

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

(21) **PI0711073-1 A2**

(22) Data de Depósito: 19/04/2007
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)



(51) Int.Cl.:

A61K 31/715 2006.01
A61K 31/716 2006.01
A61K 35/02 2006.01
A61K 45/06 2006.01
A61K 31/736 2006.01
A61K 38/47 2006.01

(54) Título: **AUMENTO DE TÍTULO POR VACINAÇÃO EM ANIMAIS**

(30) Prioridade Unionista: 26/04/2006 US 11/380,359

(73) Titular(es): Omnigen Research, LLC

(72) Inventor(es): Neil Elliott Forsberg, Steven Bruce Puntenney

(74) Procurador(es): M C Araújo Consultoria em Prop
Indl Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT US2007066968 de 19/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/127667 de 08/11/2007

(57) Resumo: AUMENTO DE TÍTULO POR VACINAÇÃO EM ANIMAIS A invenção refere-se a uma composição adicionada à ração animal usada em combinação com uma vacina para aumentar a efetividade da vacina. Entre outros efeitos, a composição aumenta o título de anticorpos da vacina.

**PI0711073-1****AUMENTO DE TÍTULO POR VACINAÇÃO EM ANIMAIS****Descrição****Campo Técnico**

A invenção refere-se a combinações de uma composição e uma vacina que
5 aumenta o título de anticorpos da vacina, e métodos para usar a combinação.

Fundamento

A resposta imune envolve dois sistemas distintos: o sistema inato e o
sistema adquirido (mediado por anticorpos). O sistema inato é um sistema de
evolução antiga que usa uma variedade de estratégias para prevenir infecção. Eles
10 incluem as barreiras de células epiteliais propiciadas pela pele, o trato
gastrintestinal e os revestimentos da glândula pulmonar e mamária. Além disto, o
sistema inato inclui a barreira acídica do estômago (ou abomaso em animais
ruminantes) e as enzimas digestivas do estômago, do pâncreas e do intestino
delgado. Finalmente, o sistema inato inclui os glóbulos brancos, macrófagos e
15 neutrófilos. Estas células reconhecem primeiro os agentes patogênicos por meio
da apresentação de marcadores únicos na superfície dos agentes patogênicos e
então fagocita e destrói os agentes patogênicos.

O sistema inato fornece a resposta imunológica inicial e permite o tempo
necessário para que o sistema de anticorpos adquirido responda e desenvolva os
20 anticorpos necessários para combater uma agente patológico específico.
Normalmente, são necessárias de uma a várias semanas para uma pessoa ou um
animal desenvolver uma resposta de anticorpos. Neste tempo de intervenção, o
organismo depende do sistema inato para eliminar a infecção.

O sistema imune adquirido pode desenvolver anticorpos em resposta a um
25 agente patológico específico, uma toxina, uma substância química ou qualquer
molécula que o organismo reconheça como um agente patológico (por exemplo, o
sistema imune reconhece o antígeno como não-próprio). Quando agentes
patogênicos infectam uma pessoa ou um animal, são apresentados marcadores
celulares específicos associados com o agente patológico às células que
30 produzem anticorpos. O sistema imune adquirido então passa por um processo
denominado "expansão clonal". Especificamente, isto permite a produção de massa
de células que produzem anticorpos que são enviados em direção a um antígeno
específico associado com o agente patológico.

Os anticorpos são sintetizados por células T e Células B. As células T maturam no timo e apresentam anticorpos que estão ligados a suas superfícies extracelulares. As células T circulam então livremente no sangue e através de tecidos linfáticos. A ligação da célula T a um agente patogênico via anticorpo de
5 ligação resulta assim na identificação e subsequente destruição do agente patogênico. Ao contrário, os anticorpos produzidos pelas células B são segregadas no sangue onde elas circulam livremente. Quando os anticorpos produzidos pela célula B se ligam a um agente patogênico, eles iniciam uma cascata de eventos que resultam na identificação e na destruição do agente patogênico. Os anticorpos
10 que são produzidos em resposta à imunização são classificados em isótipos de anticorpos. Os três isótipos de anticorpos mais importantes incluem IgM, IgG1 e IgG2. Outros isótipo incluem, por exemplo, IgA, IgD, IgG3, IgG4 e IgE e, em relação a aves domésticas, o isótipo IgY.

A resposta adaptativa IgM é o primeiro anticorpo produzido pelas células T e
15 B em resposta a um antígeno; entretanto, ele é um anticorpo relativamente “fraco” com afinidade limitada por antígeno e especificidade. Respostas mais “poderosas” de anticorpo estão contidas dentro dos isótipos IgG1 e IgG2; entretanto, o desenvolvimento dos isótipos IgG1 e IgG2 exige períodos mais longos de tempo. As respostas do isótipo IgG em indivíduos grávidos são particularmente
20 importantes, pois estes são os isótipos de anticorpo que são transferidos de uma mãe para o filho via colostro, no momento de nascimento, e que transfere assim a imunidade passiva para o recém-nascido.

A vacinação (também conhecida como imunização) contra doenças é praticada comumente nas indústrias médicas humanas e em rebanhos. Por
25 exemplo, para vacinar contra um agente patogênico, é administrada uma vacina a um animal na forma de uma versão não-infecciosa do agente patogênico ou é administrada somente uma parte do agente patogênico. O sistema imune adquirido responde produzindo anticorpos da vacina. Se o animal for exposto subsequente ao agente patogênico vivo, os anticorpos produzidos em
30 resposta à vacina são rapidamente mobilizados e então reconhece e mira o agente patogênico para destruição.

A indústria da pecuária se baseia nos protocolos de imunização contra doenças específicas de rebanhos para minimizar a morbidade e mortalidade

decorrente de infecções por fungos, vírus e bactérias. Por exemplo, na indústria de laticínios, é comum vacinar animais contra *E. coli*, pois ele é uma das formas mais comuns de infecções da glândula mamária (causando, por exemplo, mastite) o que causa perda de produção e, em casos severos, a perda da vaca.

5 Ocorrem diversos problemas dos protocolos atuais de vacinação. Por exemplo, a eficácia de protocolos de vacinação varia de indivíduo para indivíduo. Especificamente, alguns indivíduos desenvolvem um título mais alto (concentração alta de soro de anticorpos) em resposta a um protocolo de imunização específico, enquanto outros não. Como existe uma correlação direta entre o título de um
10 anticorpo e a resposta do sistema imune a uma infecção, alguns indivíduos permanecem suscetíveis a uma infecção por um agente patogênico, mesmo que tenham sido vacinados. Conseqüentemente, haverá ainda a necessidade de melhorar a efetividade de vacinas para reduzir a incidência de doença em populações animais.

15 **Sumário**

A invenção refere-se a combinações para aumentar a efetividade de vacinas, e métodos para usar as combinações. As combinações da divulgação usam uma composição que possui os seguintes componentes constituintes: β -1,3 (4)-endo-glucano hidrolase, β -1,3 (4) glucano, terra diatomácea calcinada, uma argila mineral
20 e glucomanano. Esta composição é oferecida aos animais que estão prestes a passar por um protocolo de vacinação ou estão passando por um protocolo de vacinação.

As combinações aumentam a efetividade da vacina mediante o aumento da concentração de soro (título) de anticorpos da vacina. A concentração de soro
25 aumentada de anticorpos permanece mesmo quando a composição é retirada da dieta dos animais.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra os resultados de experimentos por método Western Blot que demonstram o efeito da composição na expressão de L-seletina por neutrófilo,
30 conforme descrito no Exemplo 1.

A Figura 2 mostra os resultados por método Western Blot que demonstram os efeitos da composição em formas não aquecidas e aquecidas (peletadas) na expressão de L-seletina por neutrófilo, conforme descrito no Exemplo 2.

A Figura 3 é um gráfico resumindo os efeitos da composição na expressão de mRNA que codifica L-seletina em neutrófilo de rato, conforme descrito no Exemplo 3.

5 A Figura 4 mostra os resultados por método Western Blot que demonstram os efeitos da composição na expressão de interleucina-1 β (IL-1 β) por neutrófilos, conforme descrito no Exemplo 4.

A figura 5 é um gráfico de barras que sumariza os resultados de ELISAs usado para quantificar o título de IgG1 em relação à vacina J5, conforme descrito no Exemplo 6.

