



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0607774-9 A2**



* B R P I O 6 0 7 7 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 16/02/2006
(43) Data da Publicação: 23/03/2010
(RPI 2046)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/02 (2010.01)
A61K 39/04 (2010.01)
A61K 39/00 (2010.01)
A01N 63/00 (2010.01)
A61K 38/00 (2010.01)

(54) Título: **USO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÃO PARA USO NA ESTIMULAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA MPT EM UM ANIMAL**

(30) Prioridade Unionista: 16/02/2005 US 60/653536

(73) Titular(es): CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.

(72) Inventor(es): Yung-Fu Chang

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006005509 de 16/02/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/089043 de 24/08/2006

(57) Resumo: USO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÃO PARA USO NA ESTIMULAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA MPT EM UM ANIMAL. A invenção fornece composições e método para estimular uma resposta imunológica contra *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MPT). As composições compreendem pelo menos cinco componentes imunogênicos recombinantes. Os componentes imunogênicos podem ser antígenos de MIPT ou polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT, ou combinações destes. Antígenos de MPT usados na invenção incluem MPT 85A, 85B, 85C, 35kDa, e superóxido dismutase (SOD), MptC, MptD e proteína ESAT-6. O método compreende administrar a composição a um animal em uma quantidade eficaz para estimular uma resposta imunológica contra bactérias MPT. O método é benéfico para qualquer animal susceptível à infecção por IVIPT, mas é particularmente benéfico para ruminantes.

“MÉTODO PARA ESTIMULAR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL, E, COMPOSIÇÃO PARA USO NA ESTIMULAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA MPT EM UM ANIMAL”

Este pedido reivindica prioridade para pedido de patente Norte-Americana provisório no. de série 60/653.536, depositado em 16 de Fevereiro de 2005, a descrição do qual é incorporada neste lugar em sua totalidade por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere geralmente à estimulação de respostas imunológicas, e mais especificamente a composições e métodos para estimular respostas imunológicas profiláticas ou e terapêuticas contra *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Mycobacterium avium subespécie *paratuberculosis* (MPT) é o agente causador de doença de Johne (JD), que causa enterite granulomatosa crônica em ruminantes. Animais clinicamente afetados desenvolvem diarreia crônica e perda de peso progressiva que eventualmente resulta em morte, enquanto animais subcl clinicamente infectados têm principalmente produção de leite diminuída. JD é de tremenda importância econômica para a indústria de laticínios no mundo inteiro, causando grandes perdas devido à produção reduzida e seleção precoce de animais com estimativas de 20% de rebanhos leiteiros norte-americanos afetados e custos de \$220 milhões por ano para a indústria de laticínios (Wells, et al. 2000. J. Am. Vet. Med. Assoc.216:1450-1457). Gados são mais susceptíveis a infecção com este organismo dentro dos primeiros 6 meses de vida, mas doença tipicamente não se torna evidente até 3 a 5 anos de idade. Infecção ocorre por ingestão de esterco, colostro, ou leite contaminado de vacas infectadas (Sweeney, 1996. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 12:305-312). Infecção fetal também ocorre, particularmente em vacas prenhes com doença avançada (Sweeney, et al. 1992. Am. J. Vet. Res.

53:477-480). Embora JD seja uma doença infecciosa importante de ruminantes, não existe vacina eficaz contra esta doença. A única vacina atualmente disponível nos Estados Unidos consiste de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* morta em um adjuvante oleoso (Kormendy, B. 1992. Acta Vet. Hung. 40:171-184; Larsen, et al., 1978. Am. J. Vet. Res. 39:65-69). Entretanto, tais programas de vacinação levantaram sérias preocupações com saúde pública. Por exemplo, pelo menos um veterinário foi acidentalmente inoculado na mão durante vacinação de animais (Patterson, et al., (1988) J. Am. Vet. Med. Assoc. 192:1197-1199). Ademais, estudos demonstraram que existe uma forte reação nos sítios de injeção depois de vacinação com estas bactérias mortas (Kormendy, B. 1992. Acta Vet. Hung. 40:171-184; Larsen, et al., 1978. Am. J. Vet. Res. 39:65-69). Outra desvantagem desta vacina é que os animais vacinados se tornam positivos em teste de pele de tuberculina (Kormendy, B. 1992. Acta Vet. Hung. 40:171-184; Larsen, et al., 1978. Am. J. Vet. Res. 39:65-69). Assim, existe uma necessidade do desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra JD que podem ser usadas como composições profiláticas e/ou terapêuticas seguras e eficazes para infecção por MPT.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece composições e métodos para estimular uma resposta imunológica em animais contra MPT. As composições compreendem componentes imunogênicos que podem ser antígenos de MPT ou polinucleotídeos codificando para antígenos de MPT, ou combinações destes. Em uma forma de realização, as composições compreendem pelo menos cinco componentes imunogênicos recombinantes. Antígenos de MPT exemplares incluem MPT 85A, 85B, 85C, 35kDa, superóxido dismutase (SOD), MptC, MptD e proteína tipo ESAT-6.

O método compreende administrar a composição a um animal em uma quantidade eficaz para estimular uma resposta imunológica contra bactérias MPT. O método é benéfico para qualquer animal susceptível à

infecção por MPT, mas é particularmente benéfico para ruminantes.

Composições compreendendo antígenos de proteína de MPT recombinantes, polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT, ou combinações destes podem ser formulados com carreadores farmacêuticos padrão e podem ser administrados através de qualquer das diversas vias convencionais. As composições podem ser administradas a qualquer momento a um animal susceptível a contrair infecção por MPT ou um animal que é infectado com MPT. Entretanto, é preferível administrar as composições da invenção antes de infecção por MPT, tal como por administração a animais prenhes que podem transferir componentes imunológicos profiláticos para seus recém-nascidos através de colostro, ou por administração durante o período de uma a cinco semanas depois de nascimento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 é uma representação gráfica de dados de análise de respostas proliferativas de células mononucleares de sangue periférico de vacas infectadas e saudáveis controle estimuladas *in vitro* com 5 proteínas recombinantes de MPT. Os resultados são expressos como um índice de estimulação e as barras de erro representam desvio padrão da média. Nenhuma proliferação significativa foi observada para qualquer antígeno por PBMCs de vacas não infectadas ($P > 0,05$). 85A e a proteína de 35-kDa mostraram atividade mais proliferativa em excretos fracos e médios, respectivamente.

Fig. 2. é uma representação gráfica de dados de análise de produção de interferon- γ em resposta a antígenos individuais em relação a níveis de excreção de MPT. Os resultados são dados como valores de O.D. em poços estimulados – valores de O.D. em poços controle (IFN- γ produzido naturalmente). Barras de erro representam desvios padrões das médias. 85A e 85B foram antígenos mais induzíveis a produzir IFN- γ em células

mononucleares de sangue periférico bovino de ambos excretores.

Fig. 3. é uma representação gráfica de dados de análise de respostas de anticorpo a antígenos individuais em relação a níveis de excreção de MPT. Barras representam os valores médios de O.D. em 405 nm. Barras de erro representam desvios padrões das médias. Todos os antígenos recombinantes mostraram aumentos de respostas de anticorpo de acordo com níveis de excreção e respostas de anticorpo para a proteína de 35-kDa foram positivamente separadas entre vacas saudáveis não infectadas e ambos excretores ($P < 0,01$).

Figs. 4A-4D são representações gráficas de dados de análise de mudanças em distribuição de subconjunto de célula T em linfócitos de sangue periférico bovino depois de estimulação com antígenos recombinantes, como determinado por análise FACS. Fig. 4A. CD4; Ag 85A e Ag 85B induziram uma maior proporção de linfócitos T CD4⁺ em excretores médios comparado com excretores fracos enquanto a porcentagem de linfócitos CD4⁺ não foi modificada em gado controle não infectado. Fig. 4B. CD8; Ag 85A aumentou a proporção de linfócitos T CD8⁺ em excretores médios, enquanto a porcentagem aumentada de linfócitos CD8⁺ foi muito baixa em gado não infectado. Fig. 4C. CD25; Ag 85A e Ag85B aumentaram a proporção de células T CD25⁺ em ambos os grupos de excretores enquanto eles tiveram pouco efeito em gado não infectado. Em contraste, Ag 85C e a proteína de 35-kDa aumentaram significativamente a proporção de células T CD25⁺ apenas nos excretores médios ($P < 0,05$). Fig. 4D. Células T $\gamma\epsilon^+$; todos os antígenos resultaram em aumentos significativamente menores em todos os subconjuntos celulares tanto nos grupos excretores fracos como médios exceto SOD para células T $\gamma\epsilon^+$ em excretores médios.

Fig. 5 é uma representação gráfica de dados de análise de mudanças diferenciais de linfócitos T CD3⁺ em resposta a estimulação com proteínas recombinantes e dois controles (ConA e PPD). Dados são expressos

como a média de células marcando positivo para CD3 (erro padrão 1 da média) em resposta a cada antígeno recombinante em relação ao nível de excreção.

Fig. 6 é uma representação gráfica de dados de análise de subconjuntos aumentos de linfócito B CD21⁺ em linfócitos de sangue periférico bovino depois de estimulação com antígenos recombinantes, como determinado por análise FACS. Os resultados são relatados como o aumento percentual médio em células marcando positivo e as barras de erro representam erro padrão 1 da média (SEM). Proteína de 35-kDa recombinante induziu o maior aumento em linfócitos B CD21⁺ em excretores médios. Nenhum aumento significativo na proporção de linfócitos B foi observado em resposta aos outros antígenos independente de níveis de excreção bacteriana ($P > 0,05$).

Fig. 7. é uma representação gráfica de dados de análise de perfis de IL-2 de PBMCs bovinos de gado não infectado, excretores fracos e médios depois de estimulação com antígenos recombinantes por 24 hrs. Resultados representam os aumentos de vezes médios de IL-4 sobre PBMCs não estimulados, que serviram como calibradores. Ags 85 A e B estimularam mais fortemente excretores médios enquanto a proteína de 35 kDa e SOD tiveram efeitos menores ($p < 0,05$).

Figs. 8A-8C são representações gráficas de dados de análise de comparação de perfis de mRNA de citocina para IFN- γ (Fig. 8A), IL-12p40 (Fig. 8B) e TNF- α (Fig. 8C) de PBMCs bovinos de gado não infectado, excretores fracos e médios depois de estimulação com antígenos recombinantes por 24 hrs. Resultados representam o aumento de vezes médio sobre PBMCs não estimulados, que serviram como calibradores. Os resultados são similares com Ags 85 A e B estimulando mais fortemente excretores médios enquanto a proteína de 35 kDa e SOD tiveram efeitos menores.

Fig. 9. é uma representação gráfica de dados de análise de perfis de mRNA de IL-4 de PBMCs bovinos de gado não infectado, excretores fracos e médios depois de estimulação com antígenos recombinantes por 24 hrs. Resultados representam os aumentos de vezes médios de IL-4 sobre PBMCs não estimulados, que serviram como calibradores. A proteína de 35-kDa estimulou fortemente expressão de mRNA de IL-4 em ambos excretores fracos e médios.

Fig. 10 é uma representação gráfica de recuperação bacteriana a partir de baço e fígado depois de administração das construções de DNA e controles indicados e subsequente desafio com MPT.

Fig. 11 é uma representação gráfica do número médio de granulomas em baço e fígado depois de administração das construções de DNA e controles indicados e subsequente desafio com MPT.

Figs. 12A e 12B são representações fotográficas de coloração de Ziehl-Neelsen de tecidos revelando numerosos bacilos álcool-ácido resistentes (Fig. 12A). Em contraste, a infecção foi muito menos severa nos camundongos vacinados com as construções de DNA de MPT codificando todos os cinco antígenos (Fig. 12B).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece composições e métodos para estimular uma resposta imunológica contra MPT em um animal. As composições compreendem polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT, antígenos de MPT, ou combinações destes. Em uma forma de realização, pelo menos cinco componentes imunogênicos são selecionados a partir de antígenos de MPT recombinantes e polinucleotídeos de DNA. O método compreende administrar a composição a um animal em uma quantidade eficaz para estimular uma resposta imunológica contra bactérias MPT.

Como usado neste lugar, um "componente imunológico" é um

componente da composição que pode diretamente ou indiretamente estimular uma resposta imunológica. Por conseguinte, quando introduzido em um animal, vetores de expressão compreendendo polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT entram nas células do animal e expressam antígenos de MPT. Os antígenos de MPT expressos um por um estimulam uma resposta imunológica. Assim, um polinucleotídeo de DNA codificando um antígeno de MPT é considerado um componente imunogênico que indiretamente estimula uma resposta imunológica. Em respeito de um antígeno de proteína de MPT administrado, uma vez que o antígeno é reconhecido diretamente pelo sistema imune, o antígeno é considerado um componente imunogênico que diretamente estimula uma resposta imunológica.

O método pode fornecer benefício a qualquer animal susceptível a infecção por MPT, onde infecção é considerada significando colonização da mucosa intestinal do animal por MPT. Entretanto, as composições e método são particularmente bem apropriados para profilaxia ou terapia para infecção por MPT de ruminantes, incluindo mas não limitados a gado, ovelha, cabras, veado e alce, antílope, e búfalo.

Assim, as composições podem ser administradas a qualquer animal infectado ou não infectado por MPT. Administração das composições a animais infectados de acordo com o método da invenção é considerada estimulando uma resposta imunológica terapêutica. Entretanto, é preferível administrar as composições antes de infecção por MPT para estimular uma resposta profilática. Por exemplo, as composições podem ser administração a um animal prenhe que pode transferir componentes imunológicos profiláticos aos seus recém-nascidos não infectados através de colostro. Alternativamente, as composições podem ser administradas durante o período de uma a cinco semanas depois de nascimento para fornecer um efeito profilático que pode prevenir infecção ou reduzir a severidade de doença se infecção ocorre.

Assim, em uma forma de realização, o método da invenção é profilático para infecção por MPT, enquanto em outra forma de realização, o método é terapêutico para infecção por MPT. O método também pode ser usado para profilaxia ou terapia de doença de Johne.

5 Antígenos de MPT apropriados para uso na invenção incluem mas não são limitados a proteínas de MPT 85A, 85B, 85C, 35kDa, SOD, MptC, MptD e proteína tipo ESAT-6. Antígenos de proteína de MPT recombinantes podem ser obtidos para uso na invenção por técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica, tal como por métodos de
10 clonagem recombinante convencionais. Procedimentos de clonagem de DNA apropriados e métodos para expressar e purificar proteínas recombinantes são conhecidos. (Veja, por exemplo, Sambrook et al.. 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY). Em geral, para obter antígenos de proteína de MPT recombinantes,
15 DNA genômico de MPT pode ser obtido a partir de uma cultura de MPT de acordo com métodos padrão, tal como pelo bem conhecido procedimento de lise alcalina.

O DNA codificando os antígenos pode ser amplificado, tal como pela reação em cadeia da polimerase, a partir do DNA genômico e os
20 produtos de amplificação podem ser clonados individualmente ou em várias combinações em um ou mais vetores de expressão apropriados. Células hospedeiras apropriadas podem ser transfectadas com o vetor de expressão e as células transfectadas podem ser cultivadas sob condições apropriadas para expressão dos antígenos. Os antígenos podem ser subsequente extraídos
25 e purificados da cultura de acordo com técnicas padrão.

