamente con una solución que contiene el antígeno. El cojinete trasero izquierdo, el



cual se utiliza como control, se inyecta con aproximadamente el mismo volumen de un solución 37 de control como un diluyente de solución salina estéril, como el volumen de solución que se inyecta en el cojinete 32 trasero derecho.

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

15 Desde luego, diferentes soluciones 24, 26 que incluyen los factores de transferencia con especificidades para diferentes antígenos pueden probarse en diferentes pruebas de ratones para detectar cualquier diferencia en las capacidades de estas soluciones para transferir la inmunidad
20 de hipersensibilidad tipo retardada a los ratones. Además, los resultados para cada solución pueden compararse con aquellos obtenidos a partir de las poblaciones de control positiva y de control negativa de los ratones 30. Si se presenta una tumefacción significativa en los cojinetes 34
25 traseros derechos de los ratones 30 a los cuales se



administró una solución sustancialmente libre de anticuerpos, tal como la solución 22 o la solución 23 de la Figura 3, la hipersensibilidad tipo retardada que provoca tal reacción se atribuye al factor de transferencia administrado.

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

10

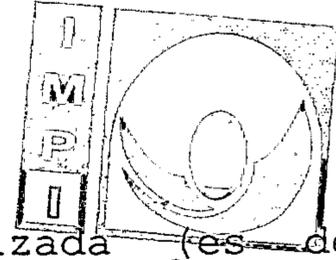
EJEMPLO 1

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

20

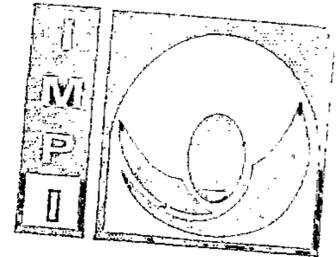
EJEMPLO 2

Las yemas de una primera prueba de los huevos que contienen el factor de transferencia de antígeno específico generados en el EJEMPLO 1 se separaron de las claras, 25 diluidas aproximadamente seis (6), a aproximadamente nueve



(9) veces en volumen, en agua desionizada (es decir, aproximadamente una (1) parte de la clara de huevo mezclada con aproximadamente cinco (5) partes de agua a aproximadamente ocho (8) partes de agua) y se congelaron. La 5 capa de lípido de estas yemas de huevo congeladas se separó mecánicamente de la fracción soluble en agua de las yemas de huevo. Esta fracción soluble en agua entonces se dejó deshelar a temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 6°C y el vacío se filtró mediante el uso de 10 un papel de filtro cualitativo de Whatman utilizando un embudo de Büchner de porcelana de 55 mm de diámetro. La filtración entonces se filtró al vacío a través de un filtro de microfibra de vidrio, nuevamente utilizando un embudo de Büchner de 55 mm de diámetro.

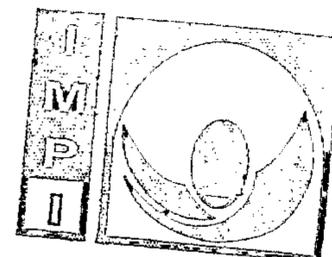
15 Una tercera filtración entonces se llevó a cabo para recolectar las proteínas y para remover los lípidos y lipoproteínas de la solución. La tercera filtración se efectuó por medio de una membrana hidrofílica de DURAPORE. La fracción que contenía la proteína, que incluyó tanto al 20 factor de transferencia como el anticuerpo específico para el patógeno de bronquitis infecciosa y el virus de Newcastle se recolectó, congeló y liofilizó, o se secó para luego congelar, como se conoce en la técnica.



EJEMPLO 3

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

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



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

EJEMPLO 4

Cada ratón de una población de prueba que incluyó tres ratones c/BALB, cada uno teniendo una edad en el margen de aproximadamente nueve (9) a aproximadamente diez (10) semanas, se probó para determinar si el factor de transferencia de aves específico-IBNV podría impartir una respuesta inmune, de hipersensibilidad tipo retardada o secundaria temprana a los ratones. Cada ratón se anestesió con isoflurano. Las distancias a través de los cojinetes más largos de ambas patas traseras izquierda y derecha de cada ratón entonces se midieron con un calibre de Starrett. A cada ratón entonces se le dio una inyección subcutánea en la parte posterior del cuello de aproximadamente 0.5 ml de una solución que incluyó aproximadamente 16% en peso del factor



de transferencia de aves específico-IBNV reconstituida en agua destilada.

