



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 819**

51 Int. Cl.:
A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06848883 .2**

96 Fecha de presentación : **14.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1973561**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Enzimas para reducir el estrés inmunológico.**

30 Prioridad: **15.12.2005 US 750339 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2011

73 Titular/es: **ChemGen Corporation**
211 Perry Parkway
Gaithersburg, Maryland 20877, US

72 Inventor/es: **Anderson, David, M.;**
Hsiao, Hung-Yu y
Liu, Lin

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 819 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para reducir el estrés inmunológico y mejorar el rendimiento del crecimiento animal. En particular, la invención se refiere a composiciones que comprenden enzimas que son efectivas para reducir el estrés inmunológico o que son efectivas para tratar o prevenir una infección o que son efectivas para mejorar el rendimiento del crecimiento animal. La invención se refiere, además, a métodos de uso de las composiciones.

ANTECEDENTES

Un animal puede sufrir el estrés inmunológico por una cantidad de razones, entre los que se incluye exposición a un antígeno reconocido por el sistema inmunológico del animal. Un antígeno puede desencadenar una respuesta inmunológica que es una respuesta inmunológica adaptada o que es una respuesta inmunológica innata. Cuando se desencadena una respuesta inmunológica, el animal experimenta estrés inmunológico dado que su sistema inmunológico responde a la amenaza percibida. Con frecuencia, el estrés inmunológico estorba el rendimiento animal.

Las proteínas de fase aguda (PFA) son un grupo de proteínas sanguíneas cuya concentración en la sangre cambia cuando un animal sufre estrés, tales como infección, inflamación, trauma quirúrgico u otra provocación interna o externa. Ver, por ej., Murata et al., *Vet. J.* 168: 28 (2004). Se considera que las PFA cumplen una función en la respuesta inmunológica innata del animal. Por ejemplo, las PFA pueden estar involucradas en recuperar la homeóstasis y evitar el crecimiento de microbios hasta que se desarrolle una inmunidad adquirida.

Las PFA incluyen proteínas "negativas" cuya concentración disminuye con el estrés, y proteínas "positivas" cuya concentración aumenta con el estrés. Ver, por ej., Murata et al., referencia anterior. Las PFA negativas incluyen albúmina y transferrina. Las PFA positivas incluyen proteínas sintetizadas por hepatocitos luego de la estimulación realizada por las citosinas pro-inflamatorias y liberadas en el torrente sanguíneo, tales como haptoglobina, proteína C-reactiva, amiloide A sérica, ceruloplasmina, fibrinógeno, y α -1-glicoproteína ácida (AGP). La producción extra-hepática de PFA también se ha mencionado para la mayoría de las especies de mamíferos. *Id.* Las citosinas pro-inflamatorias tales como interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral α (FNT- α) se consideran mediadores importantes de la síntesis de PFA en el hígado. La inflamación, infección o lesión a los tejidos desencadena la liberación de citosinas por las células orientadas a la defensa, induciendo de este modo la síntesis de PFA. La inducción de PFA positivas también está asociada con una disminución en la síntesis de PFA negativas. *Id.*

Se han establecido métodos para cuantificar PFA, y la concentración de PFA en la circulación (por ej., niveles séricos de PFA) se ha correlacionado con la gravedad de la enfermedad del animal. *Id.* De este modo, la concentración de PFA puede usarse como un indicador del nivel de estrés inmunológico de un animal.

5 El sistema inmunológico de un animal puede reconocer antígenos que no representan una amenaza real para la salud del animal, tales como los componentes de origen vegetal y animal en composiciones para alimentos para animales. Estos antígenos pueden desencadenar una respuesta inmunológica, tal como una respuesta inmunológica innata, haciendo de este modo que el animal experimente estrés
10 inmunológico. Esta respuesta de estrés puede identificarse y monitorearse a través de la concentración sérica de PFA.

Incluso cuando el antígeno que desencadena la respuesta inmunológica no representa una amenaza real para la salud del animal, la respuesta al estrés puede tener un efecto perjudicial. Este puede observarse como una reducción en la eficiencia
15 alimenticia, una reducción en la ganancia de peso o reducción del peso, un aumento en la susceptibilidad a una infección, o un aumento en la temperatura corporal, por ejemplo.

Se ha descrito el uso de anticuerpos, tales como anticuerpos anti-fosfolipasa A2, para reducir la inflamación gastrointestinal en animales. Ver, por ej., Patente de
20 EE.UU. Núm. 6.383.485. Se han descrito composiciones para alimentos que comprenden una semicelulasa capaz de degradar semicelulosa que contiene β -manano (por ej., una semicelulasa del tipo β -mananasa), tales como endo-1,4- β -mananasa, o una fosfolipasa, tal como fosfolipasa A2, para una eficiencia en la utilización del pienso mejorada. Ver, por ej., WO 97/41739, Patente de EE.UU. Núm.
25 6.162.473, y Patente de EE.UU. Núm. 6.183.739.

Del mismo modo se han descrito composiciones alimentarias que comprenden una enzima, tales como PI-PLC, que descompone una ligadura, para efectuar de este modo la liberación de una proteína o carbohidrato de la superficie celular, para el
tratamiento o la prevención de una infección del tracto digestivo. Ver, por ej., WO
30 01/41785. Walsh et al., *J. Anim. Sci.* 73: 1074 (1995), discuten composiciones de alimentos que comprenden enzimas glucanasa que descomponen un sustrato glucano con ligaduras mixtas, tal como 1,4- β -glucanasa que descompone los sustratos mixtos β -1,3, β -1,4. En nuestras pruebas, sin embargo, ni PI-PLC ni 1,4- β -glucanasa mostraron actividad reductora del estrés inmunológico.

35 Se han descrito, además, otras composiciones de alimentos para animales que comprenden aditivos enzimáticos. Ver WO 03/062409. Esta referencia se orienta a enzimas resistentes al calor incluidas en un alimento para animales en cantidades que

oscilan desde 0,001 hasta 12% en peso, pero no proporciona una enseñanza general sobre los niveles pretendidos de actividad enzimática (UI) como en la presente invención. Se considera que las enzimas usadas en esta descripción (glucanasa de cebada, celulosa, xilanasa y fitasa) no tienen actividad reductora del estrés inmunológico mientras que las enzimas de la presente invención son enzimas reductoras del estrés inmunológico.

Otros documentos también se relacionan con aditivos alimentarios enzimáticos. Ver las Patentes de EE.UU. 6.562.340 y 6.558.693. La patente '340 se relaciona en particular con celulasas como aditivos alimentarios enzimáticos. Dado que la celulosa no activa el sistema inmunológico innato, las celulasas no son enzimas reductoras del estrés inmunológico tales como las usadas en la presente invención. La patente '693 describe aditivos alimentarios para animales que comprenden enzimas que los Inventores han descubierto ahora que son reductores del estrés inmunológico, pero no describe composiciones que comprenden las cantidades de dichas enzimas o los niveles de actividad enzimática usados como se especifica en la presente invención.

Otra descripción, la WO 99/03497, se refiere a enzimas, tales como xilanasas o celulasas, para controlar la infección bacteriana. Estas enzimas no son enzimas reductoras del estrés tales como las usadas en la presente invención. Como se indicó con anterioridad, la celulosa no estimula el sistema inmunológico innato y las celulasas, por lo tanto, no son enzimas reductoras del estrés inmunológico. Las composiciones de alimentos que comprenden cantidades estándar de xilanasa no muestran propiedades reductoras del estrés inmunológico como se demuestra en el párrafo [0087] de esta memoria descriptiva.

La WO 98/20750 se refiere al uso de enzimas para tratar productos alimentarios que contienen soja. Se describe el uso de mananasa, que es una enzima reductora del estrés inmunológico, pero no en combinación con otra enzima reductora del estrés inmunológico como en la presente invención.

Se han descrito además aditivos de alimentos de animales que comprenden una enzima y un aminoácido. Ver la GB 2 361 877.

No se ha presentado descripción hasta ahora de una composición alimentaria formada por una enzima que es distinta que la semicelulasa del tipo β -mananasa o una fosfolipasa y que está presente en una cantidad efectiva para reducir el estrés inmunológico.