Para administração a animais, antígenos de MPT recombinantes apropriadamente purificados podem ser combinados com carreadores farmacêuticos padrão. Carreadores farmacêuticos aceitáveis para uso com proteínas são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences

(18th Edition, A. R. Gennaro et al. Eds., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990). Ademais, os antígenos podem ser fornecidos em formulações lipossomais ou microssomais convencionais.

Composições compreendendo os antígenos de MPT para uso para estimular uma resposta imunológica podem ser administradas por qualquer via aceitável. Vias apropriadas de administração incluem oral, mucosal e parenteral (por exemplo, injeção intravascular, intramuscular, e subcutânea). Aqueles versados na técnica irão reconhecer que a quantidade de antígenos administrada a um animal particular irá depender de diversos fatores tal como a via de administração, e o tamanho, condição física e o estado de MPT do animal. As quantidades relativas de cada antígeno em uma formulação podem ser ajustadas de acordo com parâmetros conhecidos, tal como para fornecer equivalentes molares ou outras proporções dos antígenos. Ademais, as composições podem ser usadas em uma administração única ou em uma série de administrações para estimular a resposta imunológica aos antígenos de MPT. Em geral, uma dosagem total de entre 10-200 μg de proteína pode ser administrada. Quando DNA codificando antígenos de MPT é administrado, em geral, entre 30-500 μg de DNA podem ser administrados.

Em uma forma de realização, o método da invenção compreende administração de uma composição compreendendo pelo menos cinco antígenos de MPT recombinantes. Por exemplo, antígenos de MPT 85A, 85B, 85C, antígeno de 35 kDa e superóxido dismutase (SOD) podem ser administrados em uma formulação única. 85A, 85B e 85C são proteínas de ligação a fibronectina; as proteínas 35 Kda e SOD são proteínas de superfície exterior. A seqüência de DNA codificando o gene 85A de MTP e a seqüência de aminoácidos do gene 85A, é fornecida em no. de acesso de GenBank AF280067 (entrada em 10 de Outubro de 2003). A seqüência de DNA codificando o gene 85B de MTP e a seqüência de aminoácidos do gene 85A é fornecida em no. de acesso de GenBank AF219121 85B gene (entrada em 21

de Novembro de 2002). A seqüência de DNA codificando o gene 85C de MTP e a seqüência de aminoácidos do gene 85C é fornecida em no. de acesso de GenBank AF280068 (entrada em 21 de Novembro de 2002). A seqüência de DNA codificando o gene SOD de MTP e a seqüência de aminoácidos do gene SOD é fornecida em no. de acesso de GenBank AF180816 (entrada em 30 de Novembro de 2001). A seqüência de DNA codificando a proteína de 35 kDa é fornecida neste lugar como SEQ ID NO:1. A seqüência de aminoácidos da proteína de 35 kDa é fornecida neste lugar como SEQ ID NO:2. MPT adicionais incluem MptC, MptD e proteína tipo ESAT-6. A seqüência de DNA codificando a proteína MptC é fornecida neste lugar como SEQ ID NO:3. A seqüência de aminoácidos da proteína MptC é fornecida neste lugar como SEQ ID NO:4. A seqüência de DNA codificando da proteína tipo ESAT-6 é fornecida neste lugar como SEQ ID NO:5. A seqüência de aminoácidos da proteína tipo ESAT-6 é fornecida neste lugar como SEQ ID NO:6. A seqüência de DNA codificando a seqüência de MptD é fornecida neste lugar como SEQ ID NO:7. A seqüência de DNA codificando a seqüência de aminoácidos de MptD é fornecida neste lugar como SEQ ID NO:8.

As seqüências de DNA de iniciadores usados para amplificar DNA codificando os antígenos de MPT usados neste lugar a partir de DNA genômico de MPT DNA são fornecidas em Tabela 1.

Tabela 1.

Nome de gene/ iniciador	SEQ ID: NO	Seqüência de Iniciador (5'→ 3')	Comprimento de produto de DNA (bp)	No. de Acesso de produtos de amplificação ss e seqüência de aminoácidos de antígeno
85A pVR85AF pVR85AR	9 10	CGGGATCCATGATGACGCTTGTCGACA CGGGATCCTTAGGTGCCCTGG	1050	AF280067
85B pVR85BF pVR85BR	11 12	CGGGATCCATGACAGATCTG CGGGATCCTTATCCGCCGCC	1000	AF219121
85C pVR85CF pVR85CR	13 14	CGGGATCCATGTCGTTTCATCGAA CGGGATCCTCAGGTGGCGGGC	1100	AF280068

SOD				
pVRSODF	15	GGATCCTGGGACTATGCAGC	590	AF180816
pVRSODR	16	AGATCTTCAGCCGAAGATCAGGC		
35Kda (MAP2121c)				
pVR35KDF	17	GGATCCCCACTTGGTGATCT	910	
pVR35KDR	18	AGATCTTCACTTGTACTCATGGA		
MptC (MAP 3734)				
pVRMPTCF	19	GGATCCCGCGGTCGGCGT	1750	
pVRMPTCR	20	AGATCTTCATGGTCGAGGTGCCT		
MptD (MAP 3733)				
pVRMPTDF	21	GGATCCCGCCGCATCGAC	600	
pVRMPTDR	22	AGATCTTCAAGCTAGGCCGGC		
Tipo ESAT 6 (MAP0161)				
pVRESATF	23	GGATCCCCGGGCGCGGTG	270	
pVRESATR	24	AGATCTTCAGAACAGGCCG		

Em outra forma de realização, composições compreendendo polinucleotídeos de DNA que codificam cinco ou mais antígenos de MPT podem ser preparadas. Sequências codificando antígeno de MPT podem ser obtidas por amplificação de DNA genômico de MPT usando iniciadores apropriados e inserindo os produtos de amplificação em vetores de expressão da mesma maneira que descrito para preparação de proteínas de antígenos recombinantes.

Vetores de expressão apropriados contêm sinais eucarióticos apropriados de transcrição e tradução, e podem conter elementos adicionais, tal como sinais de poliadenilação e/ou de tráfego de proteína. Um exemplo de um vetor de expressão apropriado é pVR1020 (disponível a partir de Vical, Inc., San Diego, Calif.), que contém um promotor de citomegalovírus imediato-precoce para promover expressão eficiente em um hospedeiro eucariótico, assim como um sinal de secreção ativador de plasminogênio para facilitar secreção dos antígenos das células do hospedeiro eucariótico.

Será reconhecido por aqueles versados na técnica que um ou mais vetores de expressão distintos, como distinguidos um do outro pelos antígenos de APT que eles codificam e/ou por seus elementos reguladores ou outros, tal como sítios de policlonagem, serão usados no presente método. Assim, um único vetor de expressão codificando pelo menos cinco antígenos

de MPT, ou pelo menos cinco vetores de expressão codificando cada um diferente antígeno de MPT, ou combinações de vetores de expressão codificando cada pelo menos um antígeno de MPT, podem ser usados no presente método para entregar polinucleotídeos codificando pelo menos cinco antígenos de MPT.

Em uma forma de realização, seqüências de polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT 85A, 85B, 85C, SOD, MptC, MptD, 35kDa, e proteínas tipo ESAT6 podem ser fornecidas em vetores de expressão separados que podem ser usados para expressão e purificação de proteína e para administração em várias combinações a animais para estimular uma resposta imune.

Os vetores de expressão codificando os antígenos de MPT podem ser formulados em qualquer preparação farmacologicamente eficaz para administração aos animais. Tais formulações podem ser, por exemplo, uma solução salina tal como salina tamponada com fosfato (PBS). É preferido utilizar formulações farmacologicamente aceitáveis que também fornecem estabilidade a longo prazo do DNA. Assim, é preferível remover e/ou quelação de íons metálicos traço dos tampões de formulação ou de frascos e tampas nos quais o DNA é armazenado para estabilizar e proteger o DNA durante armazenamento. Em adição, inclusão de necrófagos de radical livre não redutor, tal como etanol ou glicerol, é útil para prevenir dano do DNA a partir de produção de radical livre que ainda pode ocorrer, mesmo em soluções aparentemente desmetalizadas. Ademais, o DNA pode ser fornecido em formulações lipossomais ou microssomais convencionais.

Não existe limitação para a via que os polinucleotídeos de DNA da invenção podem ser distribuídos, contanto que sua distribuição estimule uma resposta imunológica contra MPT nos animais receptores. Por conseguinte, os polinucleotídeos de DNA da presente invenção podem ser administrados ao animal por qualquer meio conhecido na técnica, tal como

vias enterais e parenterais. Estas vias de distribuição incluem mas não são limitadas a injeção intramuscular, injeção intraperitoneal, injeção intravenosa, e distribuição oral. Uma via preferida é intramuscular.

5 Em outra forma de realização, a composição da invenção compreende pelo menos cinco componentes imunogênicos que são fornecidos como uma combinação de antígenos de proteína de MPT e polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT. Tais composições podem ser obtidas combinando os antígenos de MPT recombinantes descritos neste lugar e os polinucleotídeos codificando proteínas de MPT descritos neste lugar. Neste
10 contexto, as seqüências de polinucleotídeos podem estar presentes em um ou mais vetores de expressão e os antígenos de MPT podem ser fornecidos como proteínas recombinantes. Composições compreendendo antígenos de MPT recombinantes e polinucleotídeos codificando antígenos de MPT podem ser combinadas com carreadores farmacêuticos convencionais e administradas
15 como descrito neste lugar e/ou de acordo com técnicas padrão. Preparações lipossomais ou microssomais convencionais dos antígenos de MPT recombinantes e polinucleotídeos codificando antígenos de MPT podem ser fornecidas. Ademais, e como será reconhecido por aqueles versados na técnica, quer ou não as composições compreendam apenas antígenos
20 recombinantes como os componentes imunogênicos, apenas polinucleotídeos de DNA como os componentes imunogênicos, ou combinações de antígenos recombinantes e polinucleotídeos de DNA codificando os antígenos recombinantes como os componentes imunogênicos, as composições da invenção podem compreender adicionalmente um adjuvante apropriado.

25 Assim, e sem pretender se ater a qualquer teoria particular, acredita-se que administração dos antígenos de MPT recombinantes, polinucleotídeos codificando antígenos recombinantes, e/ou combinações destes de acordo com o método da invenção estimule uma resposta imunológica que pode ser profilática ou terapêutica com respeito à infecção

por MPT.

Os exemplos seguintes descrevem as várias formas de realização desta invenção. Estes exemplos são ilustrativos e não são pretendidos para serem restritivos.

5

Exemplo 1

Este exemplo fornece uma comparação de efeitos de linfoproliferação distintos em resposta a estimulação com antígenos individuais.

Para examinar respostas linfoproliferativas, cinco antígenos de MPT recombinantes, 85A, 85B, 85C, antígeno de 35 kDa e superóxido dismutase (SOD), foram analisados para sua capacidade de obter respostas proliferativas em PBMCs obtidos de vacas com diferentes níveis de excreção de MPT. Para isto e outros Exemplos como indicado neste lugar, um total de 38 vacas Holstein, de 2 a 3 anos de idade, foram divididas em 3 grupos. Controles sadios (n=18) foram negativos para infecção por MPT como determinado por cultura fecal negativa e teste de PCR IS900 negativo. Os controles sadios vieram de uma fazenda que foi negativa para cultura fecal e PCR IS900 pelos últimos dez anos. Animais positivos foram subdivididos em excretores fracos (n=16) e excretores médios baseado no número de unidades formadoras de colônia (CFU)/grama de fezes (n=4). Excretores fracos são considerados animais com 1-30 CFU/grama de fezes. Excretores médios são considerados animais com entre 31-300 CFU/grama de fezes. Excretores fortes (>300 CFU/gm de fezes) foram indisponíveis uma vez que eles são selecionados imediatamente das fazendas uma vez que eles são identificados. Teste de culturas fecais e PCR IS900 para determinar estado de infecção por MPT foram realizados como previamente descrito (Shin et al, (2004) J. Vet. Diagn. Invest. 16:116-120).

Para uso em ensaios de linfoproliferação, antígenos recombinantes 85A, 85B, 85C, antígeno de 35 kDa e SOD foram clonados e

expressos usando técnicas padrão e como previamente descrito. (Dheenadhayalan et al., (2002) DNA Seq. 13:287-294; Shin et al., (2004) J. Vet. Sci. 5:111-117) e purificados como previamente descrito (Skeikyet al., (1998) J. Immunol. 161:6171-6179). Os antígenos usados nestes Exemplos
5 tiveram endotoxina (10 pg/ml) negligível em um ensaio de amebócito Limulus.

Para isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico bovino, sangue periférico (20 ml) de todas as vacas foi coletado da veia caudal com tubos a vácuo heparinizados. Isolamento de linfócitos de
10 sangue heparinizado foi realizado por centrifugação diferencial usando Histopaque 1.077 (Sigma). Vinte ml de sangue total heparinizado foi superposto sobre 15 ml de Histopaque em um tubo de polipropileno estéril de 50-ml (Falcon) e então centrifugados a 1000 X g por 30 min em temperatura ambiente. A camada de plasma foi descartada e a camada de célula
15 mononuclear foi cuidadosamente coletada e lavada três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2). Células sanguíneas vermelhas contaminantes foram lisadas com 0,87% de tampão amônio KCl invertendo por 2min em temperatura ambiente, então adicionando imediatamente 30 ml PBS.

20 Os grânulos celulares lavados foram suspensos em PBS e contados usando um hemacitômetro e azul tripano para determinar viabilidade percentual. Contagens celulares diferenciais consistentemente mostraram mais do que 96 % de linfócitos, 1 % de monócitos e menos do que 3 % de granulócitos na suspensão celular.

25 Os linfócitos foram ressuspensos a 2×10^6 /ml em RPMI 1640 contendo 10 % de FCS livre de endotoxina (Collect Gold; ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA), 2 mM de Lglutamina, 10 mM de HEPES, 100 IU/ml de Penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma) e 250ul foram adicionados ou a placas de fundo redondo ou placas

de fundo plano de 96 poços, dependendo dos propósitos do experimento.

Para investigar proliferação de linfócito em resposta a os antígenos individuais, um ensaio de blastogênese foi realizado. Resumidamente, PBMCs foram inicialmente incubados em uma microplaca de fundo plano de 96 poços por 3 dias a 37C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Culturas foram então estimuladas com Con A (10 µg/mL), derivado de proteína purificado (PPD) (cada controle positivo) (10 µg/mL) ou cada proteína recombinante purificada (10 µg/mL) e 40 µl (1,0 µCi) de metil-³H-timidina (PerkinElmer Life Science Inc, MA, USA) em meio de cultura foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas por um adicional de 18h nas mesmas condições, e as células foram então coletadas usando um coletor celular semi-automático (Skatronas Liter Norway). Atividade blastogênica foi registrada como contagens por minuto (cpm) de radioatividade baseada em contagem de cintilação líquida. Resultados foram expressos como índices de estimulação (SI) calculados como segue:

$$\text{SI (índice de estimulação)} = \frac{(\text{CPM de cultura positiva estimulada de antígeno}) - (\text{CPM de fundo})}{(\text{CPM de cultura controle ou Negativa}) - (\text{CPM de fundo})}$$

Para este e outros Exemplos neste lugar, análise estatística de dados foi realizada em Excel e pacote de aplicativo computacional GraPad Prism versão 2.0. Diferenças entre grupos individuais, antígenos e expressão gênica de citocina foram analisadas com o teste t de Student. Diferenças foram consideradas significantes se valores de probabilidade de $P < 0,05$ foram obtidos.