10 A Figura 6 é um gráfico de barras que sumariza os resultados de ELISAs usado para quantificar o título de IgG2 em relação à vacina J5, conforme descrito no Exemplo 6.

15 A Figura 7 é um gráfico de barras que ilustra os efeitos de uma dose baixa (15 gramas/dia) e dose alta (30 gramas/dia) da composição na expressão de interleucina-1 β em gado para abate, conforme descrito no Exemplo 6.

A Figura 8 mostra os resultados a partir do método Western Blot que demonstram os efeitos da composição na expressão de L-seletina por neutrófilo em gado para abate, conforme descrito no Exemplo 6.

20 A Figura 9 é um gráfico de barras que sumariza os resultados de ELISAs usado para quantificar o total de título de IgG1 e IgG2, conforme descrito no Exemplo 7.

Descrição das Versões Preferidas

Conforme requerido, as versões detalhadas da presente composição estão descritas neste documento; entretanto, é importante considerar que as versões
25 descritas são meros exemplos da invenção, que pode ser configurada de várias formas diferentes. Portanto, os detalhes específicos divulgados neste documento não devem ser interpretados como limitações, mas sim, serem usados simplesmente como base para as reivindicações e como uma base representativa de instrução para um versado na arte sobre como empregar de forma variada a
30 presente composição em virtualmente qualquer forma apropriada.

A presente invenção trata das combinações que aumentam a função imunológica em animais, e métodos para usar as combinações. De modo geral, as combinações da divulgação usam uma combinação que possui os seguintes

componentes constituintes: β -1,3 (4)-endo-glucano hidrolase, β -1,3 (4) glucano, terra diatomácea calcinada, uma argila mineral e glucomanano. A composição é usada em combinação com uma vacina, de forma que a ingestão da composição pelo animal aumenta a efetividade da vacina. Conforme definido neste documento, uma vacina estimula o sistema imunológico, incluindo a produção de anticorpos quando administrada a um animal. Uma indicação de uma efetividade aumentada de uma vacina é um título aumentado de anticorpos em resposta ao antígeno da vacina no soro do animal.

A combinação pode ser usada efetivamente na ração para indivíduos ou animais em muitas espécies, como os mamíferos, incluindo os seres humanos e espécies aviárias. Em uma versão preferida, as combinações são usadas em mamíferos de rebanho. As combinações podem ser usadas igualmente bem com ruminantes e não-ruminantes. Entre os exemplos de ruminantes estão: por exemplo, gado, carneiros, cabritos, vacas, cervo, bisão e búfalo. Entre os não-ruminantes estão: suínos, cavalos, porcas e outros. Em uma versão particularmente preferida, as composições da composição são usadas em ovinos e rebanho bovino.

Em uma versão, a composição é oferecida a um animal durante o período em que o animal está passando por um protocolo de vacinação. Um protocolo de vacinação comum exige a administração de pelo menos uma e, normalmente, várias doses da vacina, durante um período definido, para aumentar a estimulação do sistema imune e a produção dos anticorpos. Em uma versão preferida, a composição é oferecida diariamente a um animal, começando antes do início do protocolo de vacinação e continuando após o início do protocolo de vacinação. Em versões alternativas, a composição pode ser dada a um animal, começando após o início do protocolo de vacinação ou simultaneamente ao início do protocolo.

A vacina da combinação pode inferir uma resposta a um agente patogênico, uma toxina, uma droga ou outras moléculas. A vacina pode ser uma vacina de DNA onde uma molécula de DNA que codifica um antígeno é injetada em um animal, resultando em síntese de antígeno e, conseqüentemente, uma resposta imunológica ao antígeno. Em uma versão preferida, a vacina da combinação estimula a produção de anticorpos para um agente patogênico que causa doença. Em uma versão particularmente preferida, a vacina estimula a produção de anticorpos contra agentes patogênicos que causa mastite. A vacina J5 é uma

destas vacinas contra mastite disponíveis comercialmente (comercializada pela Pfizer).

Outros exemplos de agentes patogênicos e doenças contra os quais os seres humanos e animais são comumente vacinados e que podem se beneficiar de um protocolo que aumenta a eficácia incluem, como exemplo, ritotraqueite infecciosa bovina (IBR), parainfluenza tipo 3 (PI3), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), rotavírus, coroavírus, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella spp.*, pinkeye, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, Leptospirose, Brucelose, Doença de Newcastle, em ave comestível, erisipela, cólera de ave comestível, Vírus de Doença de Marreco (MDV), Vírus de Bronquite Infecciosa (IBV), encefalomielite aviária, coccidiose, rinopneumonite, influenza eqüina, *Streptococcus equi*, arterite viral eqüina, Ehrlichiose monocítica eqüina, encefalomielite, encefalite West Nile, raivas, parvovírus, adenovírus, bordetela, doença de Lyme, Giárdia, Pertussus, vírus measles, hepatite A e B, difteria e poliomielite.

Os componentes constituintes da composição são preparados por métodos conhecidos comumente na arte e podem ser obtidos de fontes comerciais. O β -1,3 (4)-endo-glucano hidrolase é produzido da fermentação submersa de uma trilha de uma classe de *Trichoderma longibrachiatum*. A terra diatomácea está disponível como um produto lavado com ácido e disponível comercialmente com 95% de sílica (SiO_2) e com seus componentes restantes não ensaiados, mas consistindo, principalmente, de cinza (minerais), conforme definido pela Associação dos Químicos Analíticos (AOAC, 2002). O β -1,3 (4) glucano e glucomanano podem ser de preparações comerciais de extrato de parede de célula de leveduras derivada, principalmente, de levedura desativada (*Saccharomyces cerevisiae*) com sua composição química mostrada na Tabela 1:

TABELA 1

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

As argilas minerais (aluminossilicatos) usadas nesta composição podem ser qualquer uma de uma variedade de argilas disponíveis comercialmente, como exemplos, a argila montmorilonite, bentonita e zeólita.

Em uma versão preferida da combinação β -1,3 (4)-endo-glucano hidrolase, terra diatomácea, glucano e glucomanano, e argila mineral são combinados peso por peso para ficarem respectivamente na faixa de aprox. 0,05-3%, 1-40%, 1-20% e 40-92%. Em outra versão preferida, β -1,3 (4)-endo-glucano hidrolase, terra diatomácea, glucano e glucomanano e argila mineral são combinados respectivamente a 0,1-3%, 5-40%, 2-15% e 40-80%. Em uma versão especialmente preferida, β -1,3 (4)-endo-glucano hidrolase, terra diatomácea, glucano, glucomanano e argila mineral são combinados, respectivamente, a 0,2-3%, 20-40%, 4-10% e 50-70%.

Em uma versão, a composição é um pó seco e sem fluidez e adequado para ser inserido em uma ração disponível comercialmente, produto alimentar ou como um suplemento a uma taxa mista total ou dieta. O pó pode ser misturado com uma ração líquida ou sólida ou com água. Em outra versão, a composição é formada em peletes.

Em uma versão, quando incorporada diretamente nas rações, a composição pode ser adicionada em quantidades que variam de aprox. 0,1 a aprox. 20 kg por tonelada (2000 libras) de ração. Em uma versão preferida, a composição é adicionada a alimentos para animais ou a alimentos em quantidades que variam de aprox. 0,5 kg a aprox. 10 kg por tonelada de ração. Em uma versão especialmente preferida, a composição pode ser adicionada a rações em quantidades que variam entre aprox. 1 a 5 kg por tonelada de ração.

Quando expresso como uma percentagem de material seco de ração, a presente composição pode ser adicionada a alimentos de animais ou a alimentos em quantidades que variam de aprox. 0,01 a aprox. 2,5% por peso, preferencialmente de aprox. 0,0125% a aprox. 2% por peso. Em uma versão preferida, a composição é adicionada a alimentos de animais ou a alimento em quantidades que variam de aprox. 0,05 a 1,5% de peso, preferencialmente de aprox. 0,0625% a aprox. 1% de peso. Em uma versão especialmente preferida, a presente composição é adicionada a quantidades de aprox. 0,1 a aprox. 0,7% de peso, preferencialmente de aprox. 0,125% a aprox. 0,5% de peso de ração.