En consecuencia, existe la necesidad de lograr composiciones para reducir el estrés inmunológico en animales.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición apropiada para administración oral a un animal que comprende una enzima reductora del estrés inmunológico en un vehículo aceptable para administración oral que es (i) un alimento para animales que
5 comprende una cantidad de la enzima efectiva para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva en el animal, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa en el animal, y/o mejorar el rendimiento del crecimiento animal, como se define en la reivindicación 1; (ii) una composición líquida que comprende por lo menos 40.000 UI de enzima/L, como se define en la reivindicación 2; o (iii) una composición sólida que
10 comprende por lo menos 40.000 UI de enzima/kg, como se define en la reivindicación 3. La enzima es distinta que una semicelulasa tipo β -mananasa o fosfolipasa.

En una realización, la composición es un alimento para animales que comprende por lo menos 20 UI de enzima/kg de alimento. En otra realización, la composición es una composición sólida que comprende por lo menos 80.000 UI de enzima/kg, o por lo
15 menos 160.000 UI de enzima/kg.

En una realización, la composición es un alimento para animales que comprende un componente que induce una respuesta inmunológica en el animal y la enzima comprende una enzima que degrada dicho componente. En una realización, el componente es un antígeno mostrado por un microorganismo patogénico.

En una realización, la enzima comprende 1,3- β -glucanasa. En una realización, la
20 enzima comprende 1,3- β -glucanasa y la composición se selecciona del grupo que consiste en (i) un alimento para animales como se define en la reivindicación 1 que comprende por lo menos 30 UI de 1,3- β - glucanasa/kg de alimento; (ii) una composición líquida como se define en la reivindicación 2 que comprende por lo
25 menos 230.000 UI de 1,3- β -glucanasa/L y (iii) una composición sólida como se define en la reivindicación 3 que comprende por lo menos 450.000 UI 1,3- β -glucanasa/kg.

La presente invención también se refiere a una composición apropiada para administración oral a un animal que comprende dos o más enzimas reductoras del estrés inmunológico, en donde la composición es (i) un alimento para animales como
30 se define en la reivindicación 12; (ii) una composición líquida como se define en la reivindicación 13; o (iii) una composición sólida como se define en la reivindicación 14.

En realizaciones específicas, la composición se selecciona del grupo que consiste en (i) una composición que comprende 1,4- β -mananasa y quitanasa; (ii) una composición que comprende 1,4- β -mananasa y xiloglucanasa; (iii) una composición
35 que comprende 1,4- β -mananasa y arabinanasa; (iv) una composición que comprende 1,3- β - glucanasa y quitanasa; (v) una composición que comprende 1,3- β -glucanasa y xiloglucanasa; (vi) una composición que comprende 1,3- β -glucanasa y arabinanasa y

(vii) una composición que comprende 1,4- β -mananasa, 1,3- β -glucanasa y arabinanasa.

Otra realización se refiere a una composición apropiada para administración oral a un animal que comprende 1,4- β -mananasa y 1,3- β -glucanasa. La composición se selecciona del grupo que consiste en (i) un alimento para animales como se define en la reivindicación 12 que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos 20 UI de 1,3- β -glucanasa/kg de alimento, (ii) una composición líquida como se define en la reivindicación 13 que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos 155.000 UI de 1,3- β -glucanasa/L y (iii) una composición sólida como se define en la reivindicación 14 que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos 300.000 UI de 1,3- β -glucanasa/kg. En una realización, la composición se selecciona del grupo que consiste en (i) un alimento para animales como se define en la reivindicación 12 que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos 30 UI de 1,3- β -glucanasa/kg de alimento; (ii) una composición líquida como se define en la reivindicación 13 que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos 230.000 UI de 1,3- β -glucanasa/L y (iii) una composición sólida como se define en la reivindicación 14 que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos 450.000 UI de 1,3- β -glucanasa/kg. En una realización, la composición comprende, además, una o más enzimas adicionales reductoras del estrés inmunológico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el mejor ajuste de la curva (y la ecuación polinomial subyacente) para calcular la concentración de α -1-glucoproteína ácida de pollo (AGP) en muestras de plasma de pollos de prueba con los datos obtenidos en el Ejemplo 1.

La Figura 2 es un gráfico de Box y Wisker que muestra en forma gráfica los niveles de AGP en suero de pollo de pollos de prueba, como se describe en el Ejemplo 2. El intervalo de los datos está representado por las líneas verticales. La casilla representa el intervalo de los datos dentro de una desviación estándar de la media. La línea horizontal indica los datos promedio.

La Figura 3 muestra los niveles de AGP de suero de pollos que reciben uno o varios alimentos diferentes, entre los que se incluyen alimentos de acuerdo con la invención y alimentos de la técnica anterior, como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 4 muestra el mejor ajuste de la curva (y la ecuación polinomial subyacente) para calcular la concentración de AGP en muestras de plasma de pavos de prueba con los datos obtenidos en el Ejemplo 8.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se usan en la siguiente descripción, debe entenderse que los términos "un" o "una" abarcan uno o más, salvo que se especifique de otro modo.

Como se usa en la presente memoria, el término "animal" se refiere a cualquier animal, entre los que se incluyen seres humanos y otros animales, tales como animales no humanos, entre los que se incluye animales de compañía tales como perros y gatos, ganado, tales como vacas y otros rumiantes, búfalos, caballos, cerdos, 5 ovejas, aves de corral (por ej., pollos, patos, pavos y gansos) y animales de acuicultura (por ej., peces y camarones y anguilas).

En la presente descripción, las frases "enzima que degrada un antígeno" y "enzima que degrada un componente" significan que la enzima convierte el antígeno o componente en una forma no reconocida por el sistema inmunológico del animal. La 10 capacidad que tiene una enzima de degradar un antígeno o componente puede identificarse midiendo la concentración sérica de PFA de un animal, por lo cual una reducción en la concentración sérica de PFA positiva, o un aumento en la concentración sérica de PFA negativa, indica que la enzima ha degradado el antígeno o componente.

Como se indicó con anterioridad, el término "PFA" incluye proteínas "negativas" cuya concentración disminuye con el estrés, y proteínas "positivas" cuya concentración aumenta con el estrés. La invención incluye composiciones y métodos que aumentan la concentración de las proteínas de fase aguda negativas cuya concentración normalmente disminuye con el estrés, así como composiciones y métodos que 20 reducen la concentración de proteínas de fase aguda positivas cuyas concentraciones normalmente aumentan con el estrés. Por conveniencia, en la descripción que sigue, la invención se ejemplifica con referencia al efecto de las composiciones y métodos sobre las proteínas de fase aguda positivas. De este modo, el término "PFA" en la descripción que sigue en general se refiere a cualquiera de una o más proteínas de 25 fase aguda positivas asociadas con la respuesta al estrés de un animal. Debe entenderse que las composiciones y métodos que se describen en la presente memoria como reductores de la concentración de "PFA" (con referencia a proteínas de fase aguda positivas) también son útiles para aumentar la concentración de las proteínas de fase aguda negativas.

La invención como se define en las reivindicaciones se refiere a composiciones que comprenden por lo menos una enzima que es efectiva para reducir el estrés inmunológico sufrido por un animal. Por conveniencia, estas enzimas se denominan en la presente memoria enzimas "reductoras del estrés inmunológico". Como se usa en la presente memoria, el término "enzima reductora del estrés inmunológico" se refiere a 35 cualquier enzima que degrada un antígeno o patrón molecular que es reconocido por el sistema inmunológico del animal, por ej., un antígeno o patrón molecular que desencadena una respuesta inmunológica, provocando de este modo que el animal

experimente estrés inmunológico. El término "patrón molecular" como se usa en la presente memoria incluye patrones moleculares generales que están unidos por receptores en el contexto del sistema inmunológico innato, tales como patrones moleculares que usualmente están asociados con patógenos.

5 Aunque no se desea ligarse a ninguna teoría, los presentes inventores consideran que la degradación por enzimas reductoras del estrés inmunológico del antígeno o patrón molecular inhibe o reduce la respuesta inmunológica desencadenada por el antígeno o patrón molecular, reduciendo de este modo el estrés inmunológico del animal. La reducción en el estrés inmunológico puede identificarse y monitorearse
10 midiendo la concentración sérica de PFA del animal, usando métodos conocidos en la técnica para cuantificar PFA. Algunos ejemplos de dichos métodos se mencionan en Murata, et al., referencia anterior, y se describen y mencionan en Hulten et al., *Vet. Microbiol.* 95: 75 (2003) y Holt et al., referencia anterior, así como en el Ejemplo 1 más adelante.

