

(11) Número de Publicação: **PT 2019680 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/715 (2011.01) **A61K 31/716** (2011.01)
A61K 35/02 (2011.01) **A61K 45/06** (2011.01)
A61K 31/736 (2011.01) **A61K 38/47** (2011.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2007.04.19**

(30) Prioridade(s): **2006.04.26 US 380359**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.02.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.10.12**
007/2012

(73) Titular(es):

OMNIGEN RESEARCH, LLC
1156 SOUTH PINE STREET CANBY OR 97013US

(72) Inventor(es):

NEIL ELLIOTT FORSBERG US
STEVEN BRUCE PUNTENNEY US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA PT
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA

(54) Epígrafe: **AUMENTO DO TÍTULO PARA VACINAÇÃO EM ANIMAIS**

(57) Resumo:

A DIVULGAÇÃO REFERE-SE A UMA COMPOSIÇÃO ADICIONADA À RAÇÃO ANIMAL UTILIZADA EM COMBINAÇÃO COM UMA VACINA PARA AUMENTAR A EFICÁCIA DA VACINA. ENTRE OUTROS EFEITOS, A COMPOSIÇÃO ELEVA O TÍTULO DE ANTICORPOS PARA A VACINA.

RESUMO

"Aumento do título para vacinação em animais"

A divulgação refere-se a uma composição adicionada à ração animal utilizada em combinação com uma vacina para aumentar a eficácia da vacina. Entre outros efeitos, a composição eleva o título de anticorpos para a vacina.

DESCRIÇÃO

"Aumento do título para vacinação em animais"

Campo do Invento

O invento refere-se a combinações de uma composição e a uma vacina que aumenta o título de anticorpos para a vacina e a métodos para utilização da combinação.

Antecedentes

A resposta imunitária envolve dois sistemas distintos: o sistema inato e o sistema adquirido (mediado por anticorpos). O sistema inato é um sistema evolutivamente antigo que utiliza uma variedade de estratégias para prevenir a infecção. Estas incluem as barreiras de células epiteliais proporcionadas pela pele, o tracto gastrointestinal e os revestimentos do pulmão e da glândula mamária. Além disso, o sistema inato inclui a barreira ácida do estômago (ou abomaso em animais ruminantes) e as enzimas digestivas do estômago, pâncreas e intestino delgado. Finalmente, o sistema inato inclui os glóbulos brancos, macrófagos e neutrófilos. Estas células reconhecem primeiro os patógenos através da apresentação de marcadores únicos na superfície dos patógenos e depois fagocitam e matam os patógenos.

O sistema inato proporciona a resposta imunitária inicial e proporciona o tempo necessário para que o sistema de anticorpos adquirido responda e desenvolva os anticorpos necessários para combater um patógeno específico. Geralmente é necessário uma semana a várias semanas para que uma pessoa ou um animal desenvolva uma resposta de anticorpos. Neste tempo interviniente, um organismo depende do sistema inato para resistir à infecção.

O sistema imunológico adquirido pode desenvolver anticorpos em resposta a um patógeno, toxina, produto químico ou qualquer molécula específica que o organismo reconheça como antigénio (i.e. o sistema imunitário reconhece o antigénio como não próprio). Quando os patógenos infectam uma pessoa ou um animal, marcadores celulares específicos

associados ao patogénio são apresentados a células produtoras de anticorpos. O sistema imunitário adquirido passa então por um processo denominado "expansão clonal". Especificamente, isto permite a produção em massa de células que produzem anticorpos que são dirigidos a um antigénio específico associado ao patogénio.

Os anticorpos são sintetizados por células T e células B. As células T amadurecem no timo e apresentam anticorpos que estão ligados às suas superfícies extracelulares. As células T circulam então livremente no sangue e através dos tecidos linfáticos. A ligação da célula T a um patogénio através do anticorpo ligado resulta assim na identificação e subsequente destruição do patogénio. Em contraste, os anticorpos produzidos por células B são segregados para o sangue onde circulam livremente. Quando os anticorpos produzidos por células B se ligam a um patogénio, iniciam uma cascata de eventos que resulta na identificação e morte do patogénio. Os anticorpos que são produzidos em resposta a imunização são classificados em isotipos de anticorpo. Os três isotipos de anticorpo mais importantes incluem IgM, IgG1 e IgG2. Outros isotipos incluem, mas não se limitam aos isotipos IgA, IgD, IgG3, IgG4 e IgE e, em aves de capoeira, o isotipo IgY.

A resposta de IgM adaptativa é o primeiro anticorpo produzido por células T e B em resposta a um antigénio; no entanto, é um anticorpo relativamente "fraco" com afinidade para o antigénio e especificidade limitadas. Respostas de anticorpos mais "poderosas" estão contidas nos isotipos IgG1 e IgG2; no entanto, o desenvolvimento dos isotipos IgG1 e IgG2 exige períodos de tempo mais longos. As respostas dos isotipos IgG em grávidas são particularmente importantes uma vez que estes são os isotipos de anticorpos que são transferidos da mãe para a descendência através do colostro no momento do nascimento e que por isso transfere uma imunidade passiva para o recém-nascido.

A vacinação (também chamada imunização) contra doença é comumente praticada dentro das indústrias médica humana e de pecuária. Por exemplo, para vacinar contra um patogénio, é administrada uma vacina a um animal na forma de versão não-

infecciosa do patogénio ou é administrada somente uma porção do patogénio. O sistema imunológico adquirido responde através da produção de anticorpos para a vacina. Se o animal for posteriormente exposto ao patogénio vivo, os anticorpos produzidos em resposta à vacina são rapidamente mobilizados e então reconhecem e direccionam-se para o patogénio para destruição.

A indústria pecuária depende de protocolos de imunização contra doenças específicas de gado para minimizar a morbidade e mortalidade decorrentes de infecções fúngicas, virais e bacterianas. Por exemplo, na indústria de lacticínios, é comum a vacinação dos animais contra *E. coli* uma vez que esta é uma das formas mais comuns de infecções da glândula mamária (i.e. mastite) e causa perda de produção e, em casos graves, perda da vaca.

Vários problemas surgem dos actuais protocolos de vacinação. Por exemplo, a eficácia dos protocolos de vacinação varia de indivíduo para indivíduo. Especificamente, alguns indivíduos desenvolverão um elevado título (elevada concentração sérica de anticorpos) em resposta a um protocolo de imunização específico enquanto outros não. Como existe uma correlação directa entre o título de um anticorpo e a resposta do sistema imunitário a uma infecção, alguns indivíduos permanecem susceptíveis a uma infecção pelo patogénio apesar de terem sido vacinados. Consequentemente, há ainda a necessidade de melhorar a eficácia das vacinas para reduzir a incidência de doença em populações animais.

Sumário

A divulgação refere-se a combinações para aumentar a eficácia de vacinas e a métodos para utilização das combinações. As combinações da divulgação utilizam uma composição que tem os seguintes componentes: β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -1,3(4)-glucano, terra diatomácea, argila mineral e glucomanano. Esta composição é distribuída aos animais que estão prestes a passar por um protocolo de vacinação ou estão sujeitos a um protocolo de vacinação.

As combinações aumentam a eficácia da vacina aumentando a concentração sérica (título) de anticorpos para a vacina. A concentração sérica de anticorpos aumentada permanece mesmo após a composição ser retirada da dieta dos animais.