Alternadamente, a composição da presente combinação pode ser oferecida diretamente ao mamífero ou a aves como um suplemento em quantidades de aprox. 0,01 grama a aprox. 1 grama por quilograma de peso corporal vivo, preferencialmente de aprox. 0,012 grama a aprox. 0,5 gramas por quilograma de peso corporal vivo, mais preferencialmente de aprox. 0,016 grama a aprox. 0,37 grama por quilograma de peso corporal vivo, por dia. Em uma versão especialmente preferida, a composição pode ser oferecida para uso com várias espécies em quantidades que variam de aprox. 0,05 gramas a aprox. 0,20 gramas por quilograma de peso corporal vivo, por dia.

Como exemplos, a composição pode ser oferecida a ovinos em uma faixa de aprox. 2 gramas por cabeça, por dia a aprox. 8 gramas por cabeça, por dia. Para bovinos, a composição pode ser oferecida em uma faixa de aprox. 10 gramas por cabeça, por dia, a aprox. 60 gramas por cabeça, por dia. Uma pessoa versada na arte pode observar que a quantidade da composição oferecida aos animais pode variar dependendo das espécies animais, do tamanho do animal e do tipo de ração a que a composição é adicionada.

São descritos agora exemplos que ilustram os conceitos da composição com certo nível de especificidade.

EXEMPLO 1

Um experimento foi conduzido com ovinos com o objetivo de determinar a capacidade da composição de aumentar a expressão de L-seletina por neutrófilo, um marcador do sistema imune inato, em animais imunossuprimidos. Os animais (seis por Grupo) foram divididos em 2 Grupos: controle e Experimental. O grupo de Controle recebeu uma taxa altamente calórica que consistia de feno cortado disponível *ad libitum* (à vontade), 0,45 kg (1 lb) de milho hidrolizado, por cabeça, por dia e 0,45 kg (1 lb) de trigo cozido comum, por cabeça, por dia por um período de 28 dias. Durante este tempo, eles também receberam injeções duas vezes ao dia de dexametasona, uma droga imunossupressiva; O grupo Experimental recebeu ingestão diária da composição (5 gramas por cabeça, por dia) por 28 dias e recebeu a mesma dieta e o protocolo de ingestão de dexametasona, como o grupo de Controle. A composição do grupo Experimental foi de 65,8% em peso de argila mineral, 0,20% em peso de endo-glucano hidrolase, 9,0% em peso de glucanos e glucomanano, e 25% em peso de argila diatomácea calcinada. No final

do estudo, as amostras de sangue foram colhidas e os neutrófilos foram purificados usando centrifugação em gradiente de Percoll. As quantidades de expressão de L-seletina por neutrófilos foram avaliadas usando técnicas de Western Blot e anticorpos específicos para L-seletina.

5 Conforme mostrado na Figura 1, painel superior, os animais que não receberam a composição tinham baixa e variável expressão de L-seletina. Conforme mostrado na Figura 1, painel inferior, os animais que receberam a composição demonstraram um aumento consistente na expressão de L-seletina. O painel inferior representa seis animais imunossuprimidos Experimental que
10 receberam a composição em suas dietas.

EXEMPLO 2

Neste estudo, a estimulação do sistema imune inato em ovinos foi examinada quando a composição Experimental do Exemplo 1 foi fornecida em uma dieta peletada. Uma dieta básica consistia de 21,55% de cevada, 10,0% de canola,
15 5% de grãos de destilação, 40% de milho hidrolizado, 1,50% de calcário, 0,01% de sulfato de manganês, 0,01% de microvitamina E, 4,0% de melaço, 0,25% de monocal, 0,25% de cloreto de potássio, 0,60% de cloreto de sódio, 0,03% de selenita de sódio, 15,79% de trigo comum, 0,01% de sulfato de zinco, 0,75% de sulfato de amônia e 0,25% de sulfato de cobalto. Quando a composição Experimental foi
20 adicionada a esta dieta, ela foi incluída a 0,6%, substituindo aquela porção de trigo comum. Vinte oito ovinos foram escolhidos para 4(quatro) tratamentos que consistiram de um grupo de Controle, um grupo que recebeu a composição Experimental em forma de pó, um grupo que recebeu a composição Experimental em forma peletada, onde os peletes foram formados a uma temperatura de
25 71,11° C (160° F), e um grupo que recebeu a composição Experimental em forma peletada, onde os peletes foram formados a 82,22° C (180° F). Todos os animais foram imunossuprimidos via injeção diária de dexametisona.

O estudo foi conduzido usando métodos idênticos ao Exemplo 1, exceto pelo fato de que a composição foi administrada em peletes que foram fabricados a altas
30 temperaturas. O objetivo deste estudo foi o de determinar se o aquecimento da composição (conforme requerido para formação de pelete) poderia desativar a capacidade da composição de aumentar a imunidade inata. Conforme mostrado na Fig. 2, os ovinos (de controle) que não receberam a composição, expressaram

muito poucos níveis de L-seletina por neutrófilos. A provisão da composição Experimental, mesmo na forma de pelete (aquecido), ainda assim aumentou a expressão de L-seletina por neutrófilo.

Na Fig. 2, o painel mais superior representa a expressão de L-seletina por neutrófilo em animais imunossuprimidos alimentados com uma dieta de controle sem a composição. O segundo painel (pó) representa a expressão de L-seletina em animais imunossuprimidos que receberam a composição Experimental em forma mista livremente e não aquecida, conforme no Exemplo 1 (grupo Experimental). Os painéis 3 e 4 representam a expressão de L-seletina por neutrófilo em animais imunossuprimidos que receberam a composição Experimental em formas peletadas. Os peletes usados no painel 3 foram formados mediante aquecimento a 71,11° C (160° F) e no painel 4 os peletes foram aquecidos a 82,22° C (180° F) durante a fabricação das rações.

EXEMPLO 3

Um experimento foi realizado com ratos para investigar se a composição tinha a capacidade de aumentar a imunidade inata em um modelo não-ruminante. Neste estudo, os ratos foram escolhidos para um ou dois tratamentos: Um grupo de Controle (dieta não-suplementada) e um grupo Experimental, onde a composição do Exemplo 1 foi adicionada à dieta a 1% de peso seco de ração. Neste experimento, os ratos foram alimentados com ração de rato comum comercial com ou sem composição Experimental. A imunossupressão usando os protocolos de injeção de dexametasona não foi utilizada neste estudo. Após 14 dias, foram coletadas amostras de sangue dos ratos anestesiados via perfuração cardíaca. Os neutrófilos foram isolados das amostras de sangue usando centrifugação em gradiente de Percoll e o RNA total foi isolado usando TriZol.

A concentração de RNA mensageiro (mRNA) que codifica L-seletina de rato em amostras de RNA de neutrófilo foi então determinada por reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa quantitativa (QRT-PCR) usando cápsulas que foram especificamente desenvolvidas para ensaio de L-seletina de rato. As quantidades de mRNA com L-seletina foram padronizadas mostrando-as como uma proporção do mRNA da β -actina, que está expresso em todas as células em um nível razoavelmente constante. Conforme mostrado na Figura 3, e de acordo com os resultados dos Exemplos 1 e 2, a composição aumentou a expressão de

mRNA com L-seletina em mais de 6 vezes ($P < 0,05$).

Este estudo demonstrou que a expressão aumentada de proteína de L-seletina, conforme mostrado pela técnica de Western Blot nos Exemplos 1 e 2 pode ser causada por um aumento de mRNA que codifica esta proteína. Isto
5 implica que a composição altera a taxa de transcrição do gene que codifica a L-seletina.

EXEMPLO 4

Os neutrófilos, as células do sistema imunológico inato, são capazes de sinalizar e, em consequência, aumentar a produção de anticorpos pelo sistema
10 imune adquirido através da secreção de interleucina-1 β (IL-1 β). Para analisar a capacidade da composição de induzir os neutrófilos a aumentarem a síntese de IL-1 β , a concentração de IL-1 β foi avaliada em neutrófilos colhidos do mesmo ovino, conforme descrito no Exemplo 1. Para completar o estudo, foram usados o método Western Blot e anticorpos específicos para IL-1 β .