15 Se ha identificado una cantidad de diferentes proteínas de fase aguda positivas, entre las que se incluye α -1-glicoproteína ácida (AGP), ceruloplasmina (Cp), de la familia de proteínas la colectina (por ej., proteínas tensioactivos pulmonar, lectina que se ligan a conglutinina y a manano), fibrinógeno (Fb), proteína C-reactiva (CRP), haptoglobina, inhibidores de proteasa (por ej., α -1-antitripsina, α -1-antiquimiotripsina y
20 α -2-macroglobulina) y amiloide-A sérico (AAS. Otras PFA potenciales incluyen proteína que se une a lipopolisacáridos (LPB), proteínas que se unen a fosfolípidos tales como anexinas y Proteína Principal de la Fase Aguda (del inglés: Major Acute Phase (MAP)). Murata, et al., referencia anterior. Las concentraciones séricas de cualquiera de estas u otras PFA pueden usarse para identificar, evaluar y monitorear
25 la actividad enzimática de acuerdo con la invención.

Diferentes PFA pueden cumplir funciones más significativas en la respuesta al estrés en diferentes animales. Por ejemplo, se sabe que AGP es clínicamente importante en el ganado y se asocia con infección en cerdos, perros, gatos y pollos (entre los que se incluyen gallinas). Se ha informado que Cp es un indicador de
30 infección en ganado, caballos y pollos. CRP se ha identificado en rumiantes, caballos, cerdos, perros y gatos, aunque no se ha demostrado que CRP es una PFA en ganado. Se ha demostrado que CRP está asociada con infección en caballos y cerdos. Fb es un indicador confiable de inflamación, infección producida por bacterias o trauma quirúrgico en ganado y ovejas, y está asociada con infección en caballos. Hp es una
35 PFA en una cantidad de animales de producción y de compañía, entre los que se incluye rumiantes tales como ganado, ovejas, cerdos, caballos y perros. AAS se ha asociado con inflamación e infección en ganado y con infección en caballos, cerdos,

animales de compañía tales como perros, y pollos. Se ha encontrado un aumento en los niveles de AAS en leche de vacas y ovejas con mastitis. La LBP sérica se ha asociado con infección en ganado, igual como niveles locales de anexinas (sobre las superficies de los epitelios secretorios en pulmones de ganado infectado). Se informa
5 que MAP es un indicador de infección en cerdos. De manera adicional, mientras que la transferrina usualmente se considera una proteína de fase aguda negativa, igual como una función como una proteína de fase aguda positiva en pollos. Murata, et al., referencia anterior; Holt et al. , *Poultry Sci.* 81: 1295-1300 (2002). Otros también han informado que AAS y Hp, así como CRP y MAP, están asociados con infección en
10 cerdos. Hulten et al., referencia anterior.

Las composiciones de la invención como se define en las reivindicaciones comprenden una cantidad de enzima reductora del estrés inmunológico que es efectiva para reducir la concentración sérica de PFA en un animal. La cantidad puede variar dependiendo del animal y la enzima reductora del estrés inmunológico, y puede
15 ser determinada fácilmente por aquellas personas con experiencia en la técnica usando métodos conocidos en esta. Por ejemplo, los niveles séricos de PFA de un animal pueden medirse antes y después de la administración de la enzima, o pueden compararse los niveles séricos de PFA de animales de control o equivalentes tratados. (En este aspecto, puede ser ventajoso comparar animales de control y tratados de la
20 misma edad, dado que los niveles de PFA pueden cambiar con la edad. Por ejemplo, hemos encontrado que los niveles séricos de AGP aumentan con la edad del pollo.) Una reducción en la concentración sérica de PFA asociada con la administración de la enzima indica que se administró una cantidad efectiva de enzima.

Las composiciones de la invención como se define en las reivindicaciones
25 comprenden una cantidad de enzima reductora del estrés inmunológico que es efectiva para mejorar el rendimiento del crecimiento animal (también se denomina "desempeño vivo," particularmente en el campo de aves de corral). Como se usa en la presente memoria, la frase "rendimiento del crecimiento animal" incluye cualquier parámetro que refleja el crecimiento animal, entre los que se incluyen conversión de
30 alimentos, absorción de agua, contenido de agua de las heces, uniformidad del peso corporal dentro de una manada o grupo de animales, la expectativa de vida y la mortalidad. Aunque no se desea ligarse a ninguna teoría, se considera que, en algunas condiciones, el efecto de la enzima reductora del estrés inmunológico sobre la concentración de PFA se enmascara por factores tales como factores que inducen el
35 estrés inmunológico, tales como la presencia de un bajo nivel de infección en un grupo de animales o condiciones de vida estresantes. En dichas condiciones, la enzima reductora del estrés inmunológico puede, no obstante ser efectiva para mejorar el

rendimiento del crecimiento animal. De este modo, el rendimiento del crecimiento animal es una medida alternativa de la efectividad de las composiciones y los métodos de la presente invención.

Las composiciones de la invención como se define en las reivindicaciones pueden ser cualquier composición apropiada para administración a un animal. En una realización, la composición es apropiada para administración oral. En una realización específica, la composición que es apropiada para administración oral se reconoce en general como segura para administración oral a un animal. En otra realización específica, la composición que es apropiada para administración oral contiene sólo componentes, y cantidades de dichos componentes, que en general se reconocen como seguros para administración oral a un animal. En otra realización específica, la composición que es apropiada para administración oral no contiene ningún componente, o cantidades de dichos componentes, que en general no se reconocen como seguros para administración oral a un animal. En otra realización específica, la composición que es apropiada para administración oral contiene sólo componentes y cantidades de dichos componentes, que están permitidos, o que no están prohibidos, para administración oral a un animal. En otra realización específica, la composición que es apropiada para administración oral no contiene ningún componente, o cantidades de dichos componentes, que no están permitidos, o que están prohibidos, para administración oral a un animal.

En algunas realizaciones, la composición comprende un vehículo aceptable para administración oral de la enzima. Como se usa en la presente memoria, "vehículo aceptable para administración oral" incluye cualquier vehículo aceptable desde el punto de vista fisiológico apropiado para administración oral. Los vehículos aceptables para administración oral incluyen sin limitaciones composiciones de alimentos para animales, composiciones acuosas, y composiciones líquidas y sólidas apropiadas para usar en productos de alimentos para animales y/o para administración oral a un animal. Los vehículos apropiados se conocen en la técnica, e incluyen aquellos que se describen en la Patente de EE.UU. 6.780.628.

En algunas realizaciones, la composición es un alimento para animales. Como se usa en la presente memoria, el término "alimento para animales" tiene su significado convencional en el campo de la cría de animales de granja. Por ejemplo, alimento para animales incluye materiales comestibles que son consumidos por el ganado por su valor nutricional. El alimento para animales incluye raciones de alimentos, por ej., composiciones que cumplen los requerimientos nutricionales de un animal, y también incluyen composiciones que no cumplen los requerimientos nutricionales de un animal.

En ejemplos específicos de dicha realización, la cantidad de enzima es por lo menos aproximadamente 50.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de EE.UU. de alimento, por lo menos aproximadamente 60.000 UI por tonelada de alimento, por lo menos aproximadamente 70.000 UI por tonelada de alimento, por lo menos aproximadamente 80.000 UI por tonelada de alimento, por lo menos aproximadamente 90.000 UI por tonelada de alimento, por lo menos aproximadamente 100.000 UI por tonelada de alimento, por lo menos aproximadamente 200.000 UI por tonelada de alimento, o por lo menos aproximadamente 500.000 UI por tonelada de alimento, o mayor.

En particular, la invención se refiere a un alimento para animales que comprende una cantidad de enzima reductora del estrés inmunológico de por lo menos aproximadamente 20 UI/kg de alimento, tal como por lo menos 20 UI/kg de alimento, por lo menos a 25 UI/kg de alimento, por lo menos a 30 UI/kg de alimento, por lo menos a 35 UI/kg de alimento, por lo menos a 40 UI/kg de alimento, por lo menos a 45 UI/kg de alimento, por lo menos 50 UI/kg de alimento, o más. Aunque no se desea ligarse a ninguna teoría, se considera que un alimento para animales que comprende una cantidad de enzima reductora del estrés inmunológico de por lo menos aproximadamente 20 UI/kg de alimento será efectiva para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva en dicho animal, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa en dicho animal, y/o mejorar el rendimiento del crecimiento animal.