Como demonstrado em Fig. 1, atividades proliferativas de PBMCs bovinos de vacas excretoras médias foram maiores do que outros grupos em resposta a todas as proteínas recombinantes e dois controles positivos ($P < 0,05$) embora tenha havido variação entre vacas individuais. PBMCs de vacas excretoras médias tratadas com antígenos 85A, 85B e a proteína de 35-kDa demonstraram um índice de estimulação (SI) significativamente maior ($P < 0,005$) do que aquele de PBMCs tratados com

outros antígenos recombinantes. Em adição, respostas proliferativas à proteína de 35kDa em excretores fracos foram ainda maiores do que aquelas de excretores médios em resposta a 85C e SOD (Fig. 1). Assim, este Exemplo indica que os antígenos 85A, 85B e a proteína de 35-kDa podem ser importantes para afetar proliferação de linfócito em animais previamente expostos a MPT.

Exemplo 2

Este Exemplo demonstra os efeitos de antígenos recombinantes em produção de IFN- γ . Para analisar produção de IFN- γ , níveis de IFN- γ foram medidos em sobrenadantes de cultura usando um kit comercial específico para IFN- γ bovino seguindo as instruções do fabricante (Biosource Int. Camarillo, CA). As placas foram lidas em 450 nm em um leitor de ELISA Bio-Tek 312E (BioTEK Instruments, Inc, Winooski, VT 05404-0998), usando qualquer filtro de referência de 630 nm a 750 nm. Os resultados foram calculados baseados em comparação de densidade optica (O.D) de controle negativo e positivo. Resultados foram determinados como negativos (<OD de controle positivo) ou positivos (> OD de controle positivo) em relação ao valor de corte de acordo com as instruções do fabricante.

Produção de IFN- γ depois de estimulação com os cinco antígenos recombinantes ou dois controles positivos foi medida em PBMCs de vacas infectadas e não infectadas controle. Os resultados são apresentados em Fig. 2 como valores de OD corrigidos (OD de antígeno estimulado menos OD de controle) representando a elevação de produção de IFN- γ pelos vários antígenos.

Como pode ser visto a partir de Fig. 2, todos os antígenos recombinantes testados induziram liberação significativa de IFN- γ em culturas de PBMCs bovinos de gado infectado comparado com controles não infectados ($P < 0,05$), e níveis de IFN- γ foram consistentemente maiores em

excretadores médios do que em excretadores fracos ($P < 0,05$). Os antígenos recombinantes 85A e 85B induziram níveis significativamente maiores de IFN- γ nos excretadores fracos do que os outros antígenos recombinantes testados e se comparado com os dois controles positivos ($P < 0,05$). Assim, este Exemplo indica que os antígenos recombinantes 85A e 85B podem ser importantes para estimular uma resposta mediada por célula contra MPT.

Exemplo 3

Este exemplo fornece uma comparação de anticorpos em soros isolados de vacas não infectadas e infectadas que reconhecem os antígenos recombinantes da invenção.

Ensaio imunabsorvente ligado à enzima (ELISA) foram realizados para avaliar a sororeatividade dos antígenos recombinantes seguindo etapas como previamente descrito (Shin, et al., (2004) J. Vet. Sci. 5:111-117). Resumidamente, um ELISA indireto foi otimizado usando 2,5, 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada antígeno e soro diluído 1:100 por titulação em tabuleiro. Placas de 96 poços de fundo plano (Maxisorp, Nunc, Denmark) foram revertidas com 100 μL de cada antígeno em tampão carbonato-bicarbonato (14,2 mM de Na_2CO_3 , 34,9 mM de NaHCO_3 , 3,1 mM de NaN_3 , pH 9,5) a 4°C durante a noite, seguido por lavagem três vezes com PBS contendo 0,05 % de Tween 20 (PBST, tampão de lavagem) usando um lavar de placa de micropoços Bio-Tek ELx405 (BioTEK Instruments, Inc, Winooski, VT). Sítios não revestidos nos poços foram bloqueados com 5% de leite desnatado em PBST a 37 °C por 1 h. As placas foram lavadas duas vezes com PBST e 100 μL de IgG anti-bovino-HRP conjugados (Sigma) otimamente diluídos (1:25.000) foram adicionados a todos os poços e incubados a 37 °C por 1 h. As placas foram lavadas três vezes em PBST e 200 μL de 2- 2'-Azino-Bis-Tiazolína-6-Ácido sulfônico (Sigma) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 37°C no escuro. Depois de incubação de 30min, solução de parada (1M de HCl) foi adicionada e as placas foram lidas 3 vezes

em 405 nm em intervalos de 2 minutos em um leitor de ELISA Bio-Tek 312 (BioTEK Instruments, Inc, Winooski, VT 05404-0998). Soros positivos e negativos e controles de antígeno e anticorpo foram incluídos em cada placa.

Os resultados de medir níveis de anticorpos IgG para os antígenos recombinantes em soros tanto de grupos excretores como controles sadios são representados em Fig. 3. Embora tenha havido uma ampla variação em teor de anticorpo em soros de vacas individuais, as respostas de anticorpo IgG médias contra todos os antígenos recombinantes aumentou significativamente tanto nos grupos excretores fracos como médios. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis médios de anticorpo do grupo excretor fraco para qualquer dos antígenos testados (Fig. 3). Visivelmente, respostas de anticorpo para a proteína de 35-kDa foram significativamente maiores no grupo excretor médio do que aquelas para os outros antígenos ($P < 0,05$), o que pode ser importante pois a proteína de 35-kDa também é eficaz para estimular proliferação de linfócito, e assim pode estimular tanto repostas imunes mediadas por célula como humorais.

Exemplo 4

Este Exemplo demonstra mudanças em distribuição de subconjunto de linfócito em PBMCs obtidos a partir de vacas não infectadas, excretoras fracas e excretoras médias em resposta a estimulação com os antígenos recombinantes.

Para realizar esta análise, uma análise citométrica de fluxo de cor única foi realizada com anticorpos monoclonais contra marcadores de linfócito bovino (Tabela 2). Resumidamente, células foram lavadas três vezes em tampão FACS, incubadas com o primeiro

Tabela 2.

Anticorpo Monoclonal	Isotipo	Antígeno identificado	Referência Ab
IL-A11	IgG2a	CD4	(Brodersen, et al., 1998. Vet. Immunol. Immunopathol. 64:1-13)
CACT80C	IgG1	CD8 α	

MM1A	IgG1	CD3	(Davis, et al. 1989. Am. Fish. Soc. Symp. 7:521-540.)
BAQ15A	IgM	Células B CD21	(Rhodes, et al. 2001. J. Immunol. 166:5604-5610)
CACT116A	IgG1	CD25 (IL-2Ra)	(Mukwedeya, et al. 1993. Vet Immunol Immunopathol 39:177-186)
CACT63A	IgG1	células T yS	(Naessens et al. 1992. Immunology 76:305-309.) CACT63A(Davis, et al. 1996. Vet. Immunol. Immunopathol. 52:301-311)

anticorpo (Tabela 1) por 30min a 4 C, lavadas três vezes, subseqüentemente incubadas com um anticorpo imunoglobulina anti-camundongo de cavalo marcado com fluoresceína isotiocianato (Vetor) por 30 min a 4C, lavadas duas vezes, e coletadas em 200 µl de tampão fixador FACS antes de análise.

5 Análise foi feita em um citômetro de fluxo (FACSCalibur; Becton Dickson). Uma barreira elétrica de espalhamento direto-espalhamento lateral foi usada para medir 5.000 a 10.000 linfócitos por amostra. Baseado nos dados de fluorescência dos linfócitos, os resultados foram expressos como a porcentagem de células com coloração positiva em relação a uma amostra colorida com um anticorpo controle de isotipo irrelevante.

10 Como representado em Figs. 4A-4D, subconjuntos de célula T e/ou célula B estimulados por antígeno foram examinados por citômetro de fluxo de única cor para diferenças na porcentagem de subconjuntos de linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺ (CD3⁺ é representado em Fig. 5), CD21⁺ e CD25⁺, assim como células T em culturas de PBMC tanto de grupos excretores como controles sadios depois de estimulação com cada antígeno recombinante (Figs. 4 e 5). Todos os subconjuntos de linfócitos investigados neste estudo aumentaram mas, dependendo de níveis de excreção bacteriana, houve suaves diferenças (P<0,05) entre gado não infectado e excretores fracos de acordo com antígenos recombinantes.

20 CD3 é um marcador de célula T global que é expresso por células CD4⁺ e CD8⁺ assim como células T γσ⁺. A proporção de células T

CD25⁺ aumentou em cultura independente do antígeno recombinante usado ($P < 0,05$) (Fig. 4C). Estes resultados sugerem que todos os antígenos usados neste estudo são capazes de estimular células T sensibilizadas.

Embora todos os antígenos recombinantes testados tenham aumentado a proporção de células CD4⁺ em culturas de PBMCs bovinos de gado infectado comparado com controles não infectados ($P < 0,05$), 85A e 85B aumentaram a proporção de células T CD4⁺ para níveis significativamente maiores do que 85C, a proteína de 35-kDa, e SOD ($P < 0,05$) (Fig. 4A). A proporção de células T CD4⁺ também foi maior em culturas tratadas com 85A e 85B entre PBMCs de excretores médios do que de excretores fracos ($P < 0,05$) (Fig. 4A). Ademias, 85A e 85B não aumentaram células T CD4⁺ em gado não infectado. Embora não pretendendo se ater a qualquer teoria particular, estes resultados podem indicar que antígenos 85A e 85B induzem células T CD4⁺ especificamente sensibilizadas por MTP e fornecem imunidade protetora contra infecção por MTP mantendo populações circulantes de célula T CD4⁺ na fase infecciosa precoce, isto é, no momento em que colonização da mucosa por MPT está ocorrendo primeiro.

Em contraste ao aumento de células CD4⁺ induzido por todos os antígenos em relação a controles não infectados, um aumento significativo na proporção de células T CD8⁺ foi encontrado apenas em culturas tratadas com 85A, 85B, e 85C e a proporção de células CD8⁺ também foi maior em culturas tratadas com 85A e 85B entre PBMCs de excretores médios do que de excretores fracos ($P < 0,05$) (Fig. 4B). Assim, estes antígenos podem preferencialmente estimular respostas mediadas por célula.

Apenas SOD foi capaz de aumentar significativamente a proporção de células T $\gamma\sigma^+$ nas culturas de excretores médios ($P < 0,05$) (Fig. 4D). Entretanto, SOD estimulou linfócitos em um grau menor do que os outros antígenos testados, exceto para linfócitos T $\gamma\sigma^+$, pois o número de células T $\gamma\sigma^+$ foi significativamente maior em culturas de PBMC tratadas com

SOD em gado não infectado, assim como em ambos grupos excretadores (Fig. 4D). Assim, SOD pode preferencialmente estimular linfócitos T $\gamma\sigma^+$ comparado com os outros antígenos. Ademais, uma vez que células T $\gamma\sigma^+$ são numerosas em tecidos mucosais, que é o ponto de entrada para patógenos micobacterianos, o antígeno de SOD pode ser importante nos estágios anteriores de infecção através de sua estimulação preferencial de células T $\gamma\sigma^+$.

Todos os antígenos recombinantes testados aumentaram significativamente a proporção de células B CD21⁺ em culturas de PBMCs bovinos tanto de excretores fracos como médios comparado com controles não infectados ($P < 0,05$) (Fig. 6). Interessantemente, a proporção de células B CD21⁺ foi significativamente maior em culturas de PBMCs bovinos de excretores médios do que aquele dos outros antígenos recombinantes testados ($P < 0,05$).

Exemplo 5

Este exemplo fornece uma comparação de estimulação de produção de mRNA de citocina em PBMC's bovinos depois de estimulação com antígenos recombinantes.

Para preparação de RNA e tratamento com DNase I de células, grânulos celulares de PBMC foram obtidos e lavados duas vezes em 50 mL de salina tamponada com fosfato (PBS), pelotizados e 5×10^6 células foram lisadas com 350 μ L de tampão de lise de acordo com as recomendações do fabricante (RNeasy mini kit, Qiagen, CA) e mantidas a -80 C até extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA). RNA total (tRNA) foi extraído de células lisadas ou PMBCs usando o RNeasy mini kit (Qiagen). O tRNA extraído foi tratado com 10 U/ μ l de DNase I livre de RNase a 37 C por 10 min seguido por inativação térmica a 95 C por 5 min e então resfriado em gelo.

Para síntese de cDNA, transcrição reversa (RT) foi realizada

em um volume final de 20 μ L, contendo 1,6 μ L de RNA total, 200 U Superscript II RT (GibcoBRL), 50 mM de Tris-Hcl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 0,01 M de DTT, e 0,5 mM de dNTPs. A mistura de reação foi sujeita a 42 C por 50 min e inativada a 70 C por 15 min. O cDNA foi analisado imediatamente ou armazenado a -20 C até uso.

Para realizar quantitativo em tempo real (RT-PCR), aproximadamente 1 a 5 μ g de RNA total de cada grupo de tratamento foi transcrito reverso usando transcriptase reversa Superscript, Hexâmeros aleatórios, e reagentes de transcriptase reversa (Gibco BRL). Iniciadores e sondas de tempo real foram projetados por aplicativo computacional Primer Express (Applied Biosystems) usando as seqüências para GAPDH, citocinas e fatores de crescimento bovinos obtidos a partir de Genbank. As sondas internas foram marcadas com o corante repórter fluorescente 5-carboxifluoresceína (FAM) na extremidade 5' e o corante supressor N', N', N', N', N'-tetrametil-6-carboxiroadamina (TAMRA) na extremidade 3'. A mistura de PCR consistiu de 400 nM de iniciadores, 80 nM de sonda Taqman e PCR Mastermix comercialmente disponível (TaqMan Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems) contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de desoxinucleotídeo trifosfatos, 0,625 U de DNA polimerase AmpliTaq Gold por reação, 0,25 U de AmpErasw UNG por reação e 10 μ l da amostra diluída de cDNA em um volume final de 25 μ l. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e amplificadas em um fluorômetro automático (ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Condições de amplicon foram 2 min a 50C, 10 min a 95C, seguido por 40 ciclos a 95C por 15 s e 60C por 1 min. Quantificação final foi feita usando o método de limiar de ciclo comparativo (C_T) e é registrada como transcrição relativa ou a diferença de n-vezes em relação a um cDNA calibrador.