Conforme mostrado na Figura 4, os animais que não receberam a provisão
15 diária da composição continham virtualmente níveis indetectáveis de IL-1 β ; entretanto, a provisão da composição aos animais causou um aumento significativo na expressão de IL-1 β ($P < 0,05$). Na Figura 4, o painel superior representa 6 animais imunossuprimidos com ração de Controle. O painel inferior representa 6
20 animais imunossuprimidos com ração-composição Experimental que receberam a composição. As concentrações de IL-1 β foram determinadas usando a análise por Western Blot e um anticorpo específico para IL-1 β .

Estes dados indicam que a composição possui a capacidade não somente de aumentar os marcadores de imunidade inata (por exemplo, L-seletina; Exemplos
25 1, 2 e 3), mas também aumenta a expressão da molécula sinalizante chave (por exemplo, IL-1 β) que aumenta o sistema imune adaptativo.

EXEMPLO 5

A meta deste experimento foi o de determinar quais genes foram expressados diferencialmente em neutrófilos seguinte à alimentação da
30 composição para gado leiteiro periparturiente. Neste estudo, o mecanismo(s) pelo qual a composição aumentou a expressão de IL-1 β por neutrófilos foi examinado. O gado leiteiro periparturiente é um bom modelo, porque o estresse da gravidez leva à imunossupressão, tornando as vacas particularmente suscetíveis à infecção.

Neste experimento 8 vacas leiteiras periparturientes foram escolhidas para uma dieta de Controle que não tinha a composição Experimental e 8 vacas foram escolhidas para um grupo Experimental que recebeu a composição do Exemplo 1 em suas dietas (56 gramas por dia, por cabeça). Os animais foram alimentados com a dieta por aprox. 28 dias até o parto. 12 a 15 horas após o parto, 500 ml de amostras de sangue foram colhidas via perfuração jugular e os neutrófilos foram preparados via centrifugação em gradiente de Percoll de larga escala.

O RNA foi isolado dos neutrófilos usando o método TriZol e então transcrito-reverso em cDNA usando transcriptase reversa. Durante a transcrição reversa, foram empregados corantes baseados em nucleotídeos coloridos diferentemente (Cy3 e Cy5) de forma que os DNAs (cDNAs) complementares sintetizados de dois grupos de tratamentos diferentes (Controle e Experimental) incorporaram diferentes cores. As amostras de cDNA dos grupos Experimental e de Controle foram então aplicadas a uma lâmina de *microarray* (que são pequenos suportes sólidos nos quais milhares de seqüências codificadoras de genes estão imobilizadas, ou ligadas de forma organizada em posições conhecidas) BoTL-5. Este *microarray* foi preparado no Centro Genômico Funcional Animal da Universidade do Estado de Michigan e contém 1500 genes (cada um seqüenciado 3 vezes) em uma lâmina de vidro. Permitiu-se que os cDNAs gerados das amostras do Grupo Experimental e de Controle competissem para ligação aos 1500 genes no *array* e a expressão relativa dos genes foram então avaliadas comparando-se a abundância relativa de sinais de Cy3 e Cy5 em cada ponto no *array*. Os dados foram então analisados estatisticamente para identificar aqueles genes que foram expressos de forma diferente (aqueles genes onde $P < 0,05$).

Os resultados mostraram que mais do que 20 genes foram expressos de forma diferente ($P < 0,05$) nos neutrófilos bovinos colhidos do grupo Experimental. A enzima conversora de Interleucina (ICE) foi uma destes genes aumentados. Isto foi confirmado usando QRT-PCR e cápsulas para seqüência ICE bovina. A ICE é uma enzima limitadora de taxa na conversão de pro-IL-1 β inativo para o ativo e secretado IL-1 β . Assim, a composição pode aumentar a imunidade adaptativa (por exemplo, aumentando o título de anticorpo) através de sua habilidade de aumentar a expressão da atividade de ICE em por neutrófilo e, conseqüentemente, a

secreção de IL-1 β .

EXEMPLO 6

Para testar a hipótese de que a composição aumentou a efetividade de uma vacina, foi examinado o desenvolvimento de título seguinte ao protocolo de vacinação. Dezoito gados de abate (seis gados em cada grupo) foram designados para um dos 3 grupos: Controle, 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 se consistiu de uma dieta de feno de grama que foi oferecida *ad libitum* (à vontade) com um suplemento diário que fornecia 14% de proteína crua, 3% de gordura crua e 20% de fibra crua (Tabela 2). Foram dadas aos animais 5,44 kg (12 lb) deste suplemento por cabeça, por dia durante todo o experimento. A composição Experimental do Exemplo 1 foi misturada diretamente a este suplemento, de forma que fossem esperadas ingestões de 15 gramas por cabeça, por dia; e 30 gramas por cabeça, por dia foram administrados respectivamente para os indivíduos do Tratamento 1 e 2.

Os animais receberam estes tratamentos de dieta por 56 dias após o que a composição foi retirada da dieta dos Tratamentos 1 e 2. Todos os animais foram mantidos na mesma dieta de controle sem a composição até o 84^o dia. Nos dias 7, 21 e 35 do experimento, todos os animais receberam uma vacina *E. coli* J5 (da Pfizer). Este protocolo de vacinação (ou seja, 3 injeções, 14 dias de intervalo) seguiu as recomendações do fabricante. Esta vacina é usada comercialmente na indústria de gado leiteiro como um meio de reduzir a probabilidade de mastite coliforme. Uma limitação a esta vacina, e a maioria das outras vacinas, é a resposta variável e limitada em título.

As amostras de sangue foram colhidas usando perfuração jugular nos dias 0, 14^o, 28^o, 42^o e 56^o, e neste último dia a composição foi removida da dieta dos animais. Todos os animais permaneceram em uma dieta comum sem a composição até o 84^o dia. Foram colhidas também amostras de sangue no 82^o dia para determinar se as mudanças em título induzidas pela composição foram mantidas seguinte a sua retirada da dieta. O soro de todos os animais foi preparado por centrifugação. As concentrações de anticorpos específicos para a vacinação com *E. Coli* J5 foram avaliadas em três frações diferentes de imunoglobulina (IgM, IgG1 e IgG2) usando os ensaios imunosorventes ligados à

enzima (ELISAs). Para analisar os títulos de *E. coli* J5 nas frações de imunoglobulina IgG1 e IgG2, uma cultura de *E. coli* (obtida do Dr. Jeanne Burton, Centro de Genômica Funcional Animal, Departamento de Ciências Animal, Universidade do Estado de Michigan) foi cultivada, colhida e usada para cobrir
 5 placas de 96 poços. Subseqüentemente, as amostras de soro (diluído 1:5000) dos animais foram adicionadas aos poços individuais nas placas cobertas e incubadas por uma hora para que os anticorpos no soro animal se ligasse ao antígeno *E. coli* J5. As placas ELISA foram lavadas com solução salina fosfatada (PBS) contendo Tween-20.

10 Os anticorpos secundários (peroxidase de rábano silvestre (HRP) – conjugado anti-bovino ovino) que se liga especificamente ao IgM, IgG1 ou IgG2 bovino (Beth Laboratórios, Montgomery, TX) foram adicionados às placas lavadas. Os anticorpos secundários foram conjugados à peroxidase de rábano silvestre. Após a incubação por mais uma hora com os anticorpos secundários, as placas
 15 foram lavadas novamente com PBS e Tween-20. O substrato de peroxidase TMB (tetrametilbenzideno) foi adicionado às placas e a reação de cor resultante foi quantificada através da medição da absorvência a 450 nm usando uma leitora de placa ELISA.

Conforme mostrado na Tabela 3, a composição Experimental não teve
 20 qualquer efeito (no limiar de $P < 0,05$) no desenvolvimento de título de *E. coli* J5 associado com o isótipo de anticorpo IgM. Entretanto, a composição estimulou e manteve o título de J5 em isótipo de anticorpo IgG1 e IgG2 conforme mostrado nas Figuras 5 e 6 e nas Tabelas 4 e 5.