De este modo, la invención como se define en las reivindicaciones 1 y 12, se refiere a un alimento para animales que comprende una cantidad de enzima reductora del estrés inmunológico efectiva para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva en el animal, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa en el animal, y/o mejorar el rendimiento del crecimiento animal

La composición del alimento puede prepararse por medio de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la enzima reductora del estrés inmunológico puede agregarse a los otros componentes del alimento en cualquier etapa durante el proceso de fabricación, como lo consideran apropiado aquellas personas con experiencia en la técnica. En una realización, la enzima se proporciona como una solución, tal como un concentrado enzimático líquido que se agrega a otros componentes del alimento durante el proceso de fabricación. En forma alternativa, una solución que contiene enzimas se rocía sobre una forma sustancialmente final del alimento para animales. En otra realización, la enzima se proporciona como una composición sólida (tal como un polvo), tal como una composición sólida que se agrega a otros componentes del alimento durante el proceso de fabricación. Los métodos ejemplificativos para fabricar alimento que contiene enzimas se describen en WO 97/41739.

La invención como se define en las reivindicaciones 2, 3, 13 y 14, puede ser una composición líquida o una composición sólida. Dichas composiciones pueden ser apropiadas para administración directa a un animal o pueden usarse como un aditivo para alimentos (por ej., agregarse a los alimentos antes de alimentar) o un suplemento para alimentos (entre los que se incluye suplementos que se diluyen con otros componentes del alimento antes de alimentar y suplementos que se ofrecen a un animal en forma separada, de libre elección). Algunos ejemplos de una composición líquida incluyen concentrados de enzimas líquidas, entre los que se incluyen concentrados de enzimas líquidas que normalmente están diluidos o se combinan con otros componentes antes de la administración oral a un animal.

En realizaciones en las cuales la composición es una composición líquida, tal como una solución enzimática, la composición o solución líquida puede comprender por lo menos aproximadamente 40.000 unidades internacionales (UI) por litro de solución, tal como por lo menos 40.000 UI/L, por lo menos 50.000 UI/L, por lo menos 60.000 UI/L, por lo menos 70.000 UI/L, por lo menos 80.000 UI/L, por lo menos 90.000 UI/L, por lo menos 100.000 UI/L, por lo menos aproximadamente 500.000 UI/L, por lo menos aproximadamente 600.000 UI/L, por lo menos aproximadamente 700.000 UI/L, por lo menos aproximadamente 800.000 UI/L, por lo menos aproximadamente 900.000 UI/L, por lo menos aproximadamente 1.000.000 UI/L, por lo menos aproximadamente 2.000.000 UI/L, o por lo menos aproximadamente 5.000.000 UI/L.

En algunas realizaciones, una cantidad de composición líquida, tal como alrededor de 500 ml de solución, se aplica a o se combina con una cantidad de alimento, tal como a una tonelada de alimento, para llegar a formulaciones de alimentos con los niveles de enzimas descritos con anterioridad. En otras realizaciones, una cantidad de composición líquida se aplica a o se combina con una cantidad de alimento para preparar un alimento para animales con una cantidad de enzima efectiva para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva en el animal, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa en el animal, y/o mejorar el rendimiento del crecimiento animal.

Se considera que las composiciones concentradas de enzima líquida actualmente disponibles (distintas de las composiciones de 1,3-β-glucanasa que se describen más abajo) que son apropiadas para administración oral comprenden mucho menos que por lo menos aproximadamente 40.000 UI/L de una enzima reductora del estrés inmunológico, si la hubiera, y no son efectivas para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa, y/o mejorar el rendimiento del crecimiento animal, cuando se usan de acuerdo con sus instrucciones.

En realizaciones en las cuales la composición es una composición sólida, la composición puede comprender por lo menos aproximadamente 40.000 UI/kg, tal como por lo menos 40.000 UI/kg, por lo menos 50.000 UI/kg, por lo menos 60.000 UI/kg, por lo menos 70.000 UI/kg, por lo menos 80.000 UI/kg, por lo menos 90.000 UI/kg, por lo menos 100.000 UI/kg, por lo menos 120.000 UI/kg, por lo menos 140.000 UI/kg, por lo menos 160.000 UI/kg, por lo menos 180.000 UI/kg, por lo menos 200.000 UI/kg, o más.

En algunas realizaciones, una cantidad de una composición sólida se aplica a o se combina con una cantidad de alimento para llegar a formulaciones de alimentos con los niveles enzimáticos descritos con anterioridad. En otras realizaciones, una cantidad de composición sólida distinta de un alimento para animales se combina con una cantidad de alimento para preparar un alimento para animales con una cantidad de enzima efectiva para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva en el animal, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa en el animal, y/o mejorar el rendimiento del crecimiento animal.

Se considera que las composiciones enzimáticas sólidas actualmente disponibles que son apropiadas para administración oral comprenden mucho menos que por lo menos aproximadamente 40.000 UI/kg de una enzima reductora del estrés inmunológico, si la hubiera, y no son efectivas para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa, y/o mejorar el rendimiento del crecimiento animal, cuando se usan de acuerdo con sus instrucciones.

Como resulta convencional en la técnica, el término "UI" o "unidad internacional" se refiere a una cantidad de enzima que catalizará la transformación de 1 micromol del sustrato por minuto en condiciones que son óptimas para la enzima. Los equivalentes en peso a unidades internacionales de enzimas reductoras del estrés inmunológico se conocen en la técnica y pueden determinarse usando ensayos estándar. Los ensayos estándar ejemplificativos para las enzimas reductoras del estrés inmunológico representativas se definen a continuación.

En una realización, la enzima se expresa en una planta que se usa en alimento para animales. Por ejemplo, el maíz puede manipularse genéticamente para expresar una enzima reductora del estrés inmunológico y el producto a base de maíz modificado genéticamente resultante puede usarse en la alimentación. La producción también puede efectuarse con otros sistemas genéticamente modificados o modificados por medios clásicos tales como bacterias, por ej., *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus*; levaduras, por ej., *Pichia*, *Yarrow*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* (por ej., *Schizosaccharomyces pomb*, *Hansenula*,

Kluyveromyces, *Candida*), y otros hongos, tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, y *Humicola*.

De acuerdo con otra realización, la enzima reductora del estrés inmunológico se proporciona en una forma de cápsula o comprimido para ingestión oral.

5 El sistema inmunológico de un animal puede reconocer como un antígeno o patrón molecular ciertos componentes de una composición alimentaria que no representa una amenaza real para la salud del animal. No obstante, el componente desencadena una respuesta inmunológica que induce estrés inmunológico en el animal, y que puede identificarse y monitorearse a través de un aumento en la
10 concentración sérica de una o más PFA. Aunque no se desea ligarse a ninguna teoría, los presentes inventores consideran que esta respuesta inmunológica "innecesaria y contraproducente" puede involucrar receptores del reconocimiento de patrones (RRP), tales como aquellos involucrados en el sistema inmunológico innato.

El sistema inmunológico innato se refiere a una respuesta inmunológica que no
15 depende de reconocimiento del antígeno específico. Ver, por ej., Tosi, *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 241 (2005). Un aspecto del sistema inmunológico innato incluye RRP, que reconocen y se unen a patrones moleculares asociados al patógeno, traduciendo señales de respuesta inmunológica. Ver, por ej., Fabrick et al., *J. Biol. Chem.* 279: 26605 (2004). Algunos ejemplos de RRP incluyen receptores símil toll (TLR) que
20 reconocen un intervalo de patrones moleculares y generan señales intracelulares para la activación de una gama de respuestas del huésped. Ver, por ej., Tosi, referencia anterior; Blach-Olszewska, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53: 245 (2005). Se han identificado RRP/TLR que reconocen manosa (por ej., Blach-Olszewska, referencia anterior), 1,3- β - glucano (por ej., Rice et al., *J. Leukoc. Biol.* 72:140 (2002)),
25 lipopolisacárido y fosforilcolina (por ej., Baumgarth et al., *Semin. Immunopathol.* 26: 347 (2005)), ácido lipoteicoico, modulina soluble en fenol, dipéptido de muramilo y peptidoglicano (por ej., Fournier et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 521 (2005)). Los receptores inmunomoduladores para manano (por ej., Klabunde et al., *Parasitol. Res.* 88: 113 (2002) (lectina que se une a manano)), y N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-
30 manosamina (por ej., Hansen et al., *J. Immunol.* 169: 5726 (2002)). También se han identificado TLR para ARN de hebra doble (por ej., Bell et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 102: 10976 (2005)) y ADN con patrones de metilación que difieren de ADN endógeno (por ej., Huang et al., *J. Immunol* 175: 3964 (2005); Nonnemacher et al., *Infect. Immun.* 71: 850 (2003)).