Como pode ser visto a partir de Fig. 7, todos os antígenos

recombinantes estimularam níveis superiores de mRNA de IL-2 de PBMCs de excretadores médios, com o complexo 85 de antígeno tendo um efeito maior do que ou a proteína de 35-kDa ou SOD ($P < 0,05$) (Fig. 7). 85A também induziu um nível maior de mRNA de IFN- γ , IL-12p40, e TNF- α (Fig. 8A, B, e C, respectivamente) em excretadores médios ($P < 0,05$). Visivelmente, PBMCs estimulados com o antígeno de proteína de 35-kDa expressaram altamente mRNA de IL-4 em ambos excretadores fracos e médios ($P < 0,05$) (Fig. 9). Esta indução de mRNA de IL-4 pela proteína de 35-kDa aumentou significativamente dependendo de níveis de excreção ($P < 0,001$). Em contraste, nenhuma diferença significativa foi observada entre os outros antígenos ($P > 0,05$). Estes estudos estão de acordo com os resultados apresentados em Exemplo 3 que indicam que respostas imunes para a proteína de 35-kDa proteína podem ser mais importantes no estágio tardio de doença uma vez que análise citométrica de fluxo mostrou que a proteína de 35-kDa induziu fortemente proliferação de linfócitos B, especialmente em excretadores médios (Fig. 3). Assim, este Exemplo demonstra que todos os antígenos recombinantes testados podem estimular uma resposta imunológica mediada por célula.

Exemplo 6

Este Exemplo demonstra o efeito de vacinar camundongos com polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT e subsequente desafio com MPT.

Para demonstração do efeito das construções de DNA, camundongos fêmeas C57/BL6 livres de patógenos específicos foram obtidos a partir do Harlan Sprague Dawley Inc (Indianapolis, IN). Os camundongos tinham semanas de idade no momento de vacinação. Existiram cinco grupos de camundongos e cada grupo de vacina consiste de 25 animais durante este experimento. Os animais foram alimentados com comida de camundongo comercial e água *ad libitum*, e mantidos em um ciclo de 12/12-horas luz/escuro.

O plasmídeo de expressão eucariótico disponível comercialmente pVR1020 (Vical, Inc., San Diego, Calif.) foi usado para a vacina de DNA. Este plasmídeo contém um promotor de citomegalovírus imediato-precoce para assegurar expressão eficiente em um hospedeiro eucariótico assim como o sinal de secreção de ativador de plasminogênio de tecido humano (hTPA) para facilitar secreção do antígeno alvo da célula eucariótica (Brandt, et al. 2000. *Infect. Immun.* 68:791-795). DNA codificando genes de MPT 85A, 85B, 85C, SOD, 35kDa, 35kDa(li), MptC, MptD, e tipo ESAT-6 foi amplificado por reação em cadeia da polimerase a partir de DNA genômico de MPT usando os iniciadores específicos para genes listados em Tabela 1. Resumidamente, os iniciadores usados para amplificação de seqüências de codificação de MPT 85A, 85B e 85C incluíram cada um sítio BamHI. Um iniciador para amplificação de seqüências de codificação de SOD, MptC, MptD, 35kDa, e tipo ESAT6 incluiu um sítio BamHI enquanto o outro inclui um sítio BglII. Os produtos de amplificação foram digeridos usando as enzimas de restrição indicadas e clonados no vetor de clonagem pCR2.1 TOPO disponível comercialmente (Invitrogen, CA) usando técnicas padrão. Os genes de MPT foram então subclonados depois do sinal de secreção de ativador de plasminogênio de tecido humano (hTPA) no plasmídeo pVR1020 (Vical, Inc., San Diego, Calif.) usando técnicas padrão e essencialmente como previamente descrito (Dheenadhayalan et al., (2002) *DNA Seq.* 13:287-294; Shin et al., (2004) *J. Vet. Sci.* 5:111-117) (Skeikyet al., (1998) *J. Immunol.* 161:6171-6179). Estas construções recombinantes foram transfectadas em células HEK-293 (rim embrionário humano) com reagente de transfecção usando lipofectaminaTM 2000 (Invitrogen, CA) e a expressão dos genes de antígeno foi confirmada no nível de transcrição usando RT-PCR.

Para imunização e desafio com MPT, camundongos foram divididas em cinco grupos diferentes (Tabela 3). Os animais foram administrados com 50 µg de cada DNA em 50 µl

Tabela 3.

Grupos	1	2	3	4	5
DNA Vacina	85A, 85B 85C, 35kDa e SOD	Grupo 1 + IL-12	MptC, MptD tipo ESAT61 e 35kDa(Li)	Grupo3 + IL-12	Vetor Controle (pVR1020)

PBS por dose através de injeção intramuscular. Camundongos foram imunizados três vezes em intervalos de 3 semanas. Genes de IL-12 foram adicionalmente injetados como indicado em Tabela 3. Três semanas depois dos segundo estimuladores, os animais foram desafiados por injeção intraperitoneal de 10^9 CFU unidades de (MPT). Seis animais em cada grupo foram sacrificados em 4th, 8th, 12th e 16th semana depois de desafio e a recuperação de bactérias a partir dos órgãos (fígado, baço, linfonodo mesentérico, pulmão) foi enumerada em ágar inclinado de gema de ovo de Herald (HEY) suplementado com Micobactina J e antibióticos como previamente descrito (Kamath, et al. *Infect. Immun.* 67:1702-1707). Depois de desafio, fezes também foram coletadas a cada semana das gaiolas dos camundongos e cultivados usando o mesmo ágar. Tecidos incluindo fígado, baço, pulmão, intestino e linfonodo mesentérico foram fixados por imersão em 10% em formalina tamponada e processados para verificação histopatológica usando técnicas de histotecnologia padrão. A presença de MPT (bactérias álcool-ácido resistentes) no fígado e baço de cada camundongo foi verificada por coloração de Ziehl-Neelsen.

Fig. 10 mostra a carga micobacteriana diminuída nos fígados e baços de camundongos vacinados em relação a controles em 4, 8 e 12 semanas após desafio e demonstra uma redução de aproximadamente 90% (1 log₁₀) na carga bacteriana nos baços e fígados para camundongos vacinados com o coquetel de vacina de DNA de MPT comparado com controles não imunizados. Os dados relativos de histopatologia de fígado e baço em 4, 8 e 12 semanas após desafio foram comparáveis aos resultados de crescimento bacteriano. Diferenças substantivas foram vistas em tecidos de fígado e baço tirados de animais imunizados com o coquetel de plasmídeo comparado com

camundongos não imunizados (Fig. 11). Controles não vacinados infectados com MPT tiveram numerosos granulomas aleatoriamente dispersos com macrófagos epitelióides centrais circundados por linfócitos pequenos. Coloração de ZiehlNeelsen revelou que numerosos bacilos álcool-ácido resistentes foram vistos (Fig. 12A e suplemento). Em contraste, a infecção foi muito menos severa nos camundongos vacinados com o coquetel de vacina de DNA de MPT (Fig. 12B).

Assim, este Exemplo demonstra que administração com um vetor de expressão de DNA codificando pelo menos cinco antígenos de MPT pode fornecer proteção significativa de infecção por MPT.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Chang, Y.F.

<120> COMPOSIÇÕES PARA OBTER UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA MYCOBACTERIUM AVIUM
SUBESPÉCIE PARATUBERCULOSIS

<130> 018617.00120

<140> PCT/US2006/005509

<141> 2006-02-16

<150> US 60/653,536

<151> 2005-02-16

<160> 24

<210> 1

<211> 828

<212> DNA

<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>

<223> Sequência codificando DNA de proteína de 35 kDa de MPT

<400> 1

atggccaatc cgttcgtcaa ggcgtggaag tacctgatgg cgaagttcaa cgccacgatc 60
gacgagcgcg ccgaccccaa ggtgcagatc caacaggcca tcgaggaagc ccagcgcacc 120
caccaggcgc tgaccagca ggccgctcag gtcctcggca accagcgcca actcgagatg 180
cggctcaacc gccagctcgc cgacgtggag aagctgcagg tcaacgtgcg tcaggcgctg 240
acgctggccg accaggccac cgccgcccgc gacaccgcca aggccaccga gtacaacaac 300
gccgcccagg cgttcgcgcg ccagctggtc accgcccagc aaagcgtcga agacctcaag 360
acgctgcacg accaggcgct caacgccgcc gcgcaggcca agaaggcggg cgagcagaac 420
gcgatggtgc tgcagcagaa gatcgcagag cgcaccaagc tgctcagcca gctcgaacag 480
gccaaagatg aggaacaggt cagcgcctca ctgcagtcga tgagcgagct ggccgcccc 540
ggcaacgtgc ccagcctgga cgaggtgccc gacaagatcg agcggcgcta cgccaacgcg 600
atcggggccg ccgaactggc acagggctcc gtgcagggca ggatgctcga ggtcgagcag 660
gccggcgtgc agatggccgg gcattcccgg ctcgagcaga tccgcccctc gatgcgggac 720
gaggcgttgc cgaccggagg cacaccggcc gccggcggca cccaggccgc ccccgcgccc 780
ggccagggcg ccggcgacgc ggtcagcgag aaaccacttg gtcagtag 828

<210> 2

<211> 275

<212> PRT

<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>

catctcgcca cgctgccaat cggctgggtc cgcaccgatc gcaccggacc gatcgggctg 360
 ctgctcagca aggggacccat ggacgtogcg gaccttcccg cgcacctgct gcggcatgtc 420
 atcgtgggtg tagccgcgcc tgccaccatg atcatcggaa gctatgtgct ggactggcgg 480
 gtcgggctcg cattcaccgc cggcgcgctg ctatgcgcac tgacgcttcg actactcatg 540
 gtcgtcatcc accgcaacga cgaccagtac gatcacgaca tcggagtgac cgcgtcacgc 600
 atcgtcgagt acgcccgtca gcagccgaca ctgcgtgcat acggcgtcct gaaccggccc 660
 ggactgggaa cgctagagga atcgcttgct cggcaacaga cttcgcagtc ccgcttgacc 720
 attcgcggcg cgtgggcgct catcggatctc ttcggaaccg tccaactggt ggtgaccgcc 780
 atcatcgcgc tcaccgtcgc tctcgcagta agcggcagcc ttgcgctttc gacgatggtc 840
 ggtttgctga tcatcacctt gcgcatgata gaccgattt ctcagctcgg cgatctcgcc 900
 ggccatgtcc aggtcaacgc cgacgccatc cgccgagtgc gtgaactggt gacgggtacc 960
 ccggtgcccg aaccaccca tccaggtcaa gccacgggtg ccgacatcga attgcagggg 1020
 gttcgtttcg cttacgacgg aggtcaacce accatcgatg gtatcgacgc cgtctttcca 1080
 caaggtagcc tgactgccgt cgtcggcccg tctggcgcgg gaaaaagcac gctgctcaaa 1140
 ctaatcgggc ggttcttga cgtcgcgaa ggcagcatca ccatcggcgg ctgcgacatc 1200
 cgccaactcg gcaccgccg cgtctcacat ctcacggcgc aagttttcca agacgtgtac 1260
 ctctttgaag gcacaattgc cgacaacctg cggatggccg atccgcaagc caccgatgat 1320
 gatctccgcc acgtcgccac gatcagtcgc ctgcagcagg tagtcgatcg ccttcccaat 1380
 ggggtgggaaa cccgcgttg tgaggcgggg tcgacgctgt ccggcgggga aaagcagcgt 1440
 gtctccatag cgcgcgcct gctcaaagac gcaccggtag tactgctgga cgaggcgacc 1500
 gcggcgcctg atgccgcaa tgagaccgcc gtttcgcgac ctatccacga actagcgcgt 1560
 gaccgcacag tcatcgttgt cgcacaccgc ctttcgaccg tggcggcgc cgatcagata 1620
 ctggtgctcg acggcggccg gatcaccgag cgtggccgcc acgacacact ggtgggtgcg 1680
 ggcggcacct acgcccgtt ctgggaagaa cgaactcgcg cgcgaggggt gcaactcgcg 1740
 caaattgcgc cactcctga actgcaggca cctcgaccat ga 1782

<210> 4

<211> 593

<212> PRT

<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>

<223> seqüência de aminoácido da proteína de MptC

<400> 4

Met Ser Thr Met Ile Arg Tyr Leu Leu Glu Leu Leu Asp Glu Arg

5

10

15

Gly	Arg	Arg	His	Leu	Arg	Val	Met	Leu	Ala	Leu	Gln	Ala	Ala	Gln
				20					25					30
Gly	Ile	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Phe	Leu	Phe	Val	Val	Pro	Leu	Met
				35					40					45
Gly	Val	Leu	Ile	His	Lys	Pro	Val	Asp	Thr	His	Ala	Leu	Trp	Cys
				50					55					60
Trp	Ile	Val	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Val	Val	Ala	His	His	Gly	Leu
				65					70					75
Leu	Ala	Trp	Ser	Thr	Ser	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Val
				80					85					90
Leu	Thr	Ser	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Gly	Asn	His	Leu	Ala	Thr	Leu
				95					100					105
Pro	Ile	Gly	Trp	Phe	Arg	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Pro	Ile	Gly	Arg
				110					115					120
Leu	Leu	Ser	Lys	Gly	Thr	Met	Asp	Val	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	His
				125					130					135
Leu	Leu	Arg	His	Val	Ile	Val	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ala	Thr	Met
				140					145					150
Ile	Ile	Gly	Ser	Tyr	Val	Leu	Asp	Trp	Arg	Val	Gly	Leu	Ala	Phe
				155					160					165
Thr	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Thr	Leu	Arg	Leu	Leu	Met
				170					175					180
Val	Val	Ile	His	Arg	Asn	Asp	Asp	Gln	Tyr	Asp	His	Asp	Ile	Gly
				185					190					195
Val	Thr	Ala	Ser	Arg	Ile	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gln	Pro	Thr
				200					205					210
Leu	Arg	Ala	Tyr	Gly	Val	Leu	Asn	Arg	Pro	Gly	Leu	Gly	Thr	Leu
				215					220					225
Glu	Glu	Ser	Leu	Val	Arg	Gln	Gln	Thr	Ser	Gln	Ser	Arg	Leu	Thr
				230					235					240
Ile	Arg	Gly	Ala	Trp	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Phe	Gly	Thr	Val	Gln
				245					250					255
Leu	Val	Val	Thr	Ala	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Val
				260					265					270
Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Thr	Met	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Ile
				275					280					285
Thr	Leu	Arg	Met	Ile	Asp	Pro	Ile	Ser	Gln	Leu	Gly	Asp	Leu	Ala
				290					295					300
Gly	His	Val	Gln	Val	Asn	Ala	Asp	Ala	Ile	Arg	Arg	Val	Arg	Glu
				305					310					315
Leu	Leu	Thr	Val	Pro	Pro	Leu	Pro	Glu	Pro	Thr	His	Pro	Gly	Gln
				320					325					330
Ala	Thr	Gly	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Gln	Gly	Val	Arg	Phe	Ala	Tyr
				335					340					345
Asp	Gly	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	Asp	Gly	Ile	Asp	Ala	Val	Phe	Pro
				350					355					360
Gln	Gly	Ser	Leu	Thr	Ala	Val	Val	Gly	Pro	Ser	Gly	Ala	Gly	Lys
				365					370					375
Ser	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu	Ile	Gly	Arg	Phe	Phe	Asp	Val	Asp	Glu
				380					385					390
Gly	Ser	Ile	Thr	Ile	Gly	Gly	Cys	Asp	Ile	Arg	Gln	Leu	Gly	Thr
				395					400					405
Ala	Gly	Val	Ser	His	Leu	Thr	Ala	Gln	Val	Phe	Gln	Asp	Val	Tyr
				410					415					420
Leu	Phe	Glu	Gly	Thr	Ile	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Met	Ala	Asp	Pro
				425					430					435
Gln	Ala	Thr	Asp	Asp	Asp	Leu	Arg	His	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg
				440					445					450
Leu	Asp	Glu	Val	Val	Asp	Arg	Leu	Pro	Asn	Gly	Trp	Glu	Thr	Arg
				455					460					465
Val	Gly	Glu	Ala	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Gly	Gly	Glu	Lys	Gln	Arg
				470					475					480
Val	Ser	Ile	Ala	Arg	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Pro	Val	Val	Leu