O título de IgG1 aumentou no 56º dia ($P < 0,05$) em animais que tinham
 25 recebido os tratamentos 1 e 2 (Tabela 4 e Figura 5). Até o 82º dia, o título em animais de Controle tinha caído novamente para os níveis de pré-experimento do dia 0). Contudo, os animais que tinham sido alimentados com a ração do Tratamento 1 e Tratamento 2 tinham elevado o título de J5, em comparação aos animais de Controle ($P < 0,05$). De fato, os animais que tinham recebido o
 30 Tratamento 1 ou 2 não demonstraram perdas de título de IgG1, uma vez que a invenção tinha sido removida da dieta após a 56º dia (Tabela 4 e Figura 5).

Conforme mostrado na Tabela 5 e Figura 6, com respeito à fração de IgG2, a adição de 15g por cabeça, por dia (Tratamento 1) ou 30g por cabeça, por dia

(Tratamento 2) da composição causou um aumento progressivo no título de IgG2 ligados a J5 no 42º dia (ou seja, a dose mais alta elevou o título em até 57% e a dose menor em até 30% comparada com a de Controle), embora este efeito não fosse importante estatisticamente a $P < 0,05$ (o valor de P foi 0,16). Após o 56º dia, o Tratamento 2 (o com dose mais alta da Composição) causou uma elevação importante no título de J5 ($P < 0,05$). O Tratamento 1 (dose menor da composição) causou uma elevação no título J5 dentro da fração de IgG2 neste intervalo de tempo embora este efeito não fosse importante estatisticamente a um limiar de $P < 0,05$ (valor de $P = 0,12$). No 82º dia do estudo, após a composição ter sido retirada da dieta, os animais alimentados com a dose mais alta da composição tiveram um título elevado dentro da fração IgG2 (aumento de 14% comparado ao Controle); entretanto, este efeito não foi significativo no limiar de $P < 0,05$ (valor de $P = 0,09$).

Estes dados indicam que a composição conseguiu aumentar o título e, ainda, manter o título na fração de IgG1 seguinte a retirada da composição da dieta ($P < 0,05$). A composição também conseguiu aumentar o desenvolvimento de título dentro da fração de IgG2 ($P < 0,05$).

As concentrações de IL-1 β foram examinadas também nas amostras de soro dos animais do grupo de Controle, de Tratamento 1 e Tratamento 2 usando um ELISA para IL-1 β (R+D Systems Minneapolis, MN). Conforme mostrado na Figura 7, os resultados indicaram que o Tratamento 1 e o Tratamento 2 aumentaram as concentrações de soro de IL-1 β após 28 dias. Após o 56º dia, a dose menor da composição também elevou de forma significativa a concentração de soro de IL-1 β ($P < 0,05$). A dose mais alta da composição causou uma elevação numérica no soro de IL-1 β no 56º dia do estudo; contudo, este efeito não foi significativo em $P < 0,05$ (valor de $P = 0,23$). Embora não desejando se basear somente na teoria, a composição pode estimular o sistema imune inato (por exemplo, por meio da ativação de neutrófilo) e os neutrófilos estimulam então o sistema imune adquirido por meio da secreção de IL-1 β . O IL-1 β aumentou de forma específica a capacidade das células B de aumentarem a taxa de desenvolvimento do título de IgG2 e manter o título dentro da fração de IgG1.

As concentrações de proteína de L-seletina por neutrófilos também foram analisadas usando o método Western Blot, como mostrado na Figura 8. A

concentração de mRNA para L-seletina também foi determinada quanto ao estudo de rato (Exemplo 4), mas usando cápsulas bovinas específicas. Concluiu-se que tanto o Tratamento 1 (15 g de composição Experimental/cabeça/dia) como o Tratamento 2 (30 g de composição Experimental/cabeça/dia) aumentaram as concentrações ($P < 0,05$) de L-seletina por neutrófilo comparados ao tratamento de Controle.

TABELA 2

Ingrediente	Percentagem de Suplemento (dieta básica)
Vagem de algodão	32,5
Milho	25,0
Trigo comum	6,25
Canola	7,50
Grãos de destilação	8,73
Calcário	0,75
Dinamite	0,25
Óxido de magnésio	0,15
Alfafa	14,0
Uréia	0,50
Rumensin	0,01
Sulfato de zinco	0,01
Selênio	0,04
Cloreto de sódio	0,30
Melaço	4,00

TABELA 3

Dia de Estudo	Controle (Abs a 450 nm)	Tratamento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamento 2 (Abs em 450 nm)
14º dia	0,477	0,404	0,391
28º dia	0,736	0,409	0,424
42º dia	0,842	0,405	0,408
56º dia	1,97	0,717	1,65

TABELA 4

Dia de Estudo	Controle (Abs a 450 nm)	Tratamento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamento 2 (Abs em 450 nm)
Dia 0	0,035	0,036	0,033
28º dia	0,065	0,045	0,035
42º dia	0,058	0,065	0,109
56º dia	0,238 ^a	0,543 ^b	0,471 ^b
82º dia	0,033 ^a	0,549 ^b	0,573 ^b

Valores dentro de uma faixa que não compartilha significativamente uma diferença de índice superior ($P < 0.05$ limiar).

TABELA 5

Dia de Estudo	Controle (Abs a 450 nm)	Tratamento 1 (Abs a 450 nm)	Tratamento 2 (Abs em 450 nm)
Dia 0	0,079	0,104	0,091
28º dia	0,220	0,229	0,215
42º dia	0,228	0,296	0,358
56º dia	0,306 ^a	0,401 ^a	0,681 ^b
82º dia	0,178	0,179	0,252

Valores dentro de uma faixa que não compartilha significativamente uma diferença de índice superior ($P < 0,05$ limiar).

EXEMPLO 7

Um experimento foi completado com ovinos para investigar a capacidade da composição Experimental do Exemplo 1 de aumentar a imunidade adaptativa em resposta ao protocolo de vacinação com *E. coli* J5 que foi empregado no Exemplo 6. Os animais (doze animais por tratamento) foram alocados em 3 tratamentos: Controle, Tratamento 1 (3 gramas por cabeça, por dia de composição Experimental do Exemplo 1) ou Tratamento 2 (6 gramas por cabeça, por dia de composição Experimental do Exemplo 1). Os animais foram alimentados com estas dietas por 75 dias e foram vacinados com a vacina J5 da Pfizer no 7º, 21º e 35º dias do estudo. As amostras de sangue foram colhidas nos dias 0, 35º e 75º dias, As amostras de sangue também foram colhidas no 90º dia após a composição do Tratamento 1 ou Tratamento 2 terem sido retiradas da dieta para se determinar se

esta composição tinha a habilidade de manter o título.

Neste estudo foi usado um anticorpo secundário (IgG de coelho anti-ovino conjugada a peroxidase: Beth Latoratórios, Montgomery, Texas), que organizou os isótipos de ovino IGG1 e IgG2. A Tabela 6 e Figura 9 mostram os dados das frações de IgG1 e IgG2 de ovino combinadas. Os métodos usados no estudo para conduzir o ELISA foram idênticos àqueles delineados no Exemplo 6, exceto quanto ao fato de que foi usado um anticorpo IgG anti-ovino (VMRD, Pullman, WA).

No 35º dia, a dose alta de composição Experimental causou uma elevação no total de títulos de IgG1 e IgG2. No 75º dia, as doses alta e baixa da composição causaram um aumento progressivo no título de J5. Especificamente, a dose baixa causou um aumento de 17% no título e a dose alta causou um aumento de 31% no título de J5. No 90º dia, os animais no Tratamento 1 não apresentavam uma elevação comparados com os animais do grupo de Controle. Entretanto, os animais do Tratamento 2 que receberam a dose mais alta da composição apresentaram uma elevação de 24% no título de J5.

Estes dados apóiam as observações do Experimento 6 em que a administração da composição Experimental aumentou o desenvolvimento de título dentro da fração IgG1 e IgG2 e manteve o título após a retirada da composição Experimental da dieta por 15 dias adicionais.

TABELA 6

Dia de Estudo	Controle (Abs U a 450 nm)	Tratamento 1 (Abs U a 450 nm)	Tratamento 2 (Abs U em 450 nm)
Dia 0	0,174	0,173	0,173
35º dia	0,270	0,285	0,336
75º dia	0,350	0,410	0,460
90º dia	0,376	0,379	0,469

A invenção tendeu a aumentar o título de J5 nas frações de IgG combinadas, embora os valores de P fossem maiores do que $P < 0,05$ limiar.