35 Aunque estos patrones moleculares están asociados con microorganismos patogénicos (por ej., bacterias, virus, hongos y protozoarios) también están se presentan en algunas moléculas no patogénicas, tales como los componentes de

alimento para animales. Una respuesta inmunológica innata a moléculas no patogénicas que presentan estos patrones moleculares somete innecesariamente a un animal al estrés inmunológico, y puede impactar en forma perjudicial en la eficiencia de la alimentación del animal, reducir la velocidad de aumento de peso del animal o producir pérdida de peso, hacer que el animal sea más susceptible a la infección, aumentar la temperatura corporal del animal, o puede tener de otro modo un impacto negativo sobre la salud del animal o la eficiencia de utilización de la energía del alimento (calorías). La respuesta inmunológica innata que resulta de la función de MBL (del inglés: mannose-binding lectin = lectina que se enlace a manosa), por ejemplo, induce respuestas potentes. Se ha demostrado que la mutación de uno de los genes de la proteína que se une a la manosa en ratones paradójicamente permite la supervivencia de una provocación de peritonitis séptica aguda normalmente letal (Takahashi, K. et al, *Microbes Infect.* 4 (8): 773-784, 2002). El estrés inmunológico de la respuesta inmunológica innata agresiva es más letal que la infección en este caso.

El β -manano es un componente de los productos de la soja y alimentos para animales a base de soja. Las formas de alto peso molecular de β -manano presente en el alimento para animales puede desencadenar una respuesta inmunológica innata "innecesaria y contraproducente", sometiendo de este modo al animal a estrés inmunológico. Los presentes inventores encontraron que este estrés inmunológico puede reducirse o evitarse usando una semicelulasa tipo β -mananasa, endo-1,4- β -D-mananasa, una enzima que degrada los β -mananos (por ej. β -galactomanano, β -glucomanano), reduciendo de este modo o evitando la respuesta inmunológica a β -manano. Como se muestra en los Ejemplos que siguen, la reducción en el estrés inmunológico se refleja en una reducción en la concentración sérica de PFA.

La α -mananasa, que degrada el α -manano, es útil como enzima reductora del estrés inmunológico de acuerdo con la invención, el α -manano no se considera una semicelulosa porque no comparte las propiedades características de las semicelulosas.

En el campo de las enzimas industriales, el término "semicelulasa" se ha usado como nombre comercial para β -mananasa. Del mismo modo, las patentes y publicaciones de co-autoría realizadas por los inventores usan el término "semicelulasa" para referirse a β -mananasa, en la que se incluye endo-1,4- β -D-mananasa. Ver, por ej., Patente de EE.UU. Núm. 6.162.473. En otros contextos, el término "semicelulasa" puede ser más amplio, abarcando glucanasas y xilanasas además de mananasa, como se explica más adelante.

El término "semicelulosa" se usó para describir un material vegetal de carbohidratos obtenido por extracción con una solución alcalina diluida que se hidroliza

más fácilmente que la celulosa. Ver, por ej., Schulze, E., *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 24: 2277 (1891); Schulze, E., *Z. Physiol Chem.* 16: 387 (1892). Desde entonces, "semicelulosa" se ha usado para especificar polisacáridos vegetales no solubles en agua asociados con la celulosa, distintos de la pectina y almidones y polisacáridos en savia vegetal, que son solubles en soluciones alcalinas diluidas. Ver, por ej., Whisler et al., "Hemicelluloses," en *IV POLYSACCHARIDE CHEMISTRY* 112 (Academic Press, 1953). El xilano, los β -mananos y los galactanos se consideran en generalemicelulosas, aunque algunos β -mananos, como la goma de acacia y los galactomananos de goma guar son fácilmente solubles. Los árboles de madera blanda tienen una cantidad de β -mananos asociados con su celulosa y los de madera dura tienen una gran cantidad de xilanos.

En contraste con lasemicelulosas, el α -manano está asociado con las paredes de células fúngicas, tales como *Saccharomyces*, no es un componente estructural de la madera, y se encuentra en forma uniforme en glicoproteínas eucarióticas que son en general solubles en agua. De este modo, el α -manano no se considera una semicelulosa, y la α -mananasa no es una semicelulasa. La α -mananasa es útil como una enzima reductora del estrés inmunológico de acuerdo con la presente invención dado que degrada α -mananos que son reconocidos por el sistema inmunológico de un animal, pero que no se asocian con los patógenos. El sistema inmunológico innato es sensible al manano dado que los polímeros que contienen manosa se encuentran en la superficie de muchos patógenos.

Otros componentes del alimento que pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico de un animal incluyen β -1,3-glucano (un componente estructural común de los materiales vegetales), complejos de glicoproteína ligada a N (encontrados, por ejemplo, en los productos que contienen soja), ARN de hebra doble de plantas, animales o microbios, y ADN de microbios, plantas o animales con un patrón de metilación extraño (no endógeno).

Ejemplos específicos de enzimas reductoras del estrés inmunológico y los antígenos que degradan se mencionan en la siguiente tabla. La invención abarca composiciones que comprenden otras enzimas reductoras del estrés inmunológico que degradan los mismos o diferentes antígenos, así como el uso de dichas otras enzimas para reducir el estrés inmunológico.

ANTÍGENOS	ENZIMAS
α -manano	α -mananasa α -manosidasa

ANTÍGENOS	ENZIMAS
β -mananos	β -mananasa semicelulasa (tipo β -mananasa) 1,4- β -mananasa endo-1,4- β -D-mananasa
β -1,3-glucanos	1,3- β -glucanasa <i>Endo</i> -1,3- β -glucanasa (EC 3.2.1.39) β -glucosidasa
ARN de hebra doble mARN sin caperuza 3pARN	nucleasa no específica ARNasa L adenosina desaminasa específica de dsARN
ADN	ADNasa nucleasa no específica endonucleasa de restricción específica de CG
Glicoproteínas ligadas a N (ej., asialoglicoproteína)	carbohidrasas N-glicanasas endo enzimas PNGasas
fosfocolina en esfingomielina	esfingomielinasa
Polímero que contiene N- acetilglucosamina (por ej., quitina)	quitinasa (EC 9 3.2.1.14) quitina desacetilasa carbohidrato desacetilasa N-acetilglucosaminidasa
fosfatidilserina	fosfatidilserina descarboxilasa fosfolipasa C fosfolipasa D
sacárido-galactósido sulfatado	sulfatasa
β -galactósido	β -galactosidasa
xiloglucano	xiloglucanasa (EC 3.2.1.15)
lipoarabinomanano (LAM) arabinogalactano (AG)	arabinanasa
hialuronano (ácido hialurónico)	hialuronidasa (EC 3.2.1.35)

ANTÍGENOS	ENZIMAS
arabinogalactano y otros carbohidratos modificados por arabino	α -arabinofuranosidasa
sulfato de condroitina	condroitinasa
glucocerebrósidos	glucocerebrosidasa
metil ésteres de carbohidratos	metil esterasa
carbohidratos esterificados con ácido ferúlico	esterasa de ácido ferúlico furuloil esterasa
polímero de carbohidrato acetilado	acetil esterasa carbohidrato desacetilasa

De acuerdo con algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición como se define en las reivindicaciones 12 a 14 que comprende dos o más enzimas reductoras del estrés inmunológico.

5 En una realización específica, la composición es un alimento para animales que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos aproximadamente 20 UI de 1,3- β -glucanasa/kg de alimento, tal como por lo menos 20 UI/kg de alimento, por lo menos 25 UI/kg de alimento, por lo menos 30 UI/kg de alimento, por lo menos 35 UI/kg de alimento, por lo menos 40 UI/kg de alimento, por lo menos 45 UI/kg de alimento, por lo
10 menos 50 UI/kg de alimento, o más, de 1,3- β -glucanasa.

En otra realización específica, la composición es una composición líquida que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos aproximadamente 155.000 UI de 1,3- β -glucanasa/L, tal como por lo menos 155.000 UI/L, por lo menos 230.000 UI/L, por lo menos 300.000 UI/L, por lo menos 380.000 UI/L, o más, de 1,3- β -glucanasa.

15 En otra realización específica, la composición es una composición sólida que comprende 1,4- β -mananasa y por lo menos aproximadamente 300.000 UI de 1,3- β -glucanasa/kg, tal como por lo menos 300.000 UI/kg, por lo menos 450.000 UI/kg, por lo menos 600.000 UI/kg, por lo menos 750.000 UI/kg, por lo menos 900.000 UI/kg, o más, de 1,3- β -glucanasa.