Breve Descrição dos Desenhos

A Fig. 1 mostra resultados de experiências de *Western blotting* que demonstram o efeito da composição na expressão de L-selectina de neutrófilos tal como descrito no Exemplo 1.

A Fig. 2 mostra resultados de experiências de *Western blotting* que demonstram os efeitos da composição em formas não aquecidas e aquecidas (sedimentadas) na expressão de L-selectina de neutrófilos tal como descrito no Exemplo 2.

A Fig. 3 é um gráfico resumindo os efeitos da composição na expressão do ARNm codificando L-selectina em neutrófilos de rato tal como descrito no Exemplo 3.

A Fig. 4 mostra resultados de experiências de *Western blotting* que demonstram os efeitos da composição na expressão de interleucina-1 β (IL-1 β) de neutrófilos tal como descrito no Exemplo 4.

A Fig. 5 é um gráfico de barras que resume os resultados de ELISA utilizados para quantificar o título de IgG1 contra a vacina J5 tal como descrito no Exemplo 6.

A Fig. 6 é um gráfico de barras que resume os resultados de ELISA utilizados para quantificar o título de IgG2 contra a vacina J5 tal como descrito no Exemplo 6.

A Fig. 7 é um gráfico de barras que ilustra os efeitos de uma dose baixa (15 gramas/dia) e uma dose elevada (30 gramas/dia) da composição na expressão de interleucina-1 β em gado de alimentação tal como descrito no Exemplo 6.

A Fig. 8 mostra resultados de experiências de *Western blotting* que demonstram os efeitos da composição na expressão de L-selectina de neutrófilos em gado de alimentação tal como descrito no Exemplo 6.

A Fig. 9 é um gráfico de barras que resume os resultados de ELISA utilizados para quantificar o total do título de IgG1 e IgG2 tal como descrito no Exemplo 7.

Descrição das Concretizações Preferidas

Conforme necessário, concretizações detalhadas da presente composição são aqui divulgadas; no entanto, deve entender-se que as concretizações divulgadas são meramente exemplificativas do invento, que pode ser concretizado de várias formas.

A presente divulgação dirige-se a combinações que aumentam a função imunitária em animais e a métodos para utilização das combinações. Geralmente, as combinações da divulgação utilizam uma composição que tem os seguintes constituintes: β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, β -1,3(4)glucano, terra diatomácea, argila mineral e glucomanano que se sabe aumentar a função imunitária (US2005/0220846). A composição é utilizada em combinação com uma vacina de forma que a ingestão da composição pelo animal aumenta a eficácia da vacina. Tal como aqui definido, uma vacina estimula o sistema imunitário, incluindo a produção de anticorpos quando administrada a um animal. Uma indicação de uma maior eficácia de uma vacina é um maior título de anticorpos para o antigénio da vacina no soro do animal.

A combinação pode ser eficazmente utilizada em alimentos para pessoas ou animais em muitas espécies, tais como mamíferos, incluindo humanos, e aves. Numa concretização preferida, as combinações são utilizadas em mamíferos de pecuária. As combinações podem ser igualmente bem utilizadas com ruminantes e não-ruminantes. Exemplos de ruminantes incluem, mas não se limitam a gado, ovelhas, cabras, vacas, veados, bisontes e búfalos. Os não-ruminantes incluem porcos, cavalos, porcas e outros. Numa concretização particularmente preferida, as composições da composição são utilizadas para gado ovino e bovino.

Numa concretização, a composição é dada a um animal durante o período em que o animal está sujeito a um protocolo

de vacinação. Um protocolo de vacinação típico requer a administração de pelo menos uma e habitualmente várias doses da vacina ao longo de um período de tempo definido para maximizar a estimulação do sistema imunitário e a produção de anticorpos. Numa concretização preferida, a composição é dada diariamente a um animal começando antes do início do protocolo de vacinação e continuando após o início do protocolo de vacinação. Em concretizações alternativas, a composição pode ser dada a um animal começando após o início do protocolo de vacinação ou simultaneamente com o início do protocolo.

A vacina da combinação pode desencadear uma resposta a um patógeno, uma toxina, um fármaco ou outras moléculas. A vacina pode ser uma vacina de ADN onde uma molécula de ADN codificando um antígeno é injectada num animal, resultando na síntese do antígeno e subsequentemente uma resposta imunitária ao antígeno. Numa concretização preferida, a vacina da combinação estimula a produção de anticorpos para um patógeno causador de doença. Numa concretização particularmente preferida, a vacina estimula a produção de anticorpos contra patógenos que causam mastite. A vacina J5 é uma dessas vacinas de mastite comercialmente disponíveis (disponível em Pfizer).

Outros exemplos de patógenos e doenças para os quais humanos e animais são vulgarmente vacinados e que podem beneficiar de um protocolo que estimule a eficácia incluem, mas não se limitam a, rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR), vírus parainfluenza de tipo 3 (PI3), vírus de diarreia bovina (BVDV), vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), rotavírus, coronavírus, *Campylobacter sps.*, *Pasteurella sps.*, conjuntivite, *Salmonella sps.*, *Clostridium sps.*, Leptospirose, Brucelose, doença de Newcastle, varíola aviária, erisipela, cólera aviária, Vírus da Doença de Marek (MDV), Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), encefalomielite aviária, coccidiose, rinopneumonite, gripe equina, *Streptococcus equi*, arterite viral equina, erliquiose monocítica equina, encefalomielite, encefalite do Nilo Ocidental, raiva, parvovírus, adenovírus, *Bordetella*, doença de Lyme, Giardia, tosse convulsa, vírus do sarampo, hepatite A e B, difteria, e poliomielite.

Os constituintes da composição da combinação são preparados através de métodos vulgarmente conhecidos na arte e podem ser obtidos a partir de fontes comerciais. A β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase é produzida a partir da fermentação submersa de uma estirpe de *Trichoderma longibrachiatum*. A terra diatomácea está disponível como um produto com lavagem ácida comercialmente disponível, com 95% de sílica (SiO₂) e com os seus restantes componentes não ensaiados mas consistindo principalmente em cinza (minerais) tal como definido pela *Association of Analytical Chemists* (AOAC, 2002). β -1,3(4)glucano e glucomanano podem ser de preparações comerciais de extracto de parede celular de levedura derivados de levedura primária inactivada (*Saccharomyces cerevisiae*) com a composição química mostrada na Tabela 1:

TABELA 1

Humidade	2-3%
Matéria seca	97-98%
Proteínas	14-17%
Gordura	20-22%
Fósforo	1-2%
Mananos	22-24%
β -1,3(4)glucanos	24-26%
Cinza	3-5%

As argilas minerais (aluminossilicatos) utilizadas nesta composição podem ser qualquer uma de uma variedade de argilas comercialmente disponíveis incluindo, mas não se limitando a, argila montmorilonite, bentonite e zeolite.

Numa concretização preferida da combinação, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea, glucano e glucomanano, e argila mineral são combinados peso a peso nos intervalos de cerca de 0,05-3%, 1-40%, 1-20% e 40-92%, respectivamente. Noutra concretização preferida, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea, glucano e glucomanano, e argila mineral são combinados a 0,1-3%, 5-40%, 2-15% e 40-80%, respectivamente. Numa concretização especialmente preferida, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase,

terra diatomácea, glucano e glucomanano, e argila mineral são combinados a 0,2-3%, 20-40%, 4-10% e 50-70%, respectivamente.