Deve-se ficar entendido que as versões da presente composição que foram descritas possuem caráter ilustrativo de algumas das aplicações dos princípios da presente composição. Diversas modificações podem ser feitas por aqueles que são versados na arte sem se afastar do verdadeiro espírito e do escopo da composição.

As várias características que foram descritas neste documento podem ser usadas em qualquer combinação e não estão limitadas às combinações testadas e que estão destacadas especificamente neste documento.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma combinação para aumentar a eficácia de uma vacina, **caracterizada por** compreender:

– uma vacina;

5 – uma composição de β -glucanos, β -1,3 (4)-endo-glucano hidrolase, terra diatomácea calcinada, uma argila mineral e glucomano; e

onde dita composição aumenta o título de anticorpos para a vacina em relação ao título de ditos anticorpos na ausência de dita composição.

10 2. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita composição e dita vacina serem administradas a rebanho.

3. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita composição ser adicionada à ração de animais na faixa de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2,5% por peso de dita ração em uma base de peso seca.

15 4. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita composição ser adicionada à ração de animais na faixa de aproximadamente 0,01 grama por quilograma de peso corporal de dito animal a aproximadamente 1 grama por quilograma de peso corporal vivo de dito animal.

5. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** ditas vacina e composição serem administradas a rebanho bovino.

20 6. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita composição ser administrada a rebanho bovino na faixa de aproximadamente 10 gramas a aproximadamente 60 gramas por dia por animal.

7. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** ditas vacina e composição serem administradas a rebanho ovino.

25 8. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita composição ser administrada a rebanho ovino na faixa de aproximadamente 2 gramas a aproximadamente 10 gramas por dia por animal.

9. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita vacina estimular a produção de anticorpos contra mastite.

30 10. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita vacina ser a vacina J5 da Pfizer.

11. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita composição aumentar o título das classes de anticorpos IgG1 ou IgG2 em relação ao título de

ditos anticorpos IgG1 ou IgG2 na ausência de dita composição.

12. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita composição aumentar o título da classe de anticorpos IgG1 em relação ao título de ditos anticorpos IgG1 na ausência de dita composição.

5 13. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dita composição aumentar o título da classe de anticorpos IgG2 em relação ao título de ditos anticorpos IgG2 na ausência de dita composição.

10 14. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dito título da classe de anticorpos IgG1 ou IgG2 ser mantido após a retirada de dita composição da dieta de ditos animais em relação ao título de ditos anticorpos IgG1 ou IgG2 na ausência de dita composição.

15 15. A combinação da reivindicação 1, **caracterizada por** dito título da classe de anticorpos IgG1 ser mantido após a retirada de dita composição da dieta de ditos animais em relação ao título de ditos anticorpos IgG1 na ausência de dita composição.

16. Um método para aumentar a eficácia de uma vacina, **caracterizado por** compreender:

- 20 a. o provimento de um ou mais indivíduos vacinados; e
b. a administração de uma composição compreendendo β -glucans, β -1,3 (4) – endo-glucano hidrolase, terra diatomácea calcinada, uma argila mineral e glucomano ao indivíduo.

17. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** dita composição ser administrada diariamente a ditos indivíduos.

25 18. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** de dita composição ser adicionada à ração do indivíduo na faixa de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2,5% em peso de dita ração em uma base de peso seca.

30 19. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** dita composição ser adicionada à ração de ditos indivíduos na faixa de aproximadamente 0,01 grama por quilograma de peso corporal vivo de dito animal a 1 grama por quilograma de peso corporal vivo.

20. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** dita composição aumentar o título das classes de anticorpos IgG1 ou IgG2 em relação ao título de ditos anticorpos IgG1 ou IgG2 na ausência de dita composição.

21. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** dita composição aumentar o título da classe de anticorpos IgG2 em relação ao título de ditos anticorpos IgG2 na ausência de dita composição.

5 22. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** ditos indivíduos serem gado bovino, e uma vacina e dita composição serem administradas a dito gado bovino.

10 23. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** ditos indivíduos serem rebanho bovino, e dita composição ser administrada ao dito rebanho bovino na faixa de aproximadamente 10 gramas a aproximadamente 60 gramas por dia por animal.

24. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** ditos indivíduos serem ovinos, e uma vacina e dita composição serem administradas a ditos ovinos.

15 25. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** ditos indivíduos serem ovinos, e dita composição ser administrada a ditos ovinos na faixa de aproximadamente 2 gramas a aproximadamente 10 gramas por dia por animal.

26. O método da reivindicação 16, **caracterizado por** um ou mais de ditos indivíduos vacinados terem sido vacinados com uma vacina que estimula a produção de anticorpos contra mastite.

20 27. O método da reivindicação 26, **caracterizado por** dita vacina ser uma vacina J5 da Pfizer.