20 En otra realización, una composición comprende 1,4- β -mananasa y xiloglucanasa. En otra realización, una composición comprende 1,3- β -glucanasa y xiloglucanasa. En otra realización, una composición comprende 1,4- β -mananasa y quitinasa. En otra realización, una composición comprende 1,3- β -glucanasa y quitinasa. En otra realización, una composición comprende 1,4- β -mananasa y arabinanasa. En otra
25 realización, una composición comprende 1,3- β -glucanasa y arabinanasa. En otra

realización, una composición comprende 1,4- β -mananasa, 1,3- β -glucanasa y arabinanasa.

Se entenderá que estas combinaciones son simplemente ejemplificativas, y la invención incluye composiciones que comprenden otras combinaciones de enzimas reductoras del estrés inmunológico. Por ejemplo, la invención incluye composiciones que comprenden cualquiera de una o más de las enzimas reductoras del estrés inmunológico mencionadas con anterioridad y/o discutidas a continuación y 1,4- β -mananasa.

El estrés inmunológico causado por un componente de alimentos puede no siempre ser una respuesta del sistema inmunológico. Se sabe bien que un determinado porcentaje pequeño de bebés alimentados con una fórmula de reemplazo de la leche humana a base de proteína de soja desarrolla una fuerte reacción intestinal perjudicial de tipo inmunológico (ver el informe del Comité sobre Nutrición, American Academy of Pediatrics, *Pediatrics* 101 (1): p 148, (1998)). Las glicoproteínas ligadas a N en la soja, por ejemplo β -conglucina, algunas veces denominada globulina 7S (Ogawa T, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(5):831-833, 1995; Burks AW, et al., *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 8(2):195-203, 1989) pueden ser antígenos potentes y se reconocen como poseedoras de calidades anti-nutricionales, la β -conglucina se elimina deliberadamente de las preparaciones de aislados de proteína de soja usadas para suplementos nutricionales a pesar de su contribución a la proteína total. La hidrólisis destruye la antigenicidad. Además, hemos encontrado que una fracción de glicoproteína de soja 7S enriquecida usada en la alimentación de gallos se digirió no tan bien como otra fracción de proteína de soja menos glicosilada.

Algunos ejemplos de enzimas apropiadas para degradar carbohidratos en glicoproteínas ligadas a N incluyen α -fucosidasas tales como α -1,2-fucosidasa y α -1,3-1,4- fucosidasa, α -manosidasas tales como α -1,6-manosidasa, α -1,2-manosidasa y α -1,3-manosidasa, β -1,4-galactosidasa, endo- β -N-acetilglucosaminidasa F (endo F), péptido-N-(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), PNGasa A, endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H), endo D, endo C, α -N-acetilgalactosamidasa, β -1,3-galactosidasa, endo-N-acil-neuraminidasa (endo N), α -2,3-neuraminidasa, α -2,6-neuraminidasa, α -2,8-neuraminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, endo- β -N-galactosidasa, endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, endo- α -1,6-D-mananasa, arabinogalactanasa, α - galactosidasa, β -galactosidasa.

Estas enzimas se conocen en la técnica y algunas están disponibles de fuentes comerciales. En forma alternativa, las enzimas reductoras del estrés inmunológico pueden obtenerse de microorganismos que producen enzimas, tales como bacterias, hongos y levadura. De manera adicional, las enzimas pueden obtenerse usando

métodos de tecnología recombinante que se conocen en la técnica, por ejemplo, por ingeniería genética en una célula huésped para producir una enzima, por ej., provocando la transcripción y traducciones de un gen que codifica la enzima. Las secuencias de aminoácidos de una cantidad de las enzimas indicadas anteriormente se conocen en la técnica. Usando esas secuencias o secuencias de nucleótidos conocidos que codifican esas secuencias, aquellas personas con experiencia en la técnica pueden diseñar genes apropiados para la expresión recombinante de las enzimas. De manera adicional o en forma alternativa, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima reductora del estrés inmunológico puede usarse para sondear una biblioteca de ADN para identificar otras secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas reductoras del estrés inmunológico. Como se conoce en la técnica, dicha biblioteca de ADN puede derivar de un organismo o población de organismos definido, o puede obtenerse de fuentes naturales y de este modo representa ADN de microorganismos que son difíciles de cultivar.

En realizaciones en las cuales la composición comprende una combinación de enzimas, la enzima puede ser producida en forma individual por organismos separados, o dos o más de las enzimas pueden ser producidas por un único organismo. Por ejemplo, un único organismo puede manipularse en forma recombinante para producir dos o más enzimas por medio de métodos conocidos en la técnica.

Como se discutió con anterioridad, el sistema inmunológico de un animal reconoce una cantidad de patrones moleculares diferentes mostrados por microorganismos patogénicos, entre los que se incluye lipopolisacárido (asociado con, por ejemplo, bacterias gram negativas), flagelos bacterianos que contienen la proteína conservada flagelina, peptidoglicano (asociado con, por ejemplo, bacterias gram positivas), ácido lipoteicoico (asociado con, por ejemplo, bacterias gram positivas) que se une a la lectina tipo C L-Ficolina, (Lynch, N. J., et al., *J. Immunology* 172: 1198-1202, 2004), fosforilcolina (asociada con, por ejemplo, bacterias gram positivas y bacterias gram negativas), ADN (tales como ADN bacteriano con motivos CpG no metilados, ver Van Uden and Raz, *J Allergy Clin Immunol.* 104(5):902-10, 1999.), y ARN de hebra doble y 3pRNA (Hornung, et. al., *Science* 314: 994-997, 2006). La respuesta inmunológica a estas moléculas incluye un aumento en PFA séricas.

Otros patrones moleculares patogénicos incluyen moléculas que contienen N-acetilglucosamina y moléculas que contienen N-acetilmanosamina. La especificidad de unión exacta de todas las colectinas (la lectina que se une a la manosa es una colectina o lectina tipo C) puede no ser conocida, pero la unión a un número de patógenos bacterianos diferentes se observa por medio de por ejemplo, H-ficolina,

proteína A asociada con tensioactivo (SP-A), y congulinina. Los compuestos como N-acetilglucosamina y N-acetilmanosamina pueden inhibir la unión y de este modo se presume que son parte de la especificidad de unión por reconocimiento del patrón (Haurum, J.S., et al., *Biochemical J.* 293 (3): 873-878, 1993).

5 Ejemplos de otros antígenos y patrones moleculares a los que puede orientarse la degradación enzimática de acuerdo con la invención incluyen lipoproteínas bacterianas (Hacker, H. et al., *J. Exper. Med.* 192 (4): 595-600, 2000); unión de β -1,3-glucano por la colectina Dectin-1 (Adachi, Y., et al., *Infection and Immunity* 72 (7): 4159-4171, 2004); flagelina (que se une a TLF5) (Honko, A.N., and Mizel, S.B.,
10 *Immunol. Res.* 33 (1): 83-101, 2005); fucosil glicoconjugados; α -Gal-ceramida; fibrinógeno; sulfato de heparina; gal-sacárido sulfatado; quitosán, N-acetilglucosamina; asialoglicoproteína; y β -galactósidos.

La clase de receptores llamados receptores depuradores (SR) se relaciona estructuralmente con parte de los receptores de la respuesta inmunológica innata, y
15 pueden crear estrés inmunológico. Se considera que los SR están involucrados en el reciclaje y limpieza de células dañadas por apoptosis o de otro modo. Los receptores depuradores (SR) expresados por macrófagos y células dendríticas también son receptores para el sistema inmunológico innato. Más aún, algunos SR reconocen patógenos y se muestra que algunos receptores de la respuesta innata son
20 importantes para la apoptosis. De este modo, de acuerdo con una realización de la invención, la degradación enzimática se orienta a blancos de unión de los SR que son patrones moleculares.

Uno de dichos blancos de patrones moleculares de SR es la lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada. Los receptores llamados LOX-1 (Peiser, L., et al., *Current
25 Opinion in Immunology* 14:123-128, 2002) SR-PS OX/CXCL- 16 (Fukumoto, N., et al., *J. Immunol.* 173(3): 1620-1627, 2004) y CD36 (Bruni, F., et al., *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 119(4): 417-28, 2005) se unen a LDL oxidada que puede estar presente en algunos alimentos, particularmente alimentos que contienen sub-productos de origen animal tales como alimentos hechos con sangre.