Numa concretização, a composição é um pó seco, solto que é adequado para inclusão directa numa ração, produto alimentar ou como suplemento de uma ração ou dieta mista total comercialmente disponível. O pó pode ser misturado com alimento sólido ou líquido ou com água. Noutra concretização, a composição é formada em granulado.

Numa concretização, quando incorporada directamente em alimentos, a composição pode ser adicionada em quantidades variando de cerca de 0,1 a cerca de 20 kg por tonelada (2000 libras) de alimento. Numa concretização preferida, a composição é adicionada a rações animais ou a alimentos em quantidades de cerca de 0,5 kg a cerca de 10 kg por tonelada de alimento. Numa concretização especialmente preferida, a composição pode ser adicionada a alimentos em quantidades variando de cerca de 1 a cerca de 5 kg por tonelada de alimento.

Quando expressa como percentagem de matéria seca de alimento, a presente composição pode ser adicionada a rações animais ou a alimentos em quantidades variando de cerca de 0,01 a cerca de 2,5% em peso, de preferência de cerca de 0,0125% a cerca de 2% em peso. Numa concretização preferida, a composição é adicionada a rações animais ou a alimentos em quantidades de cerca de 0,05 a cerca de 1,5% em peso, de preferência de cerca de 0,0625% a cerca de 1% em peso. Numa concretização especialmente preferida, a presente composição é adicionada em quantidades de cerca de 0,1 a cerca de 0,7% em peso, de preferência de cerca de 0,125% a cerca de 0,5% em peso do alimento.

Alternativamente, a composição da presente combinação pode ser dada directamente a animais mamíferos ou aves como um suplemento em quantidades de cerca de 0,01 gramas a cerca de 1 grama por quilograma de peso corporal vivo, de preferência de cerca de 0,012 gramas a cerca de 0,5 gramas por quilograma de peso corporal vivo, de maior preferência de cerca de 0,016 gramas a cerca de 0,37 gramas por quilograma de peso corporal vivo por dia. Numa concretização

especialmente preferida, a composição pode ser proporcionada para utilização com muitas espécies em quantidades de cerca de 0,05 gramas a cerca de 0,20 gramas por quilograma de peso corporal vivo por dia.

Como exemplos, a composição pode ser proporcionada a ovelhas no intervalo de cerca de 2 gramas por cabeça por dia a cerca de 8 gramas por cabeça por dia. Para animais bovinos, a composição pode ser proporcionada no intervalo de cerca de 10 gramas por cabeça por dia a cerca de 60 gramas por cabeça por dia. Um perito na técnica pode apreciar que a quantidade da composição dada pode variar dependendo da espécie animal, do tamanho do animal e do tipo do produto alimentar ao qual a composição é adicionada.

São agora proporcionados exemplos para ilustrar os conceitos da composição com um certo grau de especificidade.

EXEMPLO 1

Foi conduzida uma experiência com ovelhas com o objectivo de determinar a capacidade da composição para aumentar a expressão de L-selectina de neutrófilos, um marcador do sistema imunitário inato, em animais imunossuprimidos. Os animais (seis por grupo) foram divididos em dois grupos: Controlo e Experimental. O grupo de Controlo recebeu uma ração rica em energia consistindo em feno picado disponível *ad libitum*, 1 lb de milho moído por cabeça por dia e 1 lb de sêmola de trigo cozida por cabeça por dia durante um período de 28 dias. Durante este tempo, receberam também injeções duas vezes por dia de dexametasona, um fármaco imunossupressor. O grupo Experimental recebeu uma toma diária da composição (5 gramas por cabeça por dia) durante 28 dias e recebeu a mesma dieta e o protocolo de injeção de dexametasona como Controlo. Esta composição do grupo Experimental foi de 65,8 por cento em peso de argila mineral, 0,20 por cento em peso de endoglucano-hidrolase, 9,0 por cento em peso de glucanos e glucomanano, e 25 por cento em peso de terra diatomácea calcinada. No final do estudo, foram recuperadas amostras de sangue e foram purificados os neutrófilos utilizando uma centrifugação em gradiente de Percoll. As quantidades de expressão de L-selectina em

neutrófilos foram ensaiadas utilizando técnicas de *Western blotting* e anticorpos específicos para L-selectina.

Tal como mostrado na Fig. 1, painel superior, os animais que não receberam a composição tinham uma expressão baixa e variável de L-selectina. Tal como mostrado na Fig. 1, painel inferior, os animais que receberam a composição demonstraram um aumento consistente na expressão de L-selectina. O painel superior representa seis animais imunossuprimidos de Controlo. O painel inferior representa seis animais imunossuprimidos Experimentais que receberam a composição na sua dieta.

EXEMPLO 2

Neste estudo, a estimulação do sistema imunitário inato em ovelhas foi examinada quando a composição Experimental do Exemplo 1 foi proporcionada numa dieta de granulado. A dieta básica consistiu em 21,55% de cevada, 10,0% de farelo de colza, 5% de grãos de destilaria, 40% de milho moído, 1,50% de calcário, 0,01% de sulfato de manganésio, 0,01% de microvitamina E, 4,0% de melão, 0,25% de mono-cal, 0,25% de cloreto de potássio, 0,60% de cloreto de sódio, 0,03% de selenito de sódio, 15,79% de sêmola de trigo, 0,01% de sulfato de zinco, 0,75% de sulfato de amónio e 0,25% de sulfato de cobalto. Quando a composição Experimental foi adicionada a esta dieta, foi incluída a 0,6% substituindo essa porção de sêmola de trigo. Vinte e oito ovelhas foram distribuídas por quatro tratamentos que consistiram num grupo de Controlo, um grupo que recebeu a composição Experimental na forma em pó, um grupo que recebeu a composição Experimental na forma de granulado onde foram formados grânulos a uma temperatura de 160°F, e um grupo que recebeu a composição Experimental na forma granulada onde foram formados grânulos a 180°F. Todos os animais foram imunossuprimidos através de injeção diária de Dexametasona.

O estudo foi conduzido utilizando métodos idênticos ao Exemplo 1 excepto que foi administrada uma composição em grânulos que foram fabricados através da formação de grânulos a elevadas temperaturas. O racional para a condução deste estudo foi determinar se o aquecimento da composição

(conforme necessário na formação dos grânulos) pode inactivar a capacidade da composição para aumentar a imunidade inata. Tal como mostrado na Fig. 2, as ovelhas (Controlo) que não receberam a composição expressaram níveis muito baixos de L-selectina em neutrófilos. O proporcionar da composição Experimental mesmo numa forma granulada (aquecida) aumentou ainda marcadamente a expressão de L-selectina de neutrófilos.

Na Fig. 2, o painel mais acima representa a expressão de L-selectina de neutrófilos em animais imunossuprimidos alimentados com uma dieta de controlo sem a composição. O segundo painel (Pó) representa a expressão de L-selectina em animais imunossuprimidos que receberam a composição Experimental na forma não aquecida mexida livremente tal como no Exemplo 1 (grupo Experimental). Os painéis três e quatro representam a expressão de L-selectina de neutrófilos em animais imunossuprimidos que receberam a composição Experimental em formas granuladas. Os grânulos utilizados no Painel 3 foram formados através de aquecimento a 160°F e os grânulos do Painel 4 foram aquecidos até 180°F durante o fabrico das rações.