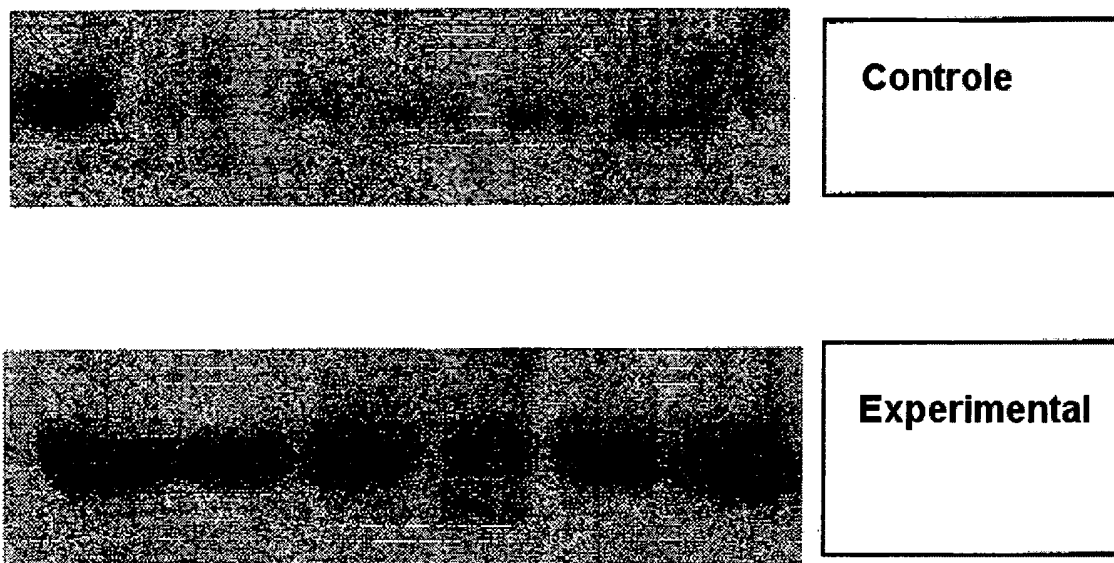


FIG. 1

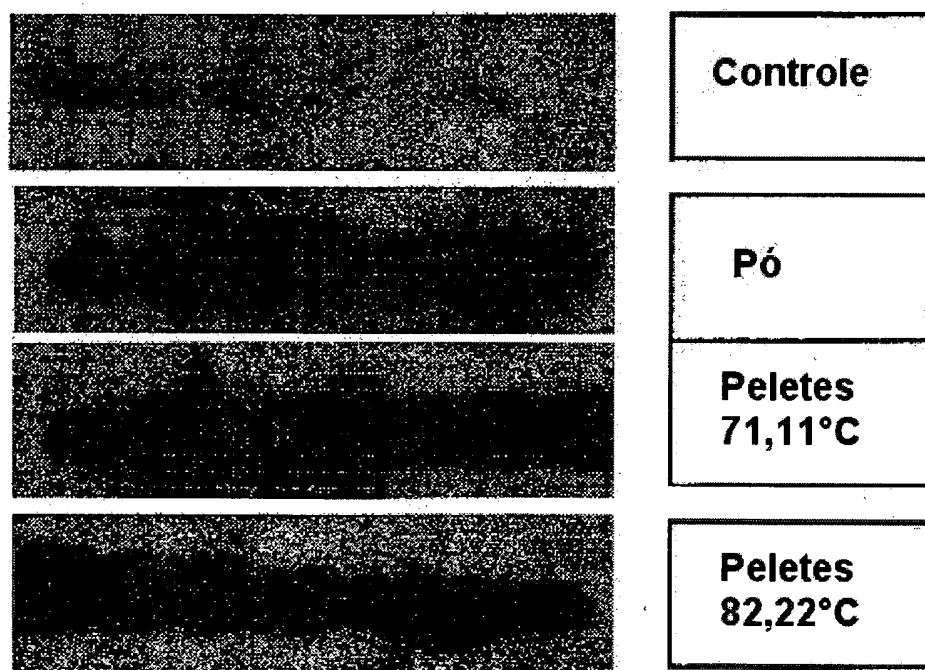


FIG. 2

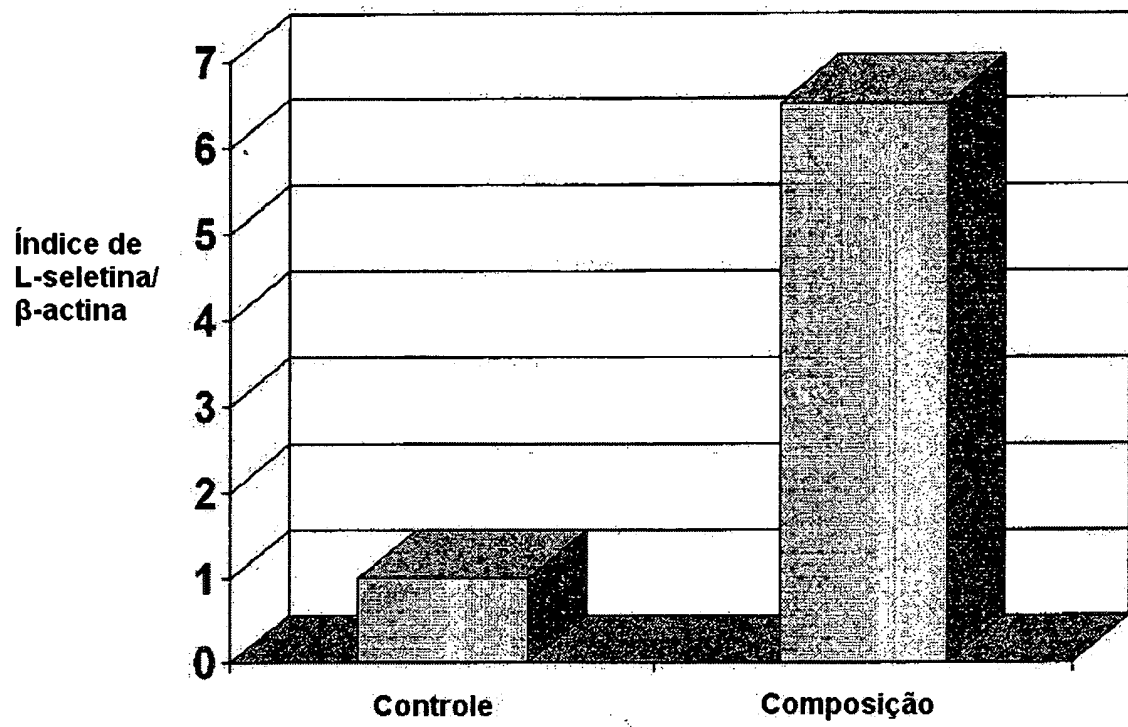


FIG. 3

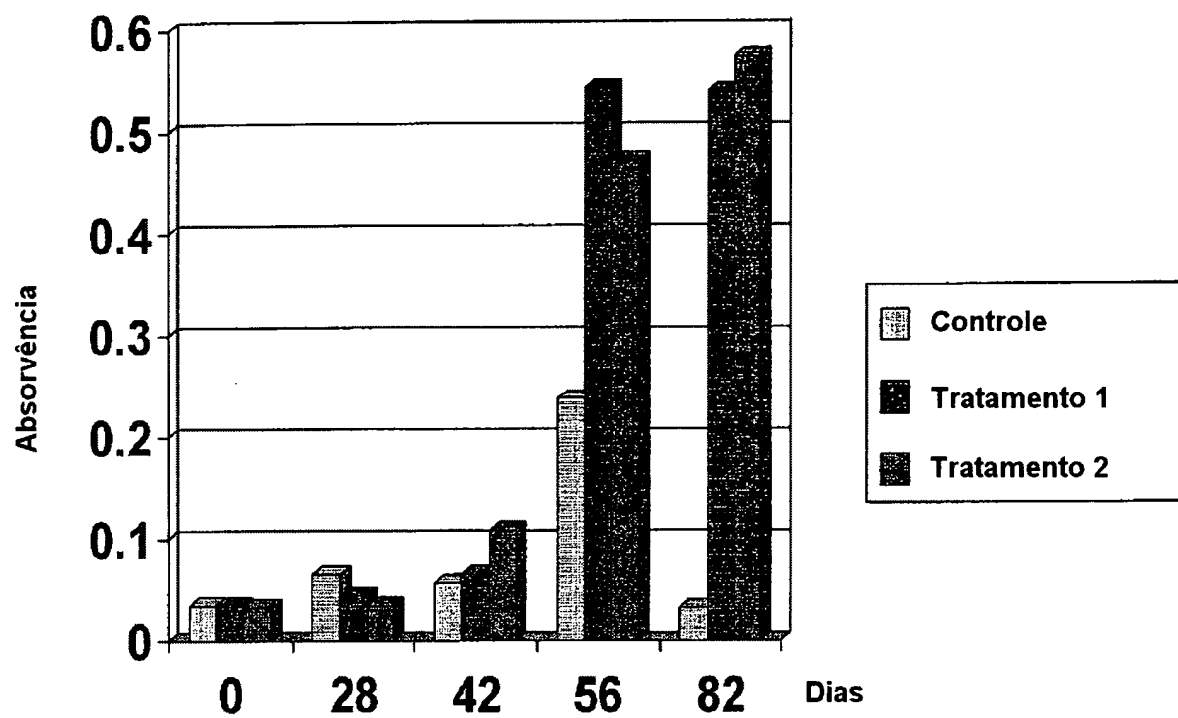
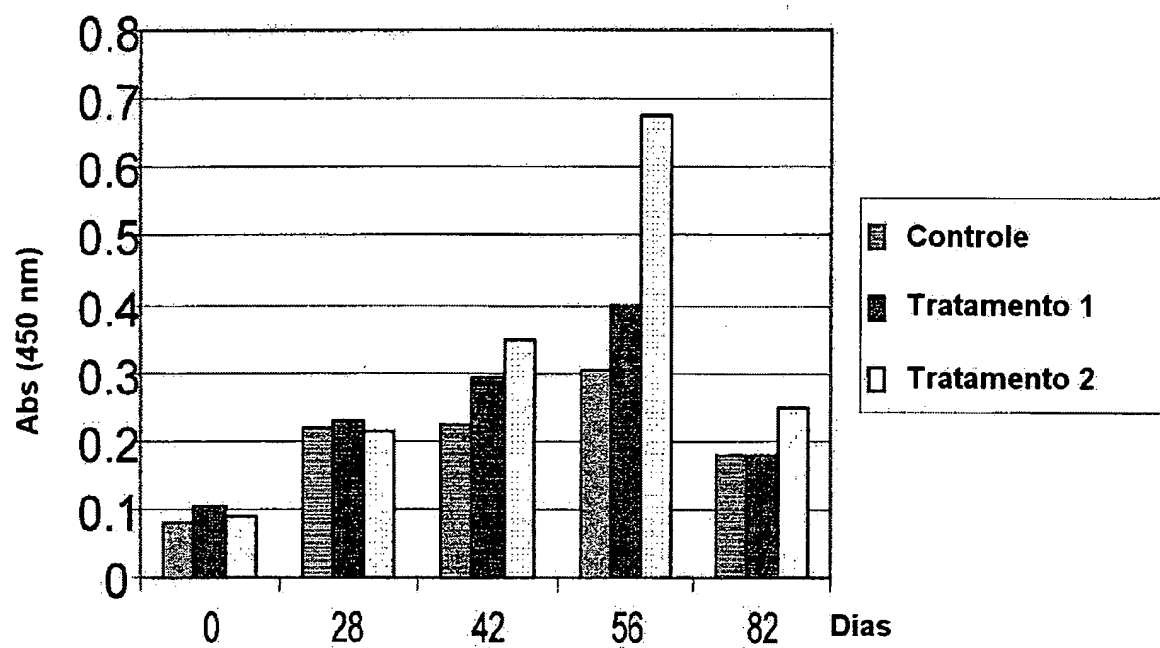