	485		490		495
Leu Asp Glu Ala	Thr Ala Ala Leu Asp	Ala Ala Asn Glu Thr	Ala		
	500		505		510
Val Ser Asp Ala	Ile His Glu Leu Ala	Arg Asp Arg Thr Val	Ile		
	515		520		525
Val Val Ala His	Arg Leu Ser Thr Val	Ala Ala Asp Gln	Ile		
	530		535		540
Leu Val Leu Asp	Gly Gly Arg Ile Thr	Glu Arg Gly Arg His	Asp		
	545		550		555
Thr Leu Val Gly	Ala Gly Gly Thr Tyr	Ala Arg Phe Trp Glu	Glu		
	560		565		570
Arg Thr Arg Ala	Arg Gly Trp Gln Leu	Arg Gln Ile Ala Pro	Thr		
	575		580		585
Pro Glu Leu Gln	Ala Pro Arg Pro				
	590				

<210> 5

<211> 288

<212> DNA

<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>

<223> DNA seqüência de DNA codificando a proteína tipo ESAT-6

<400> 5

atgtccgacc cgatcactta caaccgggc gcggtggccg acttcgccac cgacgtcgcc 60
 tcccgcgccg gccagttgca gtccattttc gacgacacct ccaaccgcat gcacgccttg 120
 caggaattct tcgccgggca cggcgcgtcg ggctttttcg aggcgcaggc ccagatgctg 180
 tccgggctgc aggggctcat cgacacgatc cgccagcacg ggcagaccac ctgcacgctg 240
 ctggacagcg cgatcagcac ggaccagcac atcgccggcc tgttctga 288

<210> 6

<211> 95

<212> PRT

<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>

<223> seqüência de aminoácidos da proteína tipo ESAT-6

<400> 6

Met Ser Asp Pro	Ile Thr Tyr Asn Pro	Gly Ala Val Ala Asp	Phe
	5	10	15
Ala Thr Asp Val	Ala Ser Arg Ala Gly	Gln Leu Gln Ser Ile	Phe
	20	25	30
Asp Asp Thr Ser	Asn Arg Thr His Ala	Leu Gln Glu Phe Phe	Ala
	35	40	45
Gly His Gly Ala	Ser Gly Phe Phe Glu	Ala Gln Ala Gln Met	Leu
	50	55	60
Ser Gly Leu Gln	Gly Leu Ile Asp Thr	Ile Arg Gln His Gly	Gln
	65	70	75
Thr Thr Ser His	Val Leu Asp Ser Ala	Ile Ser Thr Asp Gln	His
	80	85	90
Ile Ala Gly Leu	Phe		
	95		

Glu	Met	Glu	Arg	Leu	Leu	Ser	Pro	Ala	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Asp
				170					175					180
Leu	Ser	Thr	Val	Val	Phe	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Val
				185					190					195
Arg	Leu	Leu	Arg	Lys	His	Phe	Gln	Arg	Ala	Gly	Leu	Ala		
				200					205					

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
 <223> iniciador direto de 85A

<400> 9
 cgggatccat gatgacgctt gtcgaca 27

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
 <223> iniciador reverso de 85A

<400> 10
 cgggatcctt aggtgccctg g 21

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
 <223> iniciador direto de 85B

<400> 11
 cgggatccat gacagatctg 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
 <223> iniciador reverso de 85B

<400> 12
 cgggatcctt atccgccc 20

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
 <223> iniciador direto de 85C

<400> 13
 cgggatccat gtcgttcac gaa 23

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> iniciador reverso de 85C

<400> 14
cgggatcctc aggtggcggg c 21

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador direto de SOD

<400> 15
ggatcctggg actatgcagc 20

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador reverso de SOD

<400> 16
agatcttcag ccgaagatca ggc 23

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> iniciador direto de 35 kDa

<400> 17
ggatccccac ttggtgatct 20

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador reverso de SOD

<400> 18
agatcttcac ttgtactcat ggaact 26

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador direto de MptC

<400> 19
ggatcccgcg gtcggcgt 18

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador reverso de MptC

<400> 20
agatcttcat ggtcgagggtg cct 23

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador direto de MptD

<400> 21
ggatcccgcc gcatcgac 18

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador reverso de MptD

<400> 22
agatcttcaa gctaggccgg c 21

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador direto de tipo ESAT-6

<400> 23
ggatccccgg gcgcggtg 18

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis

<220>
<223> Iniciador reverso de tipo ESAT-6

<400> 24
agatcttcag aacaggccg 19

REIVINDICAÇÕES

1. Método para estimular uma resposta imune em um animal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo pelo menos cinco componentes imunogênicos, em que os componentes imunogênicos são selecionados a partir do grupo consistindo de:

- a) seqüências de DNA isoladas codificando antígenos de MPT;
- b) antígenos de MPT recombinantes; ou
- c) combinações de a) e b).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os antígenos de MPT são selecionados a partir do grupo consistindo de 85A, 85B, 85C, 35kDa, 35kDa(Li), SOD, MptC, MptD e ESAT-6.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as seqüências de polinucleotídeos codificando antígenos de MPT codificam um antígeno de MPT selecionado a partir do grupo consistindo de 85A, 85B, 85C, 35kDa, SOD, MptC, MptD e ESAT-6.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a composição compreende seqüências de polinucleotídeos codificando antígenos de MPT 85A, 85B, 85C, proteína de 35kDa MPT, e superóxido dismutase (SOD).

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada a um ruminante.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o ruminante é um bovino, uma ovelha, uma cabra, um veado ou um alce.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o ruminante é um bovino.

8. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo

fato de que o ruminante não é infectado com MPT.

9. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o ruminante é infectado com MPT.

5 10. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o bovino tem Doença de Johne.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição compreende adicionalmente um carreador farmacologicamente aceitável.

10 12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o animal está prenhe.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a composição compreende adicionalmente um adjuvante.

15 14. Composição para uso na estimulação de uma resposta imune contra MPT em um animal, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos cinco componentes imunogênicos, em que os componentes imunogênicos são selecionados a partir do grupo consistindo de:

- a) antígenos de MPT recombinantes;
- b) seqüências de polinucleotídeos isoladas codificando antígenos de MPT;
- 20 c) combinações de a) e b).

15. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que os antígenos de MPT são selecionados a partir do grupo consistindo de 85A, 85B, 85C, 35kDa, SOD, MptC, MptD e ESAT-6.

25 16. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que as seqüências de polinucleotídeos codificando antígenos de MPT codificam um antígeno de MPT selecionado a partir do grupo consistindo de 85A, 85B, 85C, 35kDa, SOD, MptC, MptD e ESAT-6.

17. Composição de acordo com a reivindicação 14,

caracterizada pelo fato de que a composição compreende seqüências de polinucleotídeos codificando antígenos de MPT 85A, 85B, 85C, proteína de 35kDa MPT, e superóxido dismutase (SOD).

5 18. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente um carreador farmacêuticamente aceitável.

19. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente um adjuvante.

Fig. 1

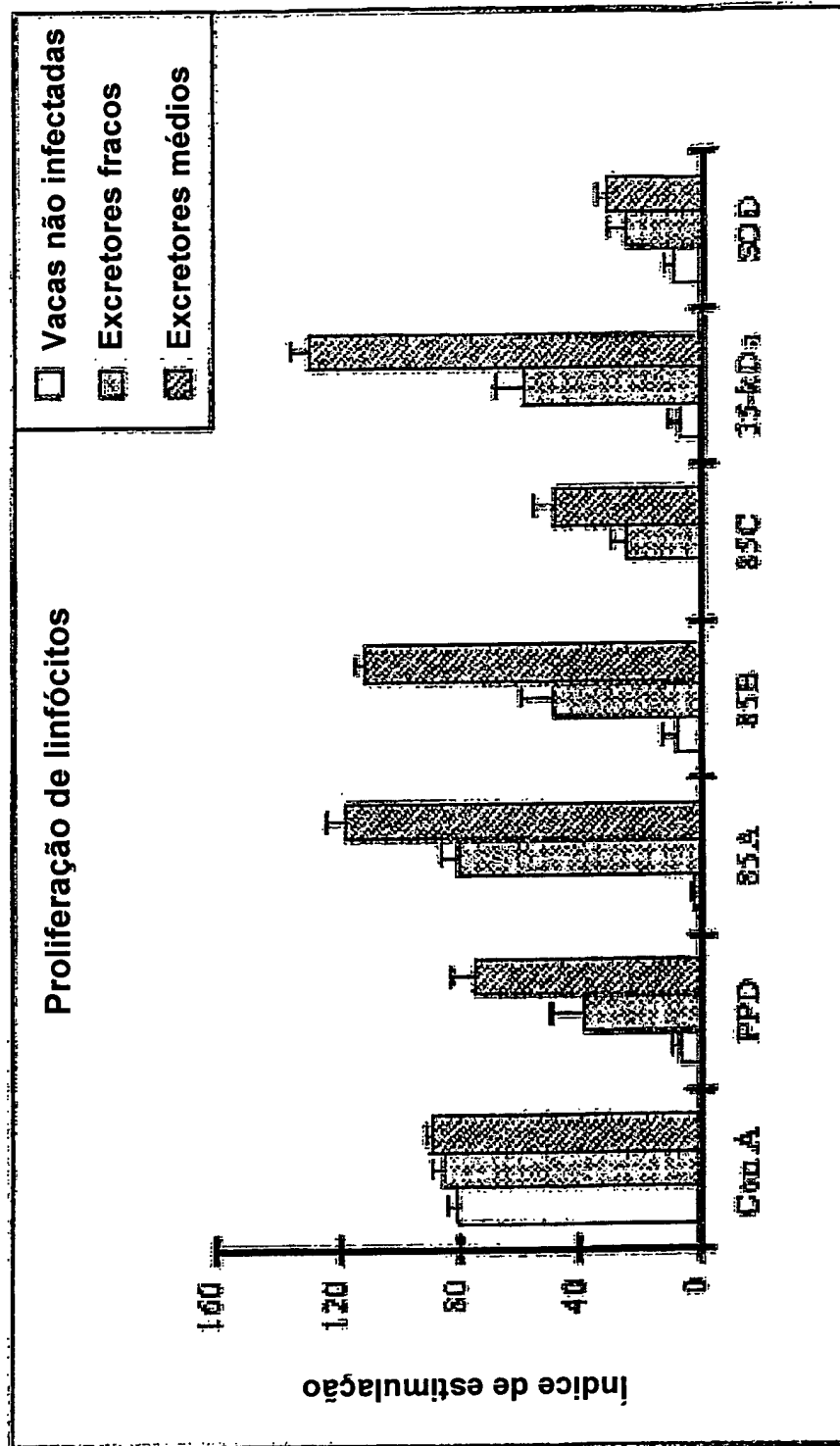
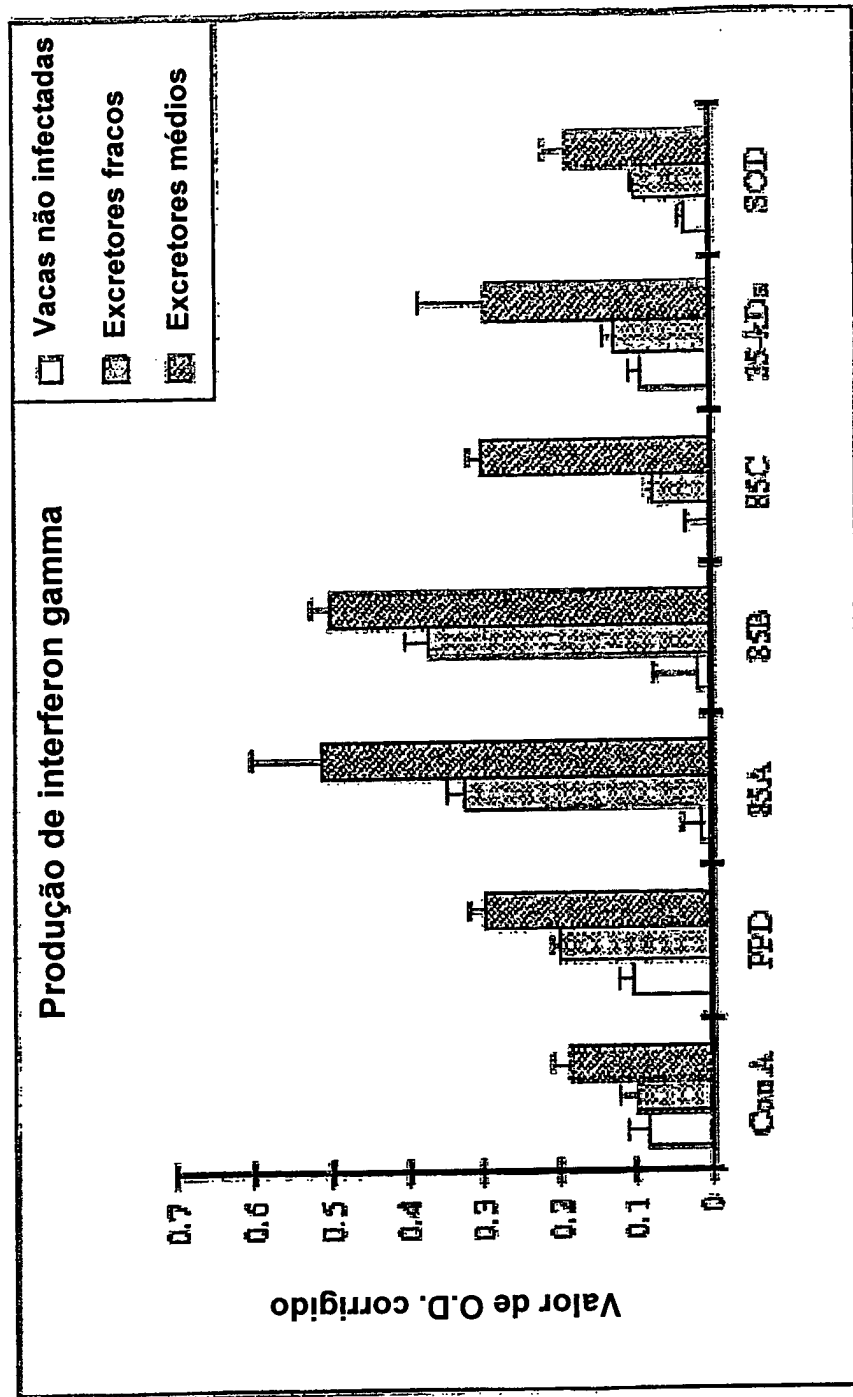