EXEMPLO 3

Foi efectuada uma experiência com ratos para investigar se a composição tinha a capacidade para aumentar a imunidade inata num modelo não ruminante. Neste estudo, os ratos foram atribuídos a um de dois tratamentos: um grupo de Controlo (dieta não suplementada) e um grupo Experimental onde a composição do Exemplo 1 foi adicionada à dieta a 1% de peso seco de alimento. Nesta experiência, os ratos foram alimentados com uma ração de rato comercial com ou sem a composição Experimental. A imunossupressão utilizando protocolos de injeção de dexametasona não foi utilizada neste estudo. Após 14 dias, foram tomadas amostras de sangue a partir de ratos anestesiados através de punção cardíaca. Os neutrófilos foram isolados de amostras de sangue utilizando centrifugação em gradiente de Percoll e o ARN total foi isolado utilizando TriZol.

A concentração do ARN mensageiro (ARNm) codificando L-selectina de rato nas amostras de ARN de neutrófilos foi

então determinada através de transcriptase reversa quantitativa-reação em cadeia da polimerase (QRT-PCR) utilizando iniciadores que foram especificamente desenvolvidos para o ensaio de L-selectina de rato. As quantidades de ARNm de L-selectina foram padronizadas mostrando-as como uma proporção de ARNm de β -actina, que é expressa em todas as células a um nível razoavelmente constante. Tal como mostrado na Fig. 3, e de acordo com os resultados nos Exemplos 1 e 2, a composição aumentou a expressão de ARNm de L-selectina em mais de 6 vezes ($P < 0,05$).

Este estudo demonstrou que a maior expressão da L-selectina tal como mostrado por *Western blotting* nos Exemplos 1 e 2 pode ser causada através de um aumento do ARNm codificando esta proteína. Isto implica que a composição altera a taxa de transcrição do gene codificando L-selectina.

EXEMPLO 4

Os neutrófilos, células do sistema imunitário inato, são capazes de sinalizar e deste modo sobrerregular a produção de anticorpos pelo sistema imunitário adquirido através da secreção de interleucina-1 β (IL-1 β). Para investigar a capacidade da composição para induzir neutrófilos para aumentar a síntese de IL-1 β , foi avaliada a concentração de IL-1 β em neutrófilos tomados da mesma ovelha tal como descrito no Exemplo 1. Para completar este estudo, foi utilizado *Western blotting* e anticorpos específicos para IL-1 β .

Tal como mostrado na Fig. 4, os animais que não receberam a provisão diária da composição continham níveis virtualmente indetectáveis de IL-1 β , no entanto, a provisão da composição a animais causou um aumento marcado na expressão de IL-1 β ($P < 0,05$). Na Fig. 4, o painel superior representa seis animais imunossuprimidos alimentados com Controlo. O painel inferior representa seis animais imunossuprimidos alimentados com composição Experimental que receberam a composição. As concentrações de IL-1 β foram determinadas utilizando análise *Western blot* e um anticorpo específico para IL-1 β .

Estes dados indicam que a composição possui a capacidade para não só aumentar marcadores de imunidade inata (p.ex. L-selectina; Exemplos 1, 2 e 3) como também aumentar a expressão da molécula de sinalização chave (i.e., IL-1 β) que sobrerregula o sistema imunitário adaptativo.

EXEMPLO 5

O objectivo desta experiência foi determinar que genes eram diferencialmente expressos em neutrófilos após a distribuição da composição a vacas leiteiras peri-parturientes. Neste estudo, foi examinado o mecanismo ou mecanismos através dos quais a composição aumentou a expressão de IL-1 β em neutrófilos. As vacas leiteiras peri-parturientes são um bom modelo porque o stress da gravidez conduz a imunossupressão, tornando as vacas particularmente susceptíveis a infecção.

Nesta experiência oito vacas leiteiras peri-parturientes foram atribuídas a uma dieta de Controlo que não tinha a composição Experimental e oito vacas foram atribuídas a um grupo Experimental que recebeu a composição do Exemplo 1 na sua dieta (56 gramas por dia por cabeça). Os animais foram alimentados com as dietas durante aproximadamente 28 dias até ao parto. 12-15 horas após o parto, 500 ml de amostras de sangue foram recuperados através de punção jugular e os neutrófilos foram preparados através de centrifugação de gradiente de Percoll em larga escala.

O ARN foi isolado de neutrófilos utilizando o método de TriZol e depois transcrito de forma reversa para ADNc utilizando transcriptase reversa. Durante a transcrição reversa foram empregues corantes de cores diferentes baseados em nucleótidos (Cy3 e Cy5), de modo que os ADN complementares (ADNc), sintetizados a partir dos dois grupos de tratamento diferentes (Controlo e Experimental), incorporaram cores diferentes. As amostras de ADNc dos grupos Experimental e de Controlo foram então aplicadas numa lâmina de *microarrays* BoTL-5. Este *microarray* foi preparado no Center for Animal Functional Genomics em Michigan State University e contém 1500 genes (cada um disposto em triplicado) sobre uma lâmina de vidro. Os ADNc gerados a partir das amostras dos grupos

Experimental e de Controlo foram então deixados competir pela ligação aos 1500 genes no array e a expressão relativa dos genes foi então ensaiada através de comparação da abundância relativa dos sinais de Cy3 e Cy5 em cada ponto no array. Os dados foram então estatisticamente analisados para identificar os genes que eram diferencialmente expressos (os genes onde $P < 0,05$).

Os resultados mostraram que mais de 20 genes eram diferencialmente expressos ($P < 0,05$) em neutrófilos bovinos tomados do grupo Experimental. A enzima conversora de interleucina (ICE) foi um desses genes sobrerregulados. Isto foi confirmado utilizando QRT-PCR e iniciadores específicos para a sequência da ICE bovina. A ICE é a enzima limitante na conversão da pro-IL-1 β inactiva na activa, a IL-1 β segregada. Assim, a composição pode sobrerregular a imunidade adaptativa (i.e., tal como aumentar o título de anticorpos) através da sua capacidade para aumentar a expressão da actividade de ICE de neutrófilos e, conseqüentemente, a secreção de IL-1 β .

EXEMPLO 6

Para testar a hipótese de que a composição aumentou a eficácia da vacina, foi examinado o desenvolvimento do título após um protocolo de vacinação. Dezoito cabeças de gado de corte (seis cabeças em cada grupo) foram atribuídas a um de três tratamentos: Controlo, Tratamento 1 (15 gramas de composição na dieta por cabeça por dia) e Tratamento 2 (30 gramas de composição por cabeça por dia). A dieta dos animais consistiu numa dieta de erva de feno que foi oferecida *ad libitum* com um suplemento diário que proporcionou 14% de proteína bruta, 3% de gordura bruta e 20% de fibra bruta (Tabela 2). Foi proporcionado aos animais 12 libras deste suplemento por cabeça por dia ao longo do ensaio. A composição Experimental do Exemplo 1 foi misturada directamente neste suplemento de modo a que tomas esperadas de 15 gramas por cabeça por dia e 30 gramas por cabeça por dia fossem distribuídas ao gado no Tratamento 1 e 2, respectivamente.