Controle



Experimental

FIG. 4

**FIG. 5****FIG. 6**

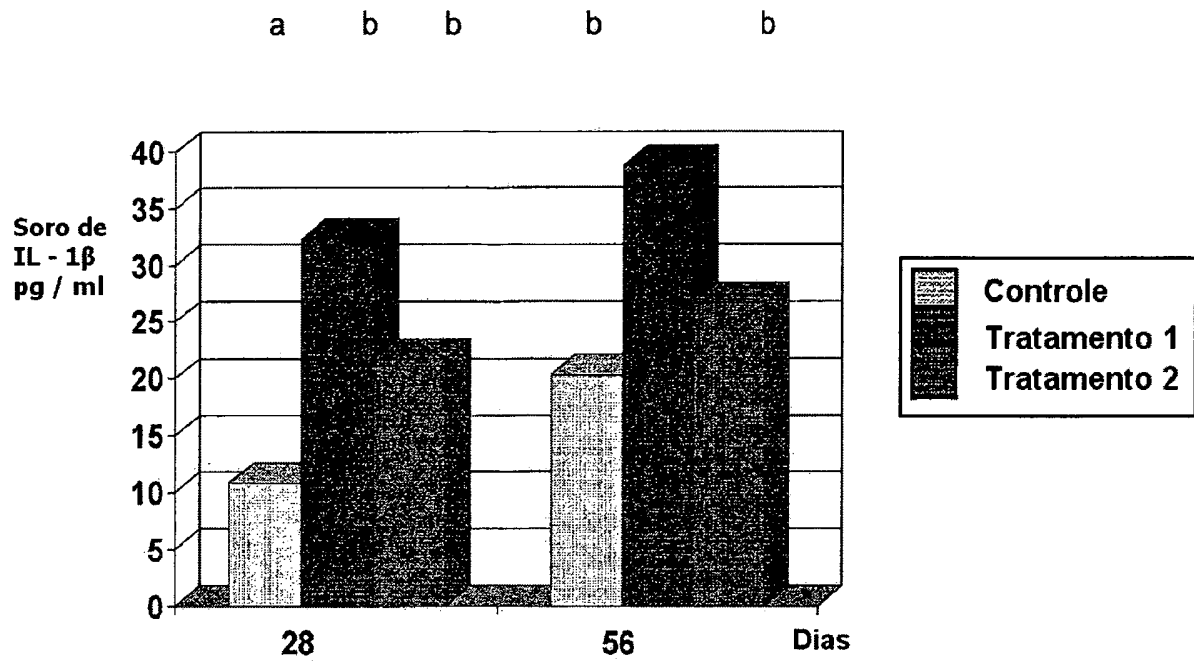


Fig. 7

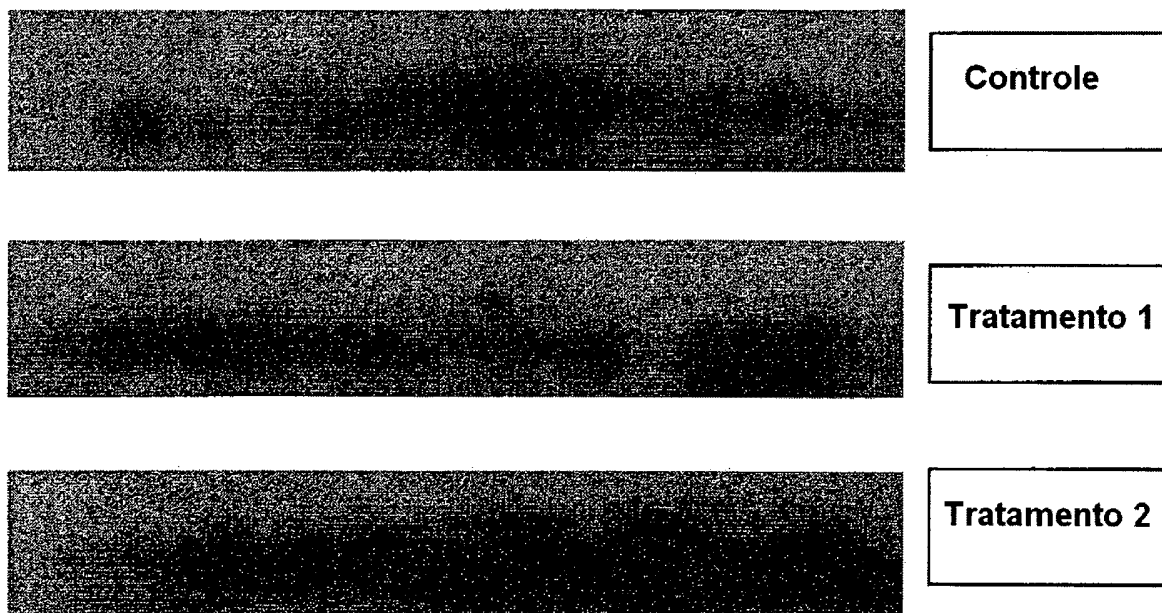
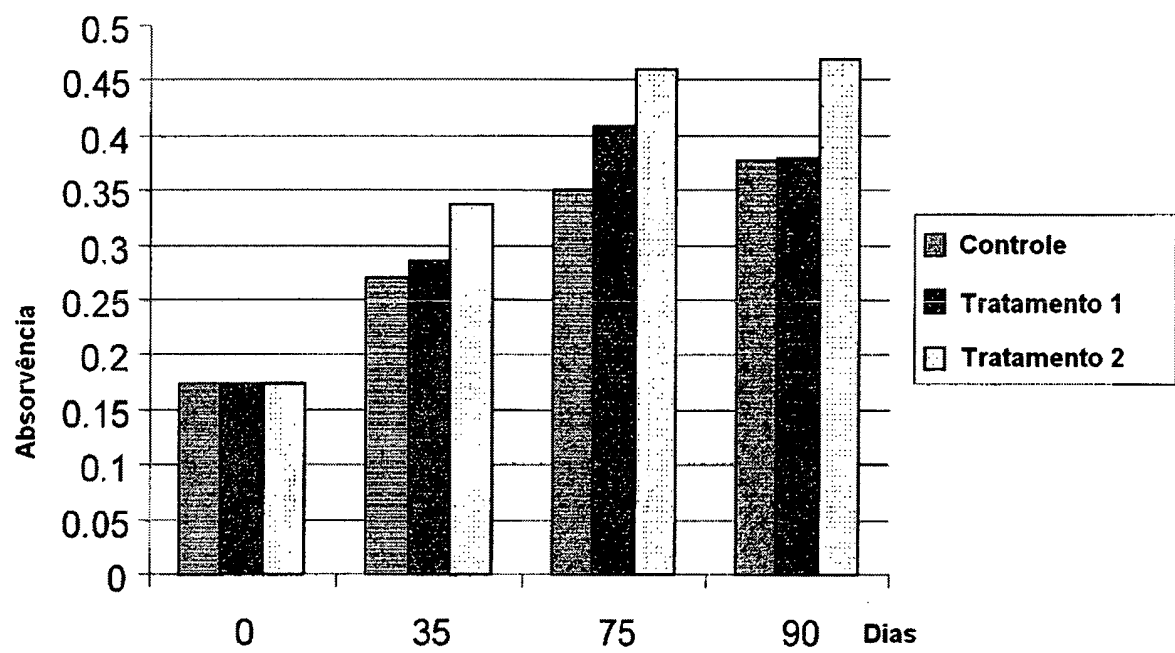


Fig. 8

FIG. 9

RESUMO**AUMENTO DE TÍTULO POR VACINAÇÃO EM ANIMAIS**

A invenção refere-se a uma composição adicionada á ração animal usada em combinação com uma vacina para aumentar a efetividade da vacina. Entre
5 outros efeitos, a composição aumenta o título de anticorpos da vacina.