Fig. 2



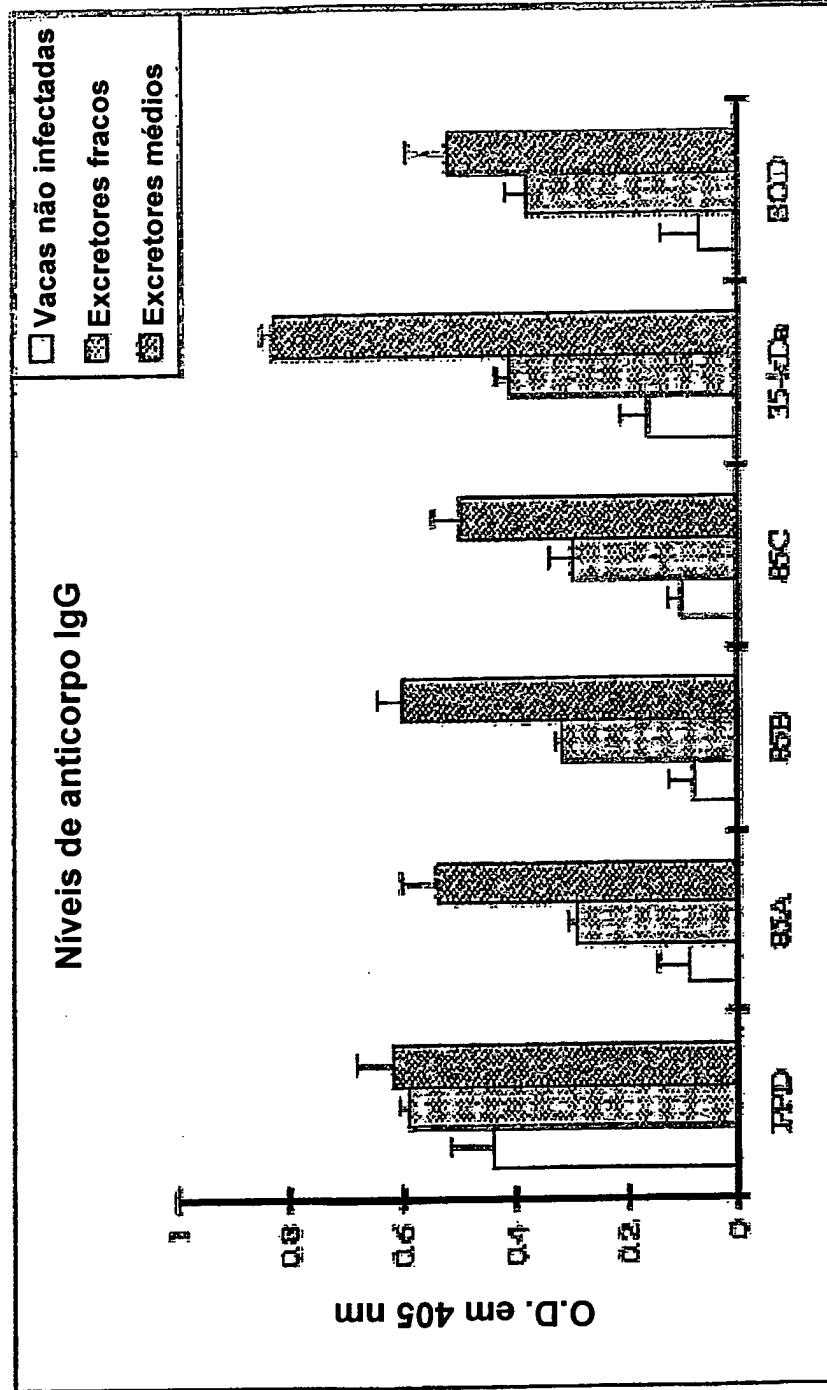


Fig. 3

Fig. 4A

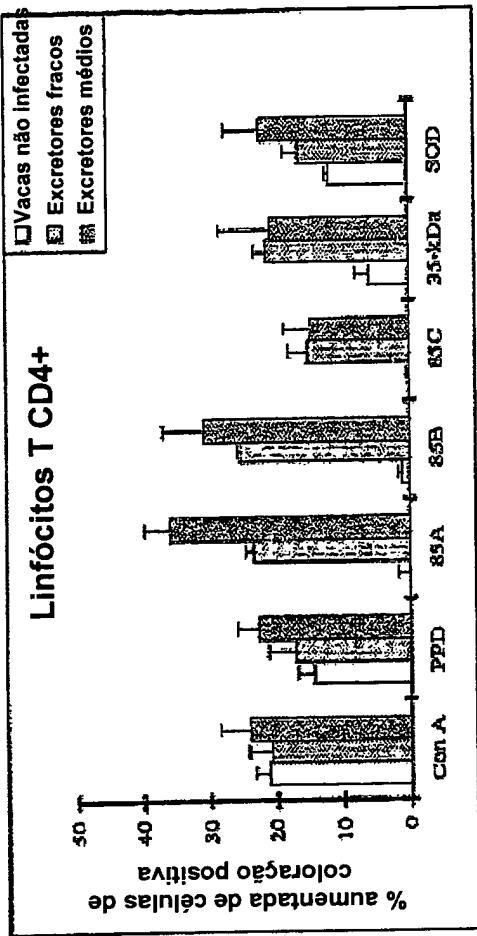


Fig. 4B

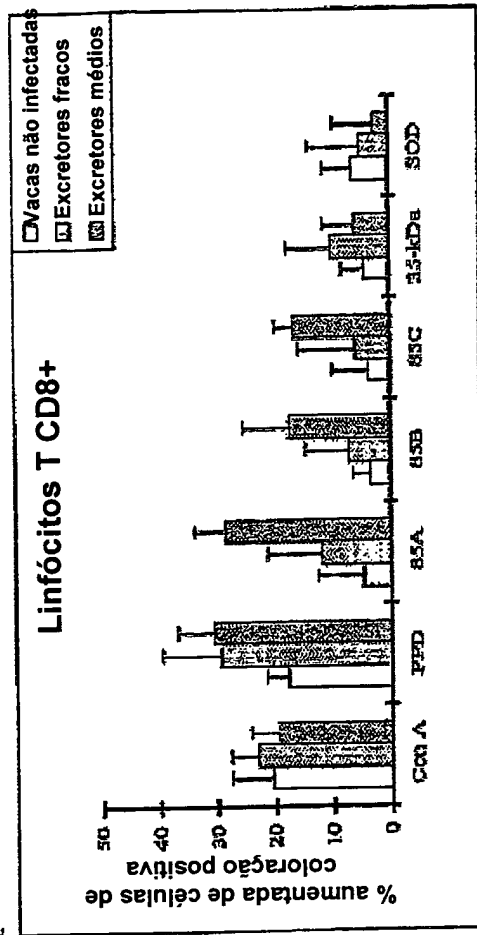


Fig. 4C

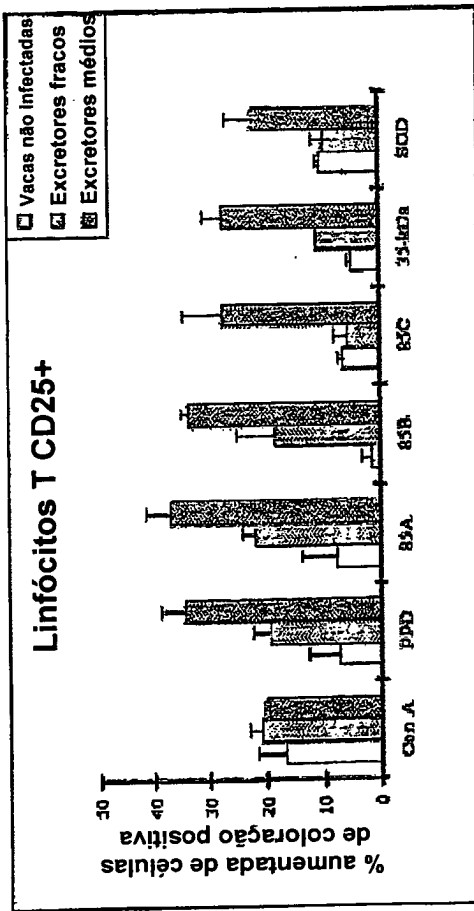


Fig. 4D

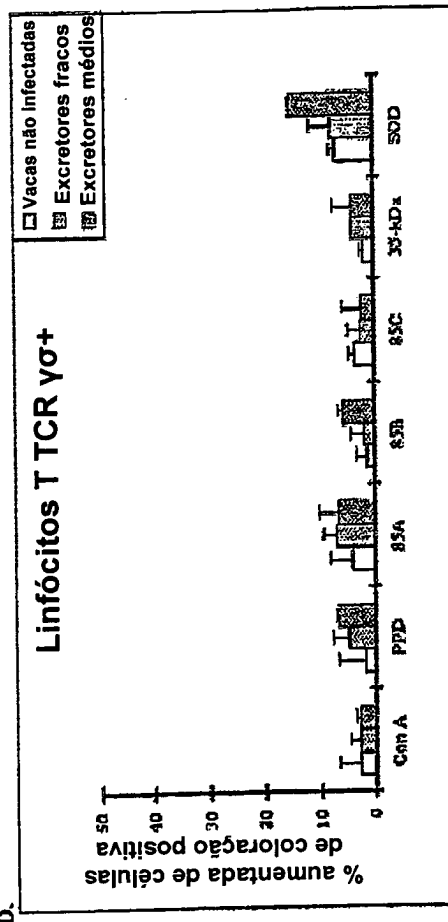
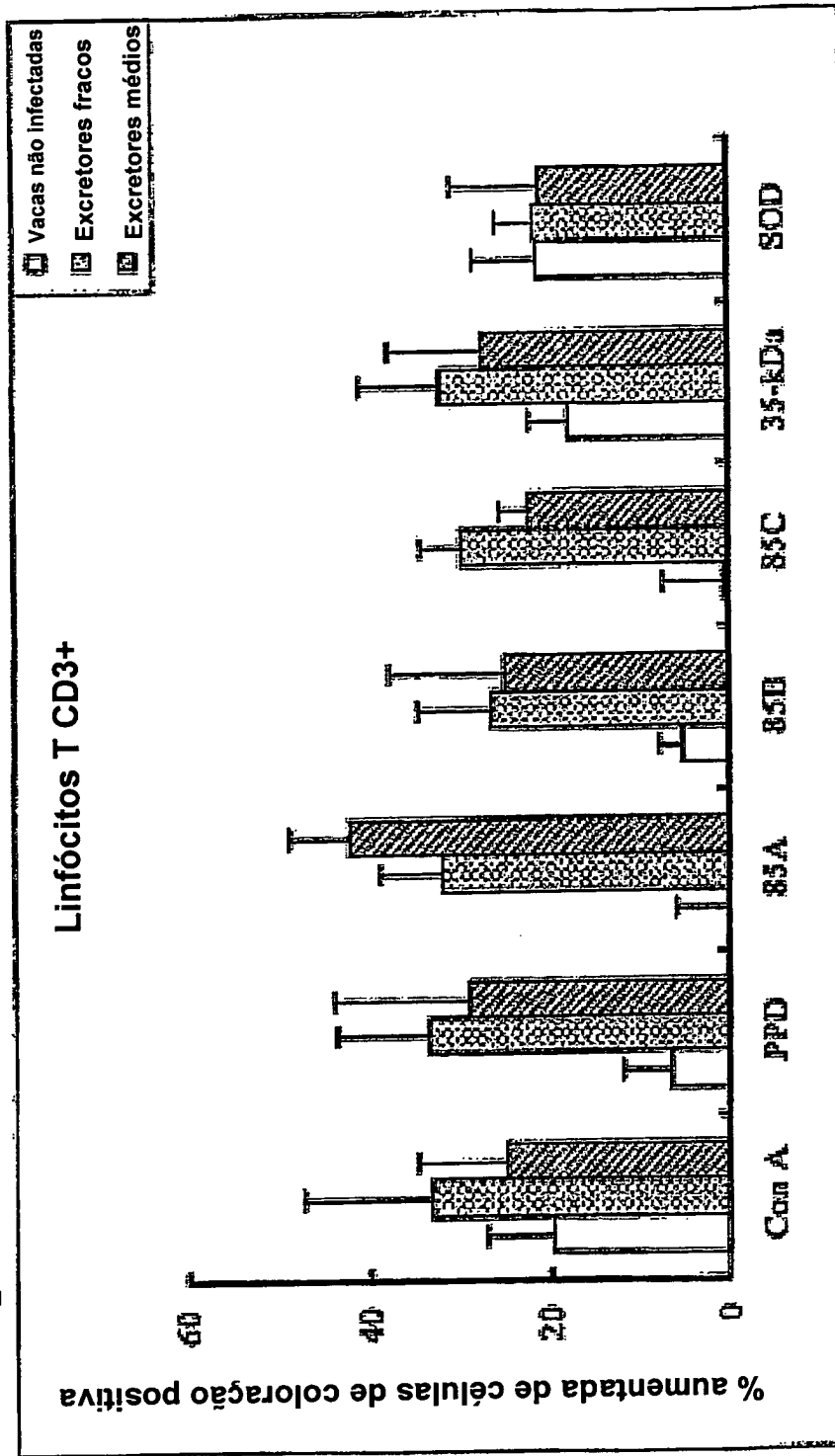


FIG. 4 Cont.