Foram administrados aos animais estes tratamentos dietéticos durante 56 dias após os quais a composição foi

retirada da dieta dos Tratamentos 1 e 2. Todos os animais foram mantidos na mesma dieta de controlo sem a composição até ao dia 84. Nos dias 7, 21 e 35 da experiência foi administrada a todos os animais uma vacina de *E. coli* J5 (Pfizer). Este protocolo de vacinação (*i.e.*, três injeções, separadas por 14 dias) seguiu as recomendações do fabricante. Esta vacina é utilizada comercialmente na indústria de laticínios como meio de reduzir a probabilidade de mastite por coliformes. Uma limitação a esta vacina, e à maioria das outras vacinas, é a resposta variável e limitada no título.

Foram tomadas amostras de sangue utilizando punção jugular nos Dias 0, 14, 28, 42 e 56, dia em que a composição foi removida da dieta do animal. Todos os animais permaneceram numa dieta comum sem a composição até ao dia 84. Foram também tomadas amostras de sangue no dia 82 para determinar se quaisquer alterações no título induzidas pela composição eram mantidas após a sua retirada da dieta. Foi preparado soro a partir de todos os animais através de centrifugação. As concentrações de anticorpos específicos para a vacinação de *E. coli* J5 foram avaliadas em três fracções diferentes de imunoglobulinas (IgM, IgG1 e IgG2) utilizando ensaios imunossorventes ligados a enzima (ELISA). Para ensaiar os títulos de *E. coli* J5 nas fracções das imunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG2, uma cultura de *E. coli* (obtida de Dr. Jeanne Burton, Center for Animal Functional Genomics, Department of Animal Sciences, Michigan State University) foi criada, colhida e utilizada para revestir placas de 96 poços. Subsequentemente, foram adicionadas amostras de soro (diluídas 1:5000) dos animais a poços individuais nas placas revestidas e deixadas incubar durante uma hora para permitir que os anticorpos no soro do animal se ligassem ao antigénio de *E. coli* J5. As placas de ELISA foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween-20.

Anticorpos secundários (ovinos anti-bovino conjugados com peroxidase de rábano (HRP)) que se ligam especificamente a IgM, IgG1 ou IgG2 bovina (Beth Laboratories, Montgomery, TX) foram adicionados às placas lavadas. Os anticorpos secundários foram conjugados com peroxidase de rábano. Após incubação durante mais uma hora com os anticorpos

secundários, as placas foram novamente lavadas com PBS e Tween-20. O substrato da peroxidase TMB (tetrametilbenzidina) foi adicionado às placas e a reacção de cor resultante foi quantificada através da medição da absorvância a 450 nm utilizando um leitor de placas de ELISA.

Tal como mostrado na Tabela 3, a composição Experimental não teve efeito (no limiar de $P > 0,05$) no desenvolvimento do título de *E. coli* J5 associado ao isotipo de anticorpo IgM. No entanto, a composição estimulou e manteve o título de J5 nos isotipos de anticorpo IgG1 e IgG2 tal como mostrado nas Figs. 5 e 6 e nas Tabelas 4 e 5.

O título de IgG1 aumentou no Dia 56 ($P < 0,05$) em animais que tinham recebido tanto o Tratamento 1 como o Tratamento 2 (Tabela 4 e Fig. 5). Pelo Dia 82, o título em animais de Controlo tinha caído novamente para níveis pré-experiência (Dia 0). No entanto, os animais que tinham sido alimentados com o Tratamento 1 ou o Tratamento 2 tinham um título de J5 elevado em comparação com os animais de Controlo ($P < 0,05$). De facto, os animais que tinham recebido o Tratamento 1 ou 2 não demonstraram perda de título de IgG1 uma vez o invento tinha sido removido da dieta após 56 dias (Tabela 4 e Fig. 5).

Tal como mostrado na Tabela 5 e na Fig. 6, em relação à fracção de IgG2, a adição de 15 g por cabeça por dia (Tratamento 1) ou 30 g por cabeça por dia (Tratamento 2) da composição causaram um aumento gradual no título de IgG2 de J5 a 42 dias (i.e. a dose mais elevada aumentou o título em 57% e a dose mais baixa em 30% em comparação com o Controlo), embora este efeito não fosse estatisticamente significativo a $P < 0,05$ (o valor de P foi de 0,16). Após 56 dias, o Tratamento 2, (a dose mais elevada da Composição) causou uma elevação significativa no título de J5 ($P < 0,05$). O Tratamento 1 (a dose baixa da Composição) causou uma elevação no título de J5 dentro da fracção de IgG2 neste momento embora este efeito não fosse estatisticamente significativo a um limiar de $P < 0,05$ (valor de $P = 0,12$). No Dia 82 do estudo, após a Composição ter sido retirada da dieta, os animais alimentados com a dose mais elevada da Composição tinham um título elevado dentro da fracção de IgG2 (aumento de 14% em

comparação com o Controlo); no entanto, este efeito não foi significativo no limiar de $P < 0,05$ (o valor de P é = 0,09).

Estes dados indicam que a Composição tem a capacidade para aumentar o título e, para além disso, manter o título na fracção de IgG1 após retirada da composição da dieta ($P < 0,05$). A Composição tem também a capacidade para aumentar o desenvolvimento do título dentro da fracção de IgG2 ($P < 0,05$).

As concentrações de IL-1 β foram também examinadas nas amostras de soro dos animais de Controlo, do Tratamento 1 e do Tratamento 2 utilizando um ELISA para IL-1 β (R+D Systems Minneapolis, MN)). Tal como mostrado na Fig. 7, os resultados indicaram que tanto o Tratamento 1 como o Tratamento 2 aumentaram as concentrações séricas de IL-1 β após 28 dias. Após 56 dias, a dose baixa da Composição também elevou significativamente a concentração sérica de IL-1 β ($P < 0,05$). A dose elevada da Composição causou uma elevação numérica na IL-1 β sérica no Dia 56 do estudo; no entanto, este efeito não foi significativo a $P < 0,05$ (valor de P = 0,23). Embora não desejando estar preso à teoria, a composição pode estimular o sistema imunitário inato (p.ex., através da activação de neutrófilos) e os neutrófilos estimulam então o sistema imunitário adquirido através da secreção de IL-1 β . IL-1 β aumentou especificamente a capacidade das células B para aumentar a taxa de desenvolvimento do título de IgG2 e mantém o título dentro da fracção de IgG1.

As concentrações proteicas da L-selectina de neutrófilos foram também avaliadas utilizando *Western blotting* tal como mostrado na Fig. 8. A concentração de ARNm para a L-selectina foi também determinada tal como para o estudo de ratos (Exemplo 4) mas utilizando iniciadores específicos de bovino. Foi determinado que tanto o Tratamento 1 (15 g da composição Experimental/cabeça/dia) como o Tratamento 2 (30 g de composição Experimental/cabeça/dia) aumentaram ($P < 0,05$) as concentrações de L-selectina dos neutrófilos em comparação com o tratamento de Controlo.