30 Otro blancos de patrón molecular de SR es la fosfatidilserina (PS) y la liso fosfatidilserina (liso PS). Los SR para PS incluyen SR-PSOX/CXCL-16 y otros receptores de PS (Schlegel, R.A. and Williamson, P., *Cell Death Differ.* 8 (6): 545-548, 2001). La exposición a fosfolípidos de fosfatidilserina puede conducir a respuestas inflamatorias y los fosfolípidos de fosfatidilserina se consideran presentes en la
35 mayoría de los alimentos a cierto nivel.

El hialuronano es abundante en los fluidos extracelulares en animales, pero también se reconoce por los mecanismos de los sistemas depurador/inmunológico

innatos, por ejemplo, en la cicatrización de heridas. Ver, por ej., Jameson, et al., *J. Expt. Medicine* 210 (8): 1269-1279, 2005. Las crestas de pollos son una fuente comercial de hialuronano, normalmente usado en la forma purificada de ácido hialurónico. De este modo, el pienso para aves de corral hecho con harina de carne de ave puede contener hialuronano, con frecuencia en cantidades abundantes. La hialuronidasa (EC 3.2.1.35), que degrada el hialuronano y el ácido hialurónico, es útil como enzima reductora del estrés inmunológico de acuerdo con la invención, particularmente en el contexto de animales alimentado con harina de carne de ave. Por ejemplo, la hialuronidasa es útil en la reducción del estrés inmunológico asociado con harina de carne de ave.

Las enzimas que degradan cualquiera de estos patrones moleculares inhiben o reducen de este modo la respuesta inmunológica, disminuyendo así el estrés inmunológico del animal. Por ejemplo, se conocen ADNasas y nucleasas no específicas que degradan ARN de doble hebra y ADN bacteriano. Se conocen enzimas endonucleasas de restricción específicas para motivos de CG metilados en ADN que no es de mamífero. Las enzimas que degradan la fosforilcolina incluyen fosforilcolina hidrolasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, fosforilcolina esterasa y fosforilcolina fosfatasa.

Esta reducción del estrés puede identificarse y monitorearse midiendo el nivel de PFA séricas, como se describió con anterioridad, la disminución de la concentración sérica de PFA refleja la reducción del estrés inmunológico.

Como se indicó con anterioridad, la composición como se define en la reivindicación 1 comprende una cantidad de enzima reductora del estrés inmunológico que es efectiva para reducir el nivel de proteína de fase aguda en el animal. Esta cantidad puede variar de animal a animal, y de enzima a enzima, pero puede ser determinada fácilmente por aquellas personas con experiencia en la técnica, por ejemplo, al medir los niveles de PFA, como se describió con anterioridad. Por ejemplo, los niveles séricos de PFA de un animal pueden medirse antes y después de la administración de la enzima, o los niveles séricos de PFA de animales tratados y de control pueden compararse. En realizaciones en las cuales la cantidad efectiva se evalúa midiendo los niveles séricos de PFA antes y después de la administración de la enzima, la medición posterior puede realizarse desde por lo menos aproximadamente un día hasta por lo menos aproximadamente varios días o más después de la administración inicial de la enzima. Una reducción en la concentración sérica de PFA asociada con la administración de la enzima indica que se administró una cantidad efectiva de enzima. Debe entenderse, sin embargo, que los niveles de PFA en general

disminuyen a medida que la respuesta inmunológica adaptativa del animal tome efecto.

De acuerdo con algunas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición que comprende 1,3- β -glucanasa en una cantidad efectiva para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva en dicho animal, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa en dicho animal, y/o mejorar el rendimiento del crecimiento animal. En una realización específica, la composición es un alimento para animales que comprende por lo menos aproximadamente 20 UI de 1,3- β -glucanasa/kg de alimento, tal como por lo menos 20 UI/kg de alimento, por lo menos 25 UI/kg de alimento, por lo menos 30 UI/kg de alimento, por lo menos 35 UI/kg de alimento, por lo menos 40 UI/kg de alimento, por lo menos 45 UI/kg de alimento, por lo menos 50 UI/kg de alimento, o más, de 1,3- β -glucanasa. En otra realización específica, la composición es una composición líquida distinta de un alimento para animales que comprende por lo menos aproximadamente 155.000 UI de 1,3- β -glucanasa/L, tal como por lo menos 155.000 UI/L, por lo menos 230.000 UI/L, por lo menos 300.000 UI/L, por lo menos 380.000 UI/L, o más, de 1,3- β -glucanasa. En otra realización específica, la composición es una composición sólida distinta de un alimento para animales que comprende por lo menos aproximadamente 300.000 UI de 1,3- β -glucanasa/kg, tal como por lo menos 300.000 UI/kg, por lo menos 450.000 UI/kg, por lo menos 600.000 UI/kg, por lo menos 750.000 UI/kg, por lo menos 900.000 UI/kg, o más, de 1,3- β -glucanasa.

En algunas realizaciones de alimento para animales donde la enzima comprende 1,3- β -glucanasa, la enzima puede estar presente en una cantidad que es por lo menos aproximadamente 100.000 UI por tonelada de alimento.

Estas cantidades son mucho mayores que el contenido de 1,3- β -glucanasa de los aditivos enzimáticos de alimentos comerciales y los alimentos disponibles en el mercado, que los presentes inventores han analizado y encontrado que proporcionan como mucho desde aproximadamente 10.000 UI/toneladas de alimento, aproximadamente 72.500 UI/L de composición líquida que no es alimento, o aproximadamente 150.000 UI/kg de composición sólida que no es alimento. Los presentes inventores no creen que 10.000 UI/tonelada de alimento de 1,3- β -glucanasa serían efectivos para reducir las PFA, y confirmaron su creencia en forma experimental. Los presentes inventores también determinaron en forma experimental que los productos comerciales tales como Avizyme (Danisco A/S, Langebrogade 1, Dk-1001, Copenhague, Dinamarca) y Rovobio (Adisseo France SAS, 42, Avenue Aristide Briand, BP100, 92164 Antony Cedex,) y alimentos comerciales que comprenden cantidades estándar de β -1,3-1,4-glucanasa (Brewzyme BG plus, Dyadic

International, 140 Intracoastal Pointe Drive, Suite 404, Jupiter, Florida 33477-5094), xilanasa (Multifect XL, Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA), PI-PLC (ChemGen Corp., 211 Perry Parkway, Gaithersburg, MD) y amilasa (Amylase FRED, Genencor International, Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA) no reducen PFA. Ver el Ejemplo 3 que sigue y la Figura 3. En los casos en los cuales la actividad de 1,3- β -glucanasa está presente, está dentro de los intervalos bajos anteriores y no es efectiva para reducir AGP.

En otra realización, la enzima reductora del estrés inmunológico se proporciona como un componente de una composición que también comprende los compuestos que contienen el antígeno o patrón molecular que es degradado por la enzima. Por ejemplo, la invención incluye un alimento para animales que comprende β -1,3-glucano y una 1,3- β -glucanasa; un alimento para animales que comprende ADN o ARN de hebra doble y una ADNasa y/o nucleasas no específicas; un alimento para animales que comprende una glicoproteína ligada a N y una endo- o exo- carbohidrasa, N-glicanasa o PNGasa, o cualquiera de las otras enzimas mencionadas con anterioridad. Otras combinaciones apropiadas de antígenos y enzimas reductoras del estrés inmunológico resultarán obvias para aquellas personas con experiencia en la técnica, y son abarcadas por la invención.

En esta realización, se espera que los niveles séricos de PFA permanezcan elevados en tanto se administra la composición. De este modo, si la cantidad efectiva de enzima reductora del estrés inmunológico se evalúa midiendo los niveles séricos de PFA antes y después de la administración de la enzima, la medición posterior puede realizarse días o semanas después de la administración de la enzima.

En una realización, la enzima se expresa en una planta que se usa en alimento para animales. Por ejemplo, el maíz puede manipularse genéticamente para expresar una enzima reductora de estrés inmunológico y el producto de maíz modificado genéticamente resultante puede usarse en el alimento.

Al animal al cual se administra la enzima reductora de estrés inmunológico también puede administrársele el antígeno (por ej., la molécula que contiene el patrón degradado por la enzima). La enzima y el antígeno pueden administrarse por separado o en forma simultánea como parte de la misma o de diferentes composiciones. Al animal puede administrársele un alimento que comprende la molécula que contiene el patrón o el antígeno, y administrársele por separado una composición que comprende la enzima reductora del estrés inmunológico. En forma alternativa, al animal puede administrársele un alimento que comprende la molécula que contiene el patrón o el antígeno y un alimento complementario que comprende la enzima. El animal también puede administrársele un alimento que comprende tanto el antígeno como la enzima.