Fig. 5



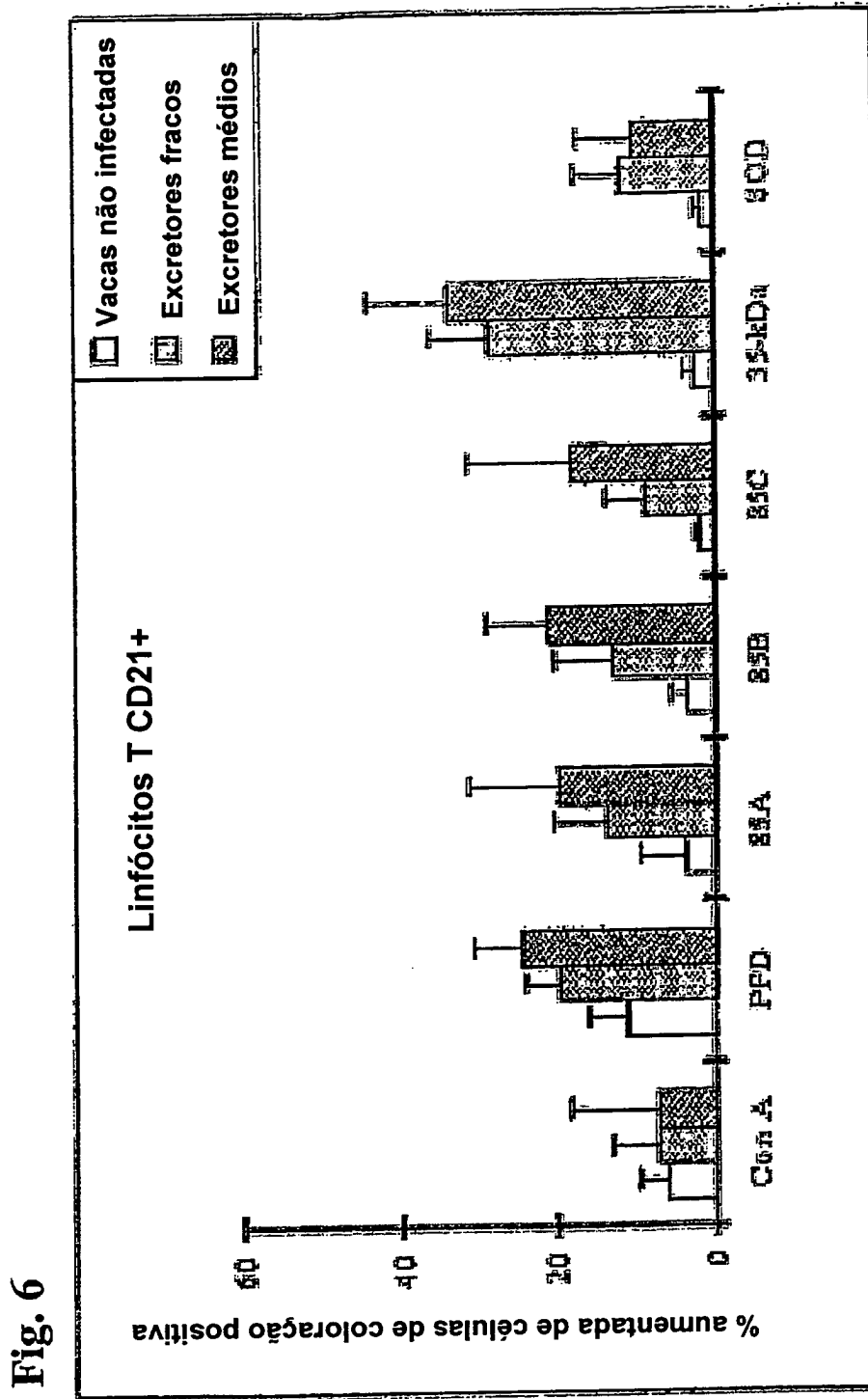


Fig. 7

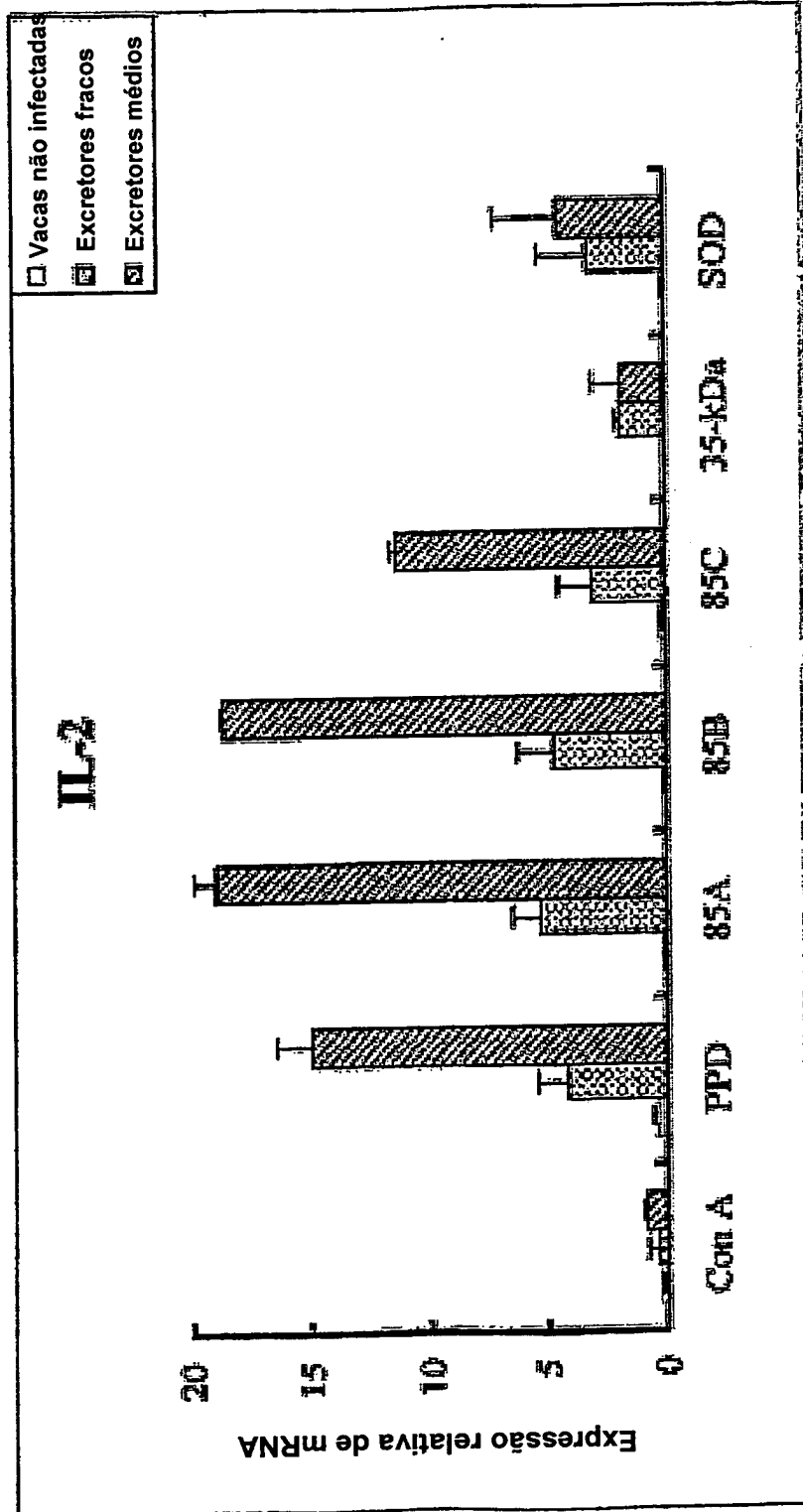


Fig. 8A

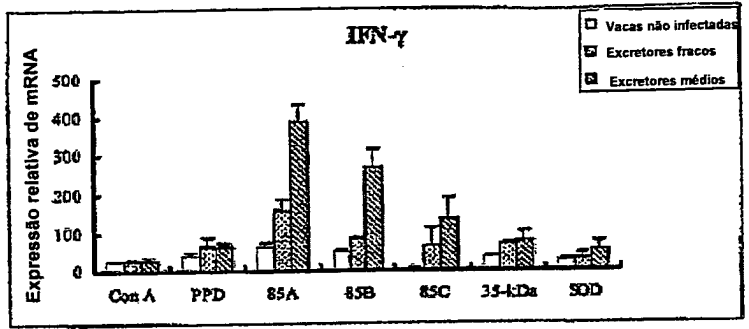


Fig. 8B B.

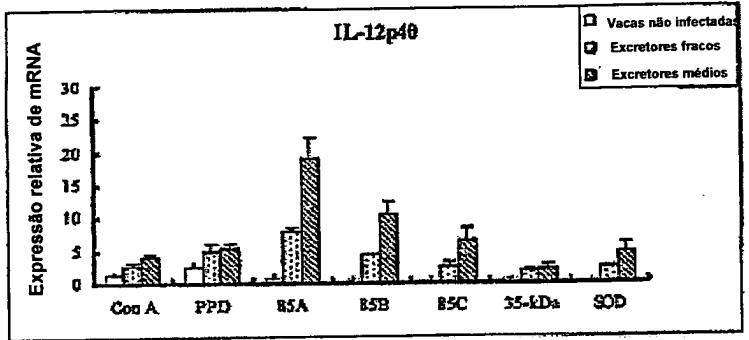
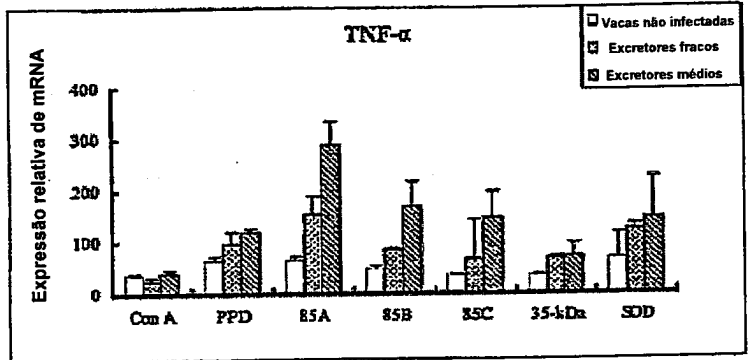


Fig. 8C C.



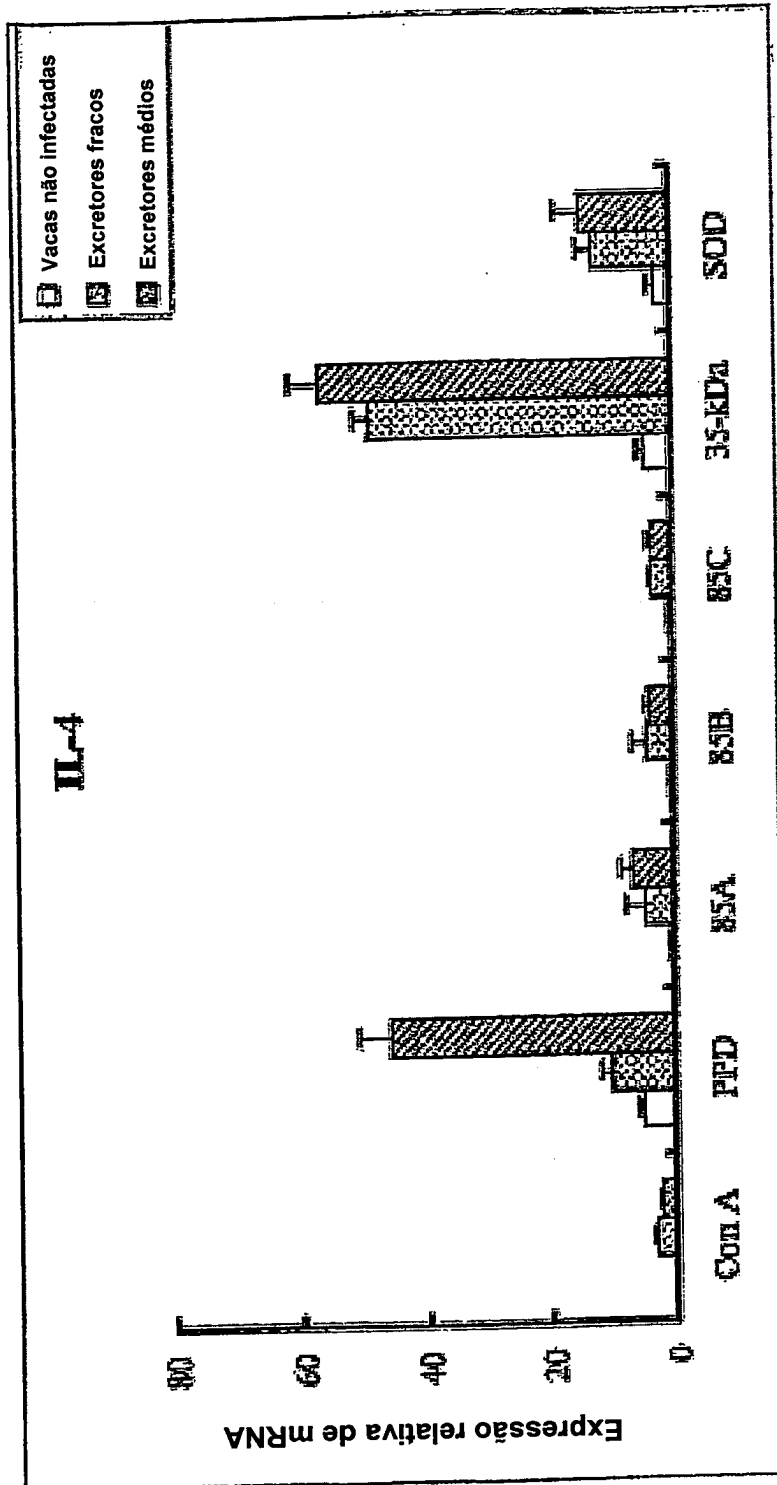
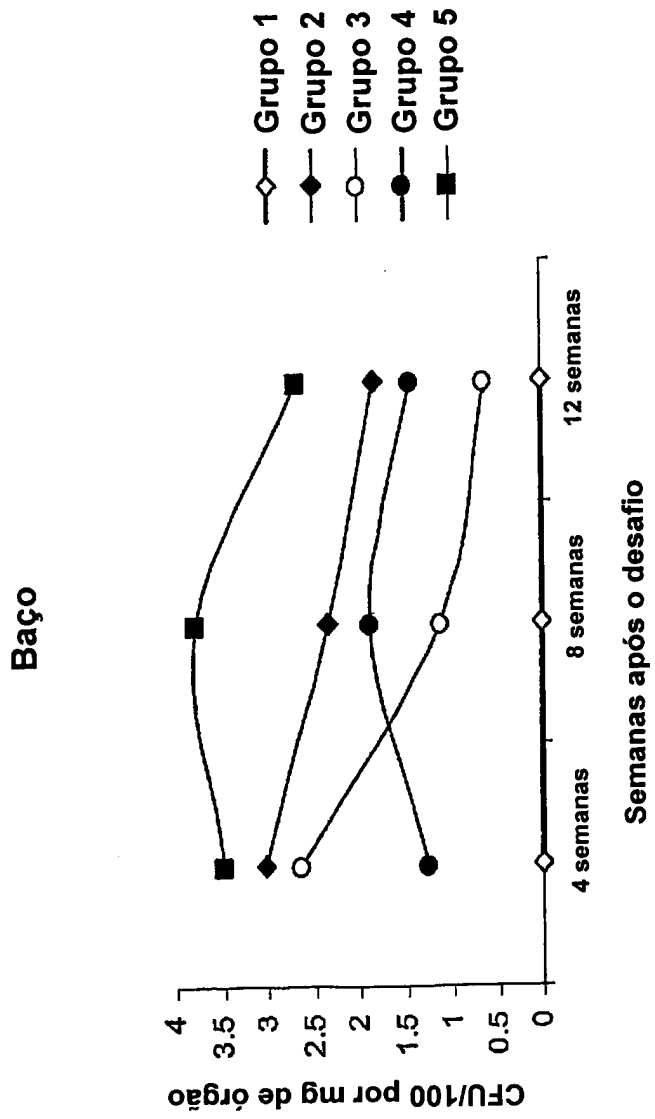