TABELA 2

Ingrediente	percentagem de suplemento (com base na ração)
Cascas de algodão	32,5
Milho	25,0
Sêmola de trigo	6,25
Farinha de colza	7,50
Grãos de destilaria	8,73
Calcário	0,75
Dynamate	0,25
Óxido de magnésio	0,15
Farinha de alfafa	14,0
Ureia	0,50
Rumensin	0,01
Sulfato de zinco	0,01
Selénio	0,04
Cloreto de sódio	0,30
Melaço	4,00

TABELA 3

Dia de estudo	Controlo (Abs a 450 nm)	Tratamento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamento 2 (Abs a 450 nm)
14 dias	0,477	0,404	0,391
28 dias	0,736	0,409	0,424
42 dias	0,842	0,405	0,408
56 dias	1,97	0,717	1,65

TABELA 4

Dia de estudo	Controlo (Abs a 450 nm)	Tratamento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamento 2 (Abs a 450 nm)
0 dias	0,035	0,036	0,033
28 dias	0,065	0,045	0,035
42 dias	0,058	0,065	0,109
56 dias	0,238 ^a	0,543 ^b	0,471 ^b
82 dias	0,033 ^a	0,549 ^b	0,573 ^b

Os valores numa fila que não partilham um super-índice comum diferem significativamente (limiar $P < 0,05$).

TABELA 5

Dia de estudo	Controlo (Abs at 450 nm)	Tratamento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamento 2 (Abs a 450 nm)
0 dias	0,079	0,104	0,091
28 dias	0,220	0,229	0,215
42 dias	0,228	0,296	0,358
56 dias	0,306 ^a	0,401 ^a	0,681 ^b
82 dias	0,178	0,179	0,252

Os valores numa fila que não partilham um super-índice comum diferem significativamente (limiar $P < 0,05$).

EXEMPLO 7

Foi completada uma experiência com ovelhas para investigar a capacidade da composição Experimental do Exemplo 1 para aumentar a imunidade adaptativa em resposta ao protocolo de vacinação de *E. coli* J5 que foi empregue no Exemplo 6. Os animais (doze animais por tratamento) foram atribuídos a três tratamentos: Controlo, Tratamento 1 (3 gramas por cabeça por dia da composição Experimental do Exemplo 1) ou Tratamento 2 (6 gramas por cabeça por dia da composição Experimental do Exemplo 1). Os animais foram alimentados com estas dietas durante 75 dias e foram vacinados com a vacina J5 da Pfizer nos dias 7, 21 e 35 do ensaio. Amostras de sangue foram tomadas nos Dias 0, 35 e 75. Amostras de sangue foram também tomadas no Dia 90 após a composição do Tratamento 1 ou do Tratamento 2 ter sido retirada da dieta para determinar se a composição tinha a capacidade de manter o título.

Neste estudo, foi utilizado um anticorpo secundário (de coelho anti-IgG de ovino conjugado com HRP: Beth Laboratories, Montgomery, Texas) que reconhecia ambos os isotipos de ovelha IgG1 e IgG2. A Tabela 6 e a Fig. 9 mostram os dados das fracções combinadas de IgG1 e IgG2 de ovelha. Os métodos utilizados neste estudo para conduzir o ELISA foram idênticos aos delineados no Exemplo 6 excepto que foi utilizado um anticorpo anti-IgG de ovino (VMRD, Pullman, WA).

No Dia 35, a dose elevada da composição Experimental casou uma elevação no total dos títulos de IgG1 e IgG2. No

Dia 75, as doses baixa e elevada da Composição causaram um aumento gradual no título de J5. Especificamente, a dose baixa causou um aumento de 17% no título e a dose elevada causou um aumento de 31% no título de J5. No Dia 90, os animais com Tratamento 1 não tinham uma elevação no título em comparação com os animais alimentados com controlo. No entanto, os animais no Tratamento 2 que receberam a dose elevada da Composição exibiram uma elevação de 24% no título de J5.

Estes dados apoiam as observações da Experiência 6 por a administração da composição Experimental ter aumentado o desenvolvimento do título dentro da fracção de IgG1 e IgG2 e mantido o título após a retirada da composição Experimental da dieta durante mais 15 dias.

TABELA 6

Dia de estudo	Controlo (U de Abs a 450 nm)	Tratamento 1 (U de Abs a 450 nm)	Tratamento 2 (U de Abs a 450 nm)
0 dias	0,174	0,173	0,173
35 dias	0,270	0,285	0,336
75 dias	0,350	0,410	0,460
90 dias	0,376	0,379	0,469

O invento tendeu a aumentar o título de J5 nas fracções de IgG combinadas embora os valores de P fossem superiores ao do limiar $P < 0,05$.

Lisboa, 2011-12-26

REIVINDICAÇÕES

1. Combinação, compreendendo:
 - uma vacina;
 - uma composição compreendendo β -1,3(4)glucanos, β -1,3(4)-endoglucano-hidrolase, terra diatomácea, uma argila mineral, e glucomanano;para utilização no aumento da eficácia da vacina, em que a composição é dada a um animal desde antes do início do protocolo de vacinação, de modo que o título dos anticorpos para a vacina aumenta relativamente ao título de anticorpos para a vacina na ausência da composição.
2. Combinação da reivindicação 1, em que a composição é dada em quantidades de 0,01 gramas a 1,0 grama por quilograma de peso corporal vivo do animal.
3. Combinação de acordo com a reivindicação 1, em que a vacina é uma vacina de mastite.
4. Combinação de acordo com a reivindicação 2, em que a vacina de mastite é a vacina J5 da Pfizer.
5. Combinação de acordo com a reivindicação 1, em que o título das classes de anticorpos IgG1 e IgG2 para a vacina aumenta na presença da composição relativamente ao título dos anticorpos IgG1 e IgG2 na ausência da composição.
6. Combinação de acordo com a reivindicação 1, em que o título da classe de anticorpos IgG1 para a vacina aumenta relativamente ao título de anticorpos IgG1 na ausência da composição.
7. Combinação de acordo com a reivindicação 1, em que o título da classe de anticorpos IgG2 para a vacina aumenta relativamente ao título dos anticorpos IgG2 na ausência da composição.
8. Combinação de acordo com a reivindicação 1 em que o título aumentado das classes de anticorpos IgG1 e IgG2 para a vacina é mantido após a retirada da composição de uma dieta.

9. Combinação de acordo com a reivindicação 1, em que o título aumentado dos anticorpos da classe IgG1 para a vacina é mantido após a retirada da composição de uma dieta.

10. Combinação de acordo com a reivindicação 1, em que a composição é combinada com a ração dos animais.

11. Combinação da reivindicação 10, em que a composição é dada a animais no intervalo de cerca de 0,01% a cerca de 2,5% em peso da ração numa base de peso seco.

12. Combinação de acordo com a reivindicação 1-4 para utilizar no aumento da eficácia da vacina em gado.

13. Combinação de acordo com a reivindicação 12, em que o gado é gado bovino ou ovino.

14. Combinação de acordo com a reivindicação 13 em que a composição é administrada a gado bovino no intervalo de cerca de 10 gramas a cerca de 60 gramas por dia por animal.

15. Combinação de acordo com a reivindicação 13 em que a composição é administrada a ovelhas no intervalo de cerca de 2 gramas a cerca de 10 gramas por dia por animal.

16. Combinação de acordo com a reivindicação 1 em que a vacina é uma vacina para rinotraqueíte infecciosa bovina, parainfluenza de tipo 3, vírus de diarreia bovina, vírus sincicial respiratório bovino, rotavírus, coronavírus, *Campylobacter sps.*, *Pasteurella sps.*, conjuntivite, *Salmonella sps.*, *Clostridium sps.*, *Leptospirose*, Brucelose, doença de Newcastle, varíola aviária, erisipela, cólera aviária, Vírus da Doença de Marek, Vírus da Bronquite Infecciosa, encefalomielite aviária, coccidiose, rinopneumonite, gripe equina, *Streptococcus equi*, arterite viral equina, erliquiose monocítica equina, encefalomielite, encefalite do Nilo Ocidental, raiva, parvovírus, adenovírus, *Bordetella*, doença de Lyme, *Giardia*, vírus do sarampo, hepatite A, hepatite B, difteria ou poliomielite.