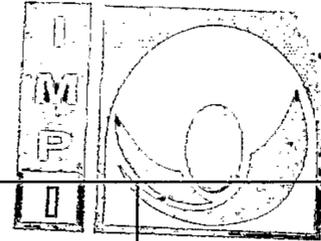
Después de aproximadamente veinticuatro (24) horas, cada uno de los ratones nuevamente se anestesió con isoflurano. Aproximadamente 0.01 ml de un diluyente de solución salina estéril entonces se inyectó en el cojinete más largo de la pata trasera del ratón, cuyo cojinete sirvió como control, mientras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

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

TABLA 1

Virus de Newcastle-Población de Prueba

Tamaño del cojinete (μm):			
	Antes de la Inyección de Prueba	Final	Diferencia
Ratón #1			

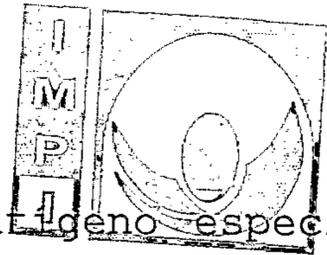


Pata izquierda (Control)	2150		
Pata derecha (Prueba)	2151		
Ratón #2			
Pata izquierda (Control)	2180	2350	50
Pata derecha (Prueba)	2165	2440	85
Ratón #3			
Pata izquierda (Control)	2145	2160	15
Pata derecha (Prueba)	2110	2200	90

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

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

La efectividad de cada uno de estos diversos tipos



de factores de transferencia de aves de antígeno específico en inducir las respuestas inmunes de hipersensibilidad de tipo retardada o secundaria temprana en mamíferos, entonces se probó por medio de los ensayos de cojinetes de ratones. Cada

5 tipo de factor de transferencia de aves de antígeno específico se probó utilizando cuatro poblaciones diferentes de ratones, incluyendo una población de control positiva, una primera población de prueba, una segunda población de prueba, y una población de control negativa, las cuales se prepararon

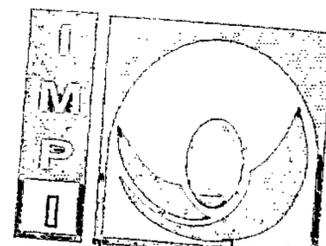
10 como se describe previamente en la presente con referencia a la Figura 4. El ensayo de cojinetes de ratón para cada tipo de factor de transferencia de antígeno específico se llevó a cabo de acuerdo con las enseñanzas de Petersen EA, Greenberg LE, Manzara T y Kirkpatrick CH, "Murine transfer factor", I. Description of the model and evidence for specificity, J. Immunol., 126: 2480-84 (1981), descripción de la cual se incorpora en la presente para esta referencia en su totalidad.

En cada ensayo de cojinete de ratón, cuatro

20 poblaciones de ratones se prepararon en la forma descrita en la referencia a la Figura 4.

Al llevar a cabo los diversos ensayos de cojinetes de ratones en cada una de las poblaciones de control positiva, de primera y segunda prueba, y de control negativa,

25 cada ratón se anestesió con isoflurano, el cojinete más largo



del cojinete trasero izquierdo de cada ratón, el cual sirvió como control, se inyectó con aproximadamente 0.01 ml de un diluyente de solución salina estéril, y el cojinete largo de la pata trasera derecha de cada ratón se inyectó con 5 aproximadamente 0.01 ml de una solución que incluye el antígeno o patógeno para el cual fue específico el factor de transferencia de aves.

Aproximadamente dieciséis (16) a aproximadamente veinticuatro (24) horas después de las inyecciones de 10 cojinetes traseros, cada uno de los ratones de las poblaciones de control positiva, prueba, y de control negativa se anestesió nuevamente con isoflurano y los tamaños de los cojinetes traseros izquierdo y derecho de cada uno de los ratones se midió nuevamente, por ejemplo, con un Calibre 15 de Starrett.

EJEMPLO 5

Al utilizar los mismos procedimientos descritos en los EJEMPLOS 1-3, el factor de transferencia de aves y los 20 anticuerpos de aves específicos para la vacuna de sarampión, paperas y rubéola (MMR) se generaron en gallinas. Cada gallina recibió una dosis de la vacuna de Merck MMR II, como se describe en el EJEMPLO 1 en 150 días, 163 días, 190 días, 221 días y 249 días. Los huevos se recolectaron de estas 25 gallinas justo después de la tercera inoculación - cierto