Fig. 9

Fig. 10A



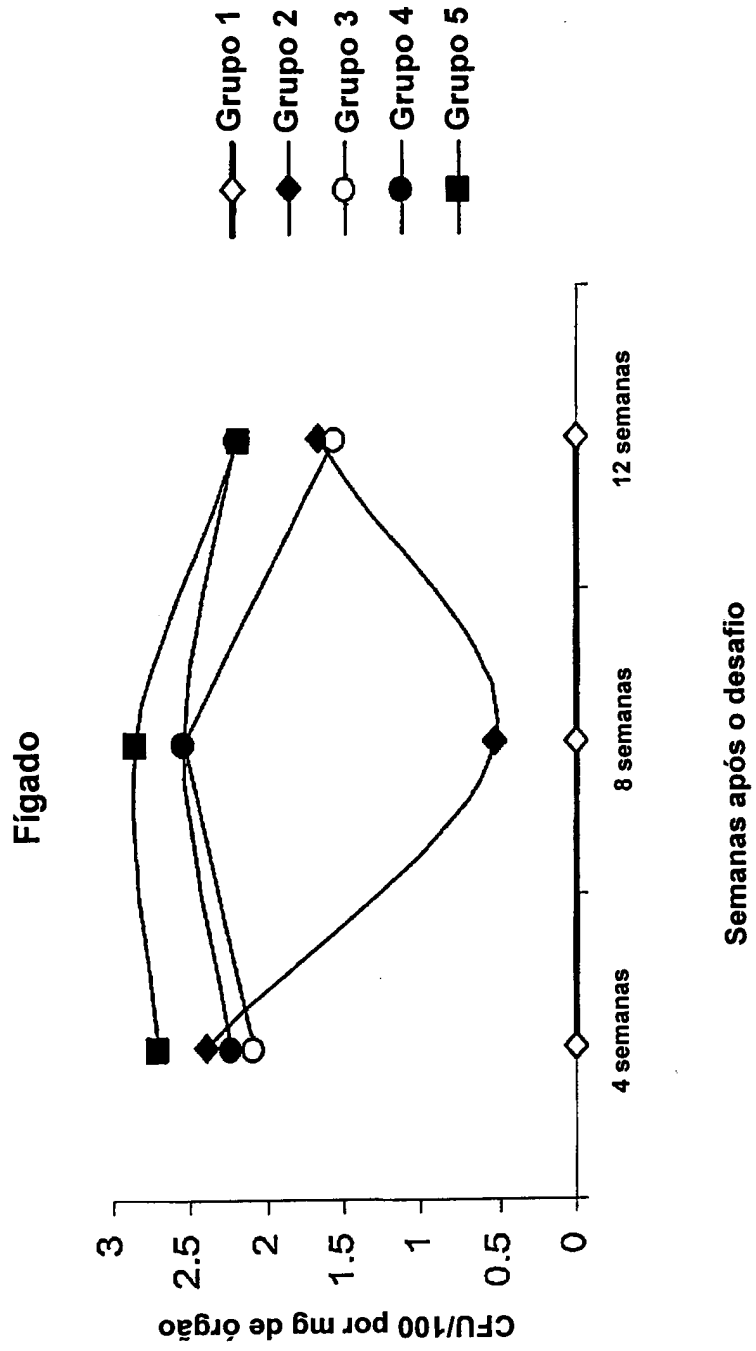


Fig. 10B

Fig. 11A

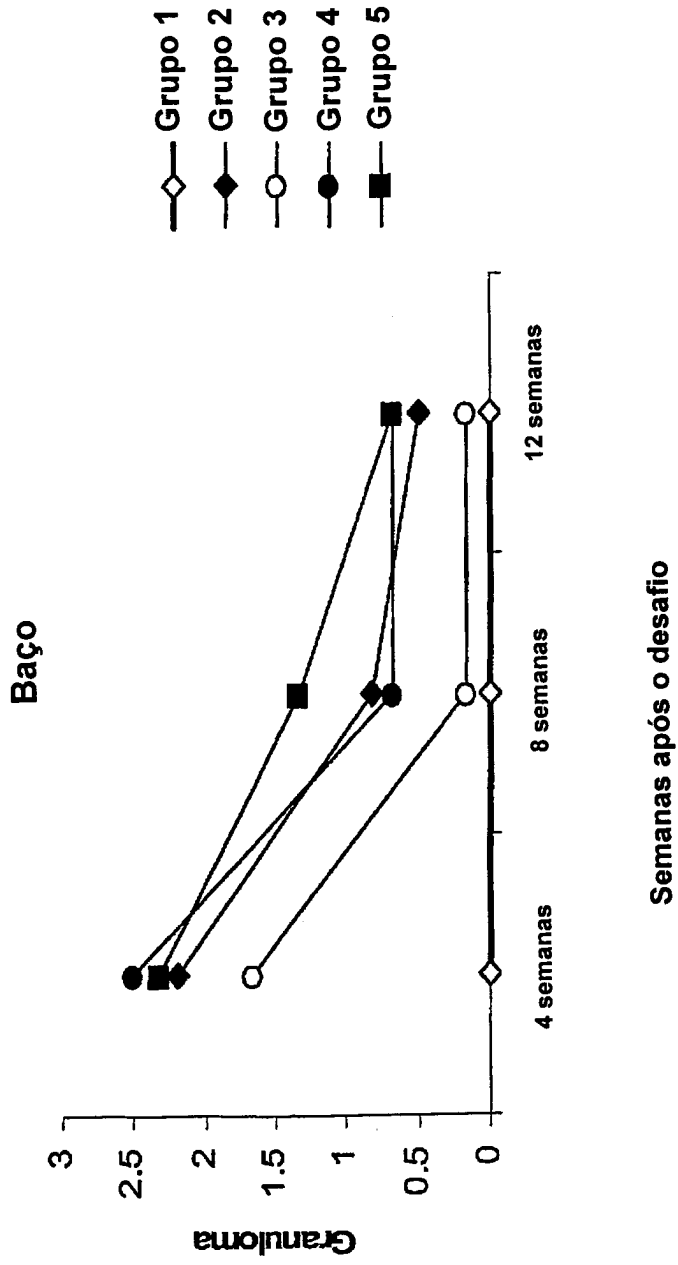
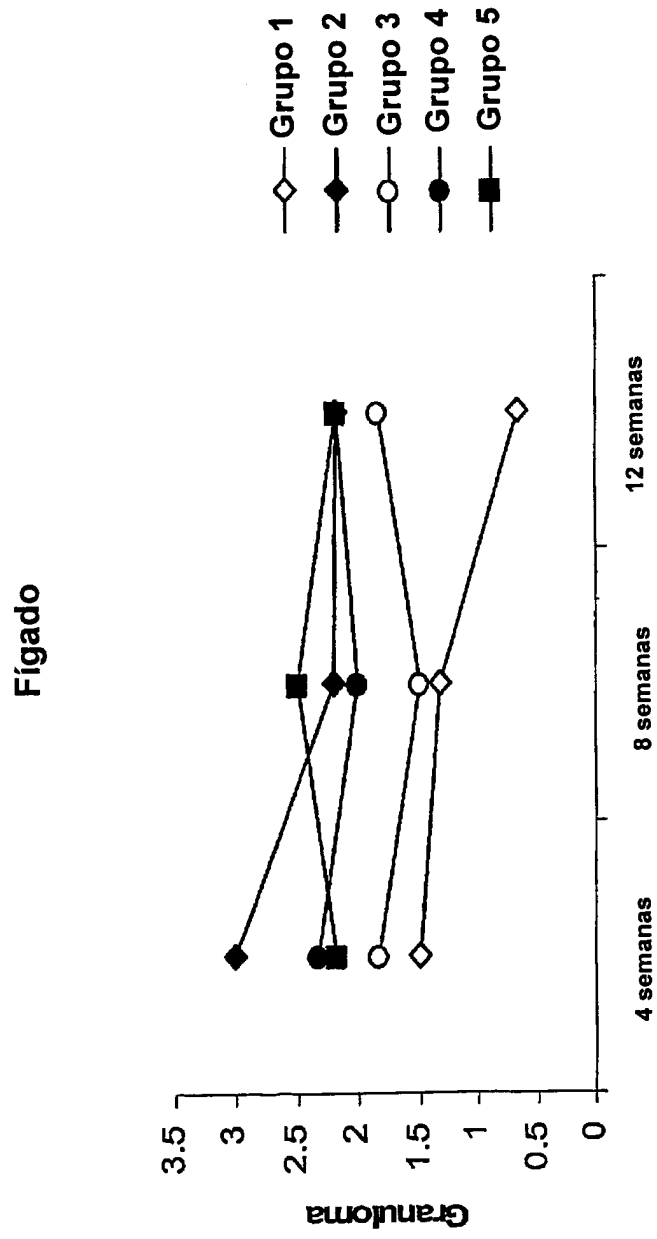
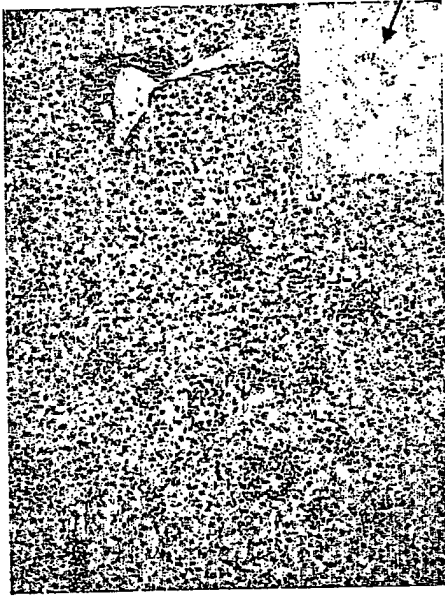


Fig. 11B





Bactéria
álcool-ácido
resistente
magnificada

Fig. 12A

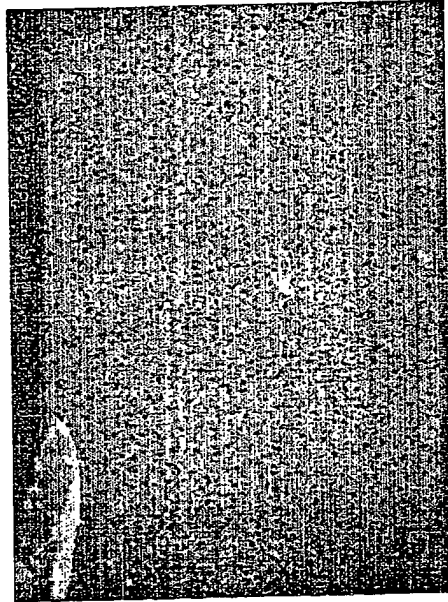


Fig. 12B

RESUMO

“MÉTODO PARA ESTIMULAR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM ANIMAL, E, COMPOSIÇÃO PARA USO NA ESTIMULAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA MPT EM UM ANIMAL”

5 A invenção fornece composições e método para estimular uma resposta imunológica contra *Mycobacterium avium* subespécie paratuberculosis (MPT). As composições compreendem pelo menos cinco componentes imunogênicos recombinantes. Os componentes imunogênicos podem ser antígenos de MPT ou polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT, ou combinações destes. Antígenos de MPT usados na
10 invenção incluem MPT 85A, 85B, 85C, 35kDa, e superóxido dismutase (SOD), MptC, MptD e proteína ESAT-6. O método compreende administrar a composição a um animal em uma quantidade eficaz para estimular uma resposta imunológica contra bactérias MPT. O método é benéfico para
15 qualquer animal susceptível à infecção por MPT, mas é particularmente benéfico para ruminantes.

“USO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÃO PARA USO NA ESTIMULAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA MPT EM UM ANIMAL”

Este pedido reivindica prioridade para pedido de patente Norte-Americana provisório no. de série 60/653.536, depositado em 16 de Fevereiro de 2005, a descrição do qual é incorporada neste lugar em sua totalidade por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere geralmente à estimulação de respostas imunológicas, e mais especificamente a composições e métodos para estimular respostas imunológicas profiláticas ou e terapêuticas contra *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Mycobacterium avium subespécie *paratuberculosis* (MPT) é o agente causador de doença de Johne (JD), que causa enterite granulomatosa crônica em ruminantes. Animais clinicamente afetados desenvolvem diarreia crônica e perda de peso progressiva que eventualmente resulta em morte, enquanto animais subclínicamente infectados têm principalmente produção de leite diminuída. JD é de tremenda importância econômica para a indústria de laticínios no mundo inteiro, causando grandes perdas devido à produção reduzida e seleção precoce de animais com estimativas de 20% de rebanhos leiteiros norte-americanos afetados e custos de \$220 milhões por ano para a indústria de laticínios (Wells, et al. 2000. J. Am. Vet. Med. Assoc.216:1450-1457). Gados são mais susceptíveis a infecção com este organismo dentro dos primeiros 6 meses de vida, mas doença tipicamente não se torna evidente até 3 a 5 anos de idade. Infecção ocorre por ingestão de esterco, colostro, ou leite contaminado de vacas infectadas (Sweeney, 1996. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 12:305-312). Infecção fetal também ocorre, particularmente em vacas prenhes com doença avançada (Sweeney, et al. 1992. Am. J. Vet. Res.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição compreendendo pelo menos cinco componentes imunogênicos, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para estimular uma resposta imune em um animal, em que os componentes imunogênicos são selecionados a partir do grupo consistindo de:

- a) seqüências de DNA isoladas codificando antígenos de MPT;
- b) antígenos de MPT recombinantes; ou
- c) combinações de a) e b).

10 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os antígenos de MPT são selecionados a partir do grupo consistindo de 85A, 85B, 85C, 35kDa, 35kDa(Li), SOD, MptC, MptD e ESAT-6.

15 3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as seqüências de polinucleotídeos codificando antígenos de MPT codificam um antígeno de MPT selecionado a partir do grupo consistindo de 85A, 85B, 85C, 35kDa, SOD, MptC, MptD e ESAT-6.

20 4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a composição compreende seqüências de polinucleotídeos codificando antígenos de MPT 85A, 85B, 85C, proteína de 35kDa MPT, e superóxido dismutase (SOD).

5. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada a um ruminante.

25 6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o ruminante é um bovino, uma ovelha, uma cabra, um veado ou um alce.

7. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o ruminante é um bovino.

8. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo

fato de que o ruminante não é infectado com MPT.

9. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o ruminante é infectado com MPT.

5 10. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o bovino tem Doença de Johne.

11. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição compreende adicionalmente um carreador farmacologicamente aceitável.

10 12. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o animal está prenhe.

13. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a composição compreende adicionalmente um adjuvante.

15 14. Composição para uso na estimulação de uma resposta imune contra MPT em um animal, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos cinco componentes imunogênicos, em que os componentes imunogênicos são selecionados a partir do grupo consistindo de:

- a) antígenos de MPT recombinantes;
- b) seqüências de polinucleotídeos isoladas codificando antígenos de MPT;
- 20 c) combinações de a) e b).

15. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que os antígenos de MPT são selecionados a partir do grupo consistindo de 85A, 85B, 85C, 35kDa, SOD, MptC, MptD e ESAT-6.

25 16. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que as seqüências de polinucleotídeos codificando antígenos de MPT codificam um antígeno de MPT selecionado a partir do grupo consistindo de 85A, 85B, 85C, 35kDa, SOD, MptC, MptD e ESAT-6.

17. Composição de acordo com a reivindicação 14,

caracterizada pelo fato de que a composição compreende seqüências de polinucleotídeos codificando antígenos de MPT 85A, 85B, 85C, proteína de 35kDa MPT, e superóxido dismutase (SOD).

5 18. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente um carreador farmacologicamente aceitável.

19. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente um adjuvante.

RESUMO

“USO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÃO PARA USO NA ESTIMULAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA MPT EM UM ANIMAL”

5 A invenção fornece composições e método para estimular uma resposta imunológica contra *Mycobacterium avium* subespécie paratuberculosis (MPT). As composições compreendem pelo menos cinco componentes imunogênicos recombinantes. Os componentes imunogênicos podem ser
10 antígenos de MPT ou polinucleotídeos de DNA codificando antígenos de MPT, ou combinações destes. Antígenos de MPT usados na invenção incluem MPT 85A, 85B, 85C, 35kDa, e superóxido dismutase (SOD), MptC, MptD e proteína ESAT-6. O método compreende administrar a composição a um animal em uma quantidade eficaz para estimular uma resposta imunológica
15 contra bactérias MPT. O método é benéfico para qualquer animal susceptível à infecção por MPT, mas é particularmente benéfico para ruminantes.