17. Combinação de acordo com a reivindicação 1 em que a composição é um pó seco solto adequado para inclusão directa

numa ração, produto alimentar comercialmente disponível ou como suplemento para uma ração total mista ou dieta.

18. Combinação de acordo com a reivindicação 17, em que a composição é combinada com ração sólida, ração líquida ou água.

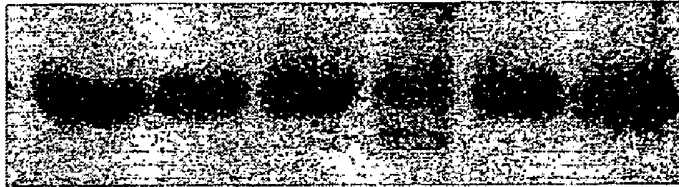
19. Combinação de acordo com a reivindicação 1 em que a composição é dada ao animal desde antes do início do protocolo de vacinação e continuando após o início do protocolo de vacinação.

Lisboa, 2011-12-26

Fig. 1.

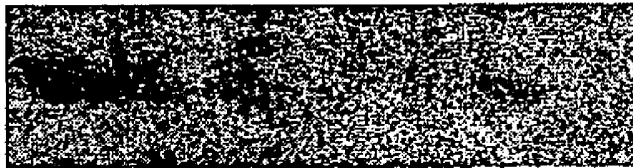


Controlo



Experimental

Fig. 2.



Controlo



Pó



Grânulos
160°F



Grânulos
180°F

Fig. 3.

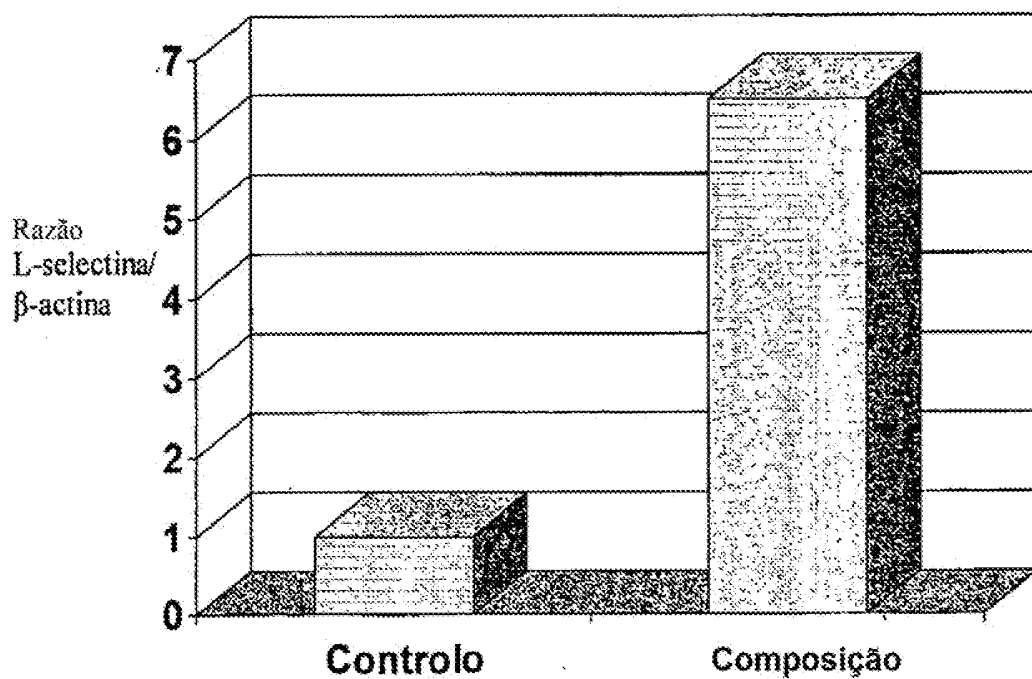
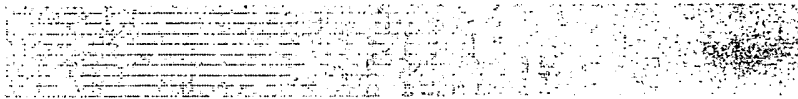
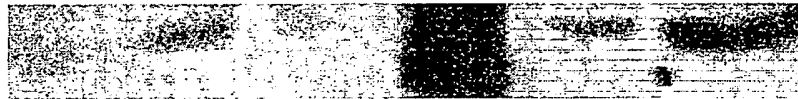


Fig. 4.



Controlo



Experimental

Fig. 5

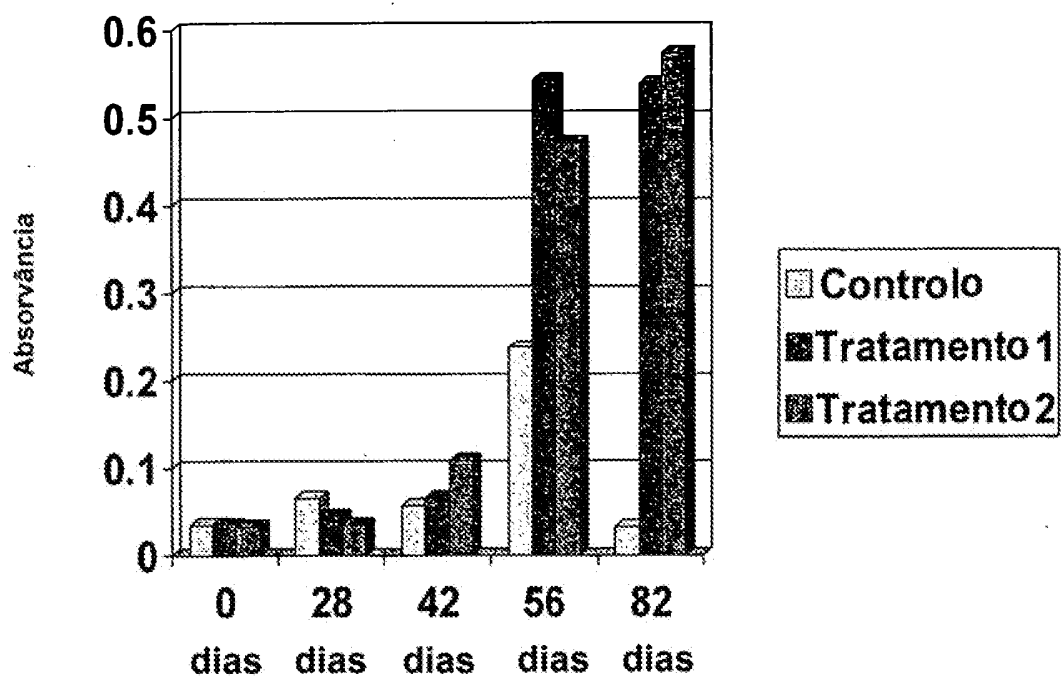


Fig. 6.

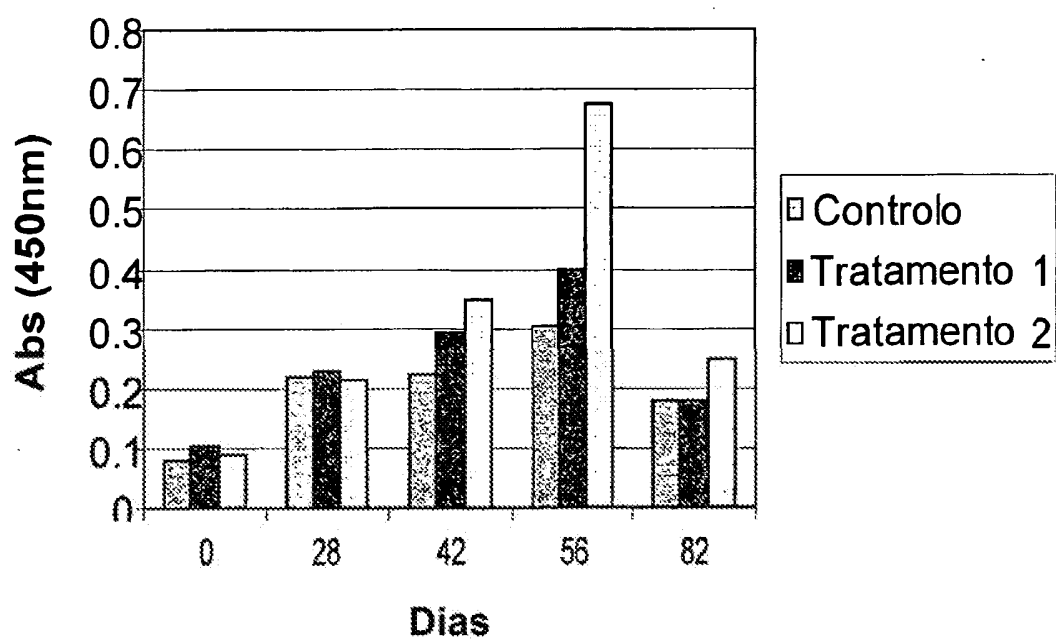


Fig. 7

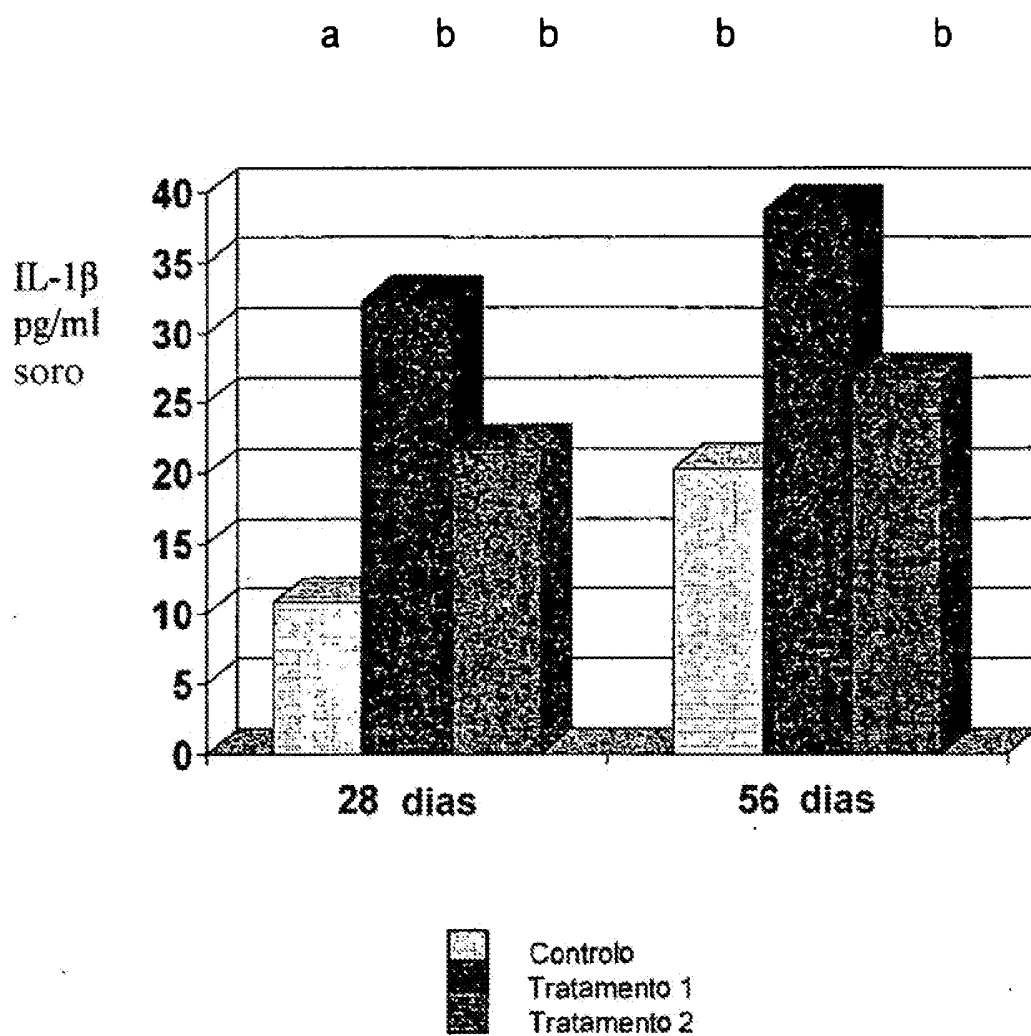


Fig. 8.

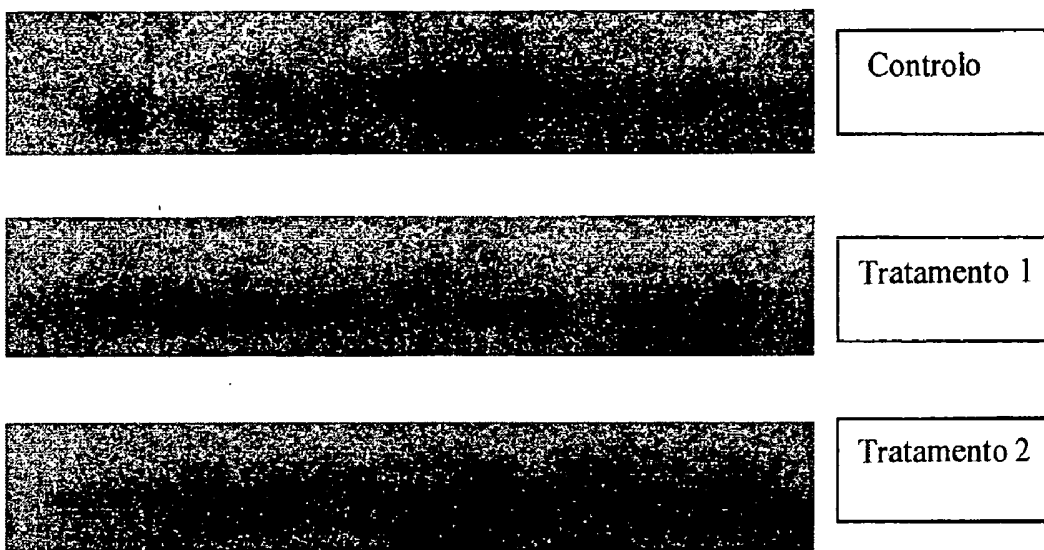


Fig. 9