Las enzimas deseadas pueden producirse por técnicas de ADN recombinante cuando se conoce el gen que codifica la enzima. El avance de la metodología rápida de secuenciación de ADN ha generado extensas bases de datos públicas de proteínas y sus secuencias de codificación génica, tales como la NCBI Genbank. Con el uso de tecnología de secuenciación rápida de, por ejemplo, 454 Life Sciences (454 Life Sciences, 20 Commercial Street, Branford, CT 06405), puede secuenciarse un genoma bacteriano típico en cuatro horas. Un gen previamente desconocido de una nueva enzima deseada del genoma puede obtenerse realizando un sondeo del genoma usando, por ejemplo, secuencias de codificación identificadas previamente del mismo tipo o tipos similares de enzimas descritas en bases de datos públicas o comerciales usando programas para computadoras ampliamente disponible tales como Blast. Aquellas personas con experiencia en la técnica pueden identificar ADN en el genoma que tiene un nivel umbral de homología con la secuencia conocida y otras propiedades de una región de codificación génica, y luego aislar y amplificar el gen usando, por ejemplo, tecnología de reacción en cadena de polimerasa (PCR). El gen entonces puede expresarse en un huésped y pueden confirmarse las propiedades enzimáticas deseadas de la proteína.

Si una actividad enzimática deseada no se conoce con anterioridad, entonces puede ubicarse usando técnicas de enriquecimiento de microbiología estándar seleccionando el crecimiento sobre el sustrato. Los microbios que usan el sustrato como única fuente de carbono o nitrógeno deben expresar las enzimas capaces de degradar el compuesto blanco. Con el fin de desarrollar una producción económica, se tiene la elección de mejorar la producción de esa enzima usando métodos de enriquecimiento o selección/ mutación clásicos con el microorganismo de producción, o a través de métodos de expresión de ADN recombinante conocidos en la técnica.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en forma adicional, pero la invención no se limita a las realizaciones ejemplificadas en forma específica.

EJEMPLO 1

Un alimento para animales que comprende semicelulasa (endo-1,4- β -mananasa) se preparó y administró a pollos y se midieron los niveles de AGP, como se describe a continuación en mayor detalle.

Un total de 4000 pollos Cobb X Cobb machos de un día de vida se asignaron al azar a 8 tratamientos experimentales, y cada tratamiento se replicó 10 veces:

Diseño del experimento:	8 Tratamientos
Número total de corrales:	80
Núm. total de tratamientos:	8

Núm. de aves por corral:	50
Núm. de corrales por tratamiento:	10
Núm. de aves por tratamiento:	500

Dos de los ocho tratamientos comprendían enzimas reductoras del estrés de acuerdo con la invención: Tratamiento 3 (mananasa en forma de caldo celular completo evaporado de fermentación de *B. lentus* aplicado a aproximadamente 100 MU/tonelada en las dietas de inicio) y Tratamiento 6 (mananasa en forma de sobrenadante de caldo de fermentación de *B. lentus* centrifugado libre de células aplicado a aproximadamente 30 MU/tonelada en las dietas de inicio). El Tratamiento 8 fue un control con sin el agregado de enzima. (1 MU = 4000 UI)

Los lotes de alimento de comida basal se dividieron en forma equitativa en ocho partes y cada una se roció con la cantidad apropiada de los materiales de prueba. Los alimentos Inicial y de Crecimiento contenían 90 g/tonelada de Coban (un medicamento anti-coccidial del tipo ionóforo) más 50 g/tonelada de BMD (antibiótico). Los alimentos de terminación no eran medicados.

Las Dietas de Inicio se ofrecieron a todas las aves a partir del primer día de vida hasta los 21 días de vida, las Dietas de Crecimiento desde los 22-35 días, y las Dietas de Terminación desde los 36-42 días. Las dietas y el agua se proporcionaron a voluntad. Las dietas se presentaron a las aves en forma desmenuzado / granulado durante todos los períodos de alimentación. Se usó agua de la canilla como agua potable y se suministró a través de una sistema red interno de agua.

20 Composición y Análisis de las Dietas Experimentales Basales

Ingredientes	Iniciación	Crecimiento	Acabado
Maíz	60,3851	67,6864	72,1098
Harina de Soja (48,5% PC)	34,5066	27,8363	23,3785
Mezcla de Grasa Animal/Vegetal	1,0516	0,9915	1,1389
Fosfato Dicalcico	1,761	1,2682	1,3021
Carbonato Cálcico	1,3192	1,383	1,26
Cloruro de Sodio	0,3299	0,3304	0,3305
DL Metionina	0,2135	0,0793	0,0552
L-lisina,HCl	0,008	--	--
Cloruro de colina 70%	0,05	0,05	0,05
Premezcla de vitaminas	0,25	0,25	0,25
Premezcla mineral	0,075	0,075	0,075

Coban, g/tonelada	90	90	--
BMD, g/tonelada	50	50	--
Análisis Calculado ²			
EM _n aves (Kcal/kg)	3080,0	3150,0	3200,0
Materia seca, %	88,9169	88,9236	88,9054
Proteína cruda, %	22,0	19,3	17,5
Fibra cruda, %	2,8813	2,8176	2,7632
Grasa, %	3,6777	3,8291	4,0981
Calcio, %	1,0	0,9	0,85
Fósforo Total, %	0,7088	0,5967	0,5877
Fósforo disponible, %	0,45	0,35	0,35
Sodio, %	0,18	0,18	0,18
Lisina, %	1,2	1,0152	0,8948
Metionina + Cisteína, %	0,92	0,72	0,65
Treonina, %	0,8821	0,7657	0,6932
Triptofano, %	0,2938	0,2489	0,2185

Dos aves de cada uno de los diez corrales en los Tratamientos 3, 6 y 8 se seleccionaron en forma aleatoria para el análisis de sangre al final de los 42 días después del pesaje, para un total de 20 aves de las 500 por Tratamiento. Se recolectaron las muestras sobre hielo en tubos para recolección de sangre que 5 contenían heparina anti-coagulante y el plasma se obtuvo por centrifugado.

Las muestras de plasma de la sangre se analizaron para determinar la cantidad de glicoproteína ácida α -1 de pollo usando un kit para ensayo basado en inmunodifusión de Cardiotech Services, Inc. (Louisville, KY). Las muestras de suero 10 tomadas de las dos aves/corral se agregaron a las placas de prueba (5 μ l por pocillo) y a algunos pocillos se agregó AGP puro estándar en concentraciones que oscilan hasta 1000 μ g/ ml. Se midieron los anillos de precipitina usando una escala de medición de anillos de precipitina a la décima de mm de diámetro más cercana.

Se usó una ecuación polinomial para proveer el mejor ajuste de la curva con los 15 datos y permitir el cálculo rápido de la concentración de AGP en las muestras de plasma como se muestra en la Figura 1.

Las mediciones de los diámetros de los anillos de precipitina para la totalidad de las muestras de suero de pollo recuperadas y la concentración de AGP calculada para cada ave se muestran en la tabla que sigue. Las aves alimentadas con mananasa en 20 promedio tienen una reducción estadísticamente muy significativa en la concentración promedio de AGP cuando se comparan con las aves de control.

Muestras de Sangre a los 42 Días (y = AGP ug/ml; x= medición del anillo en mm)

Tratamiento 3 (Mananasa)		Tratamiento 8 (Control)		Tratamiento 6 (Mananasa)	
x	y	x	y	X	y
5,3	225,0	6	317,7	5,3	225,0
5,3	225,0	6	317,7	5,7	276,2
4,9	178,6	6,1	332,1	5,8	289,7
5,2	212,9	5,2	212,9	5,1	201,2
5,8	289,7	7,4	546,9	5,4	237,4
5,4	237,4	5,4	237,4	5,7	276,2
5,4	237,4	6,2	346,9	5,5	250,0
5,9	303,6	5,9	303,6	6,1	332,1
5,6	262,9	6	317,7	5,4	237,4
5,9	303,6	6,2	346,9	5,2	212,9
5,2	212,9	6,1	332,1	5	189,7
5,4	237,4	5,6	262,9	6,1	332,1
5,3	225,0	5,9	303,6	5,5	250,0
5,1	201,2	6,3	361,9	5,5	250,0
5,3	225,0	6,2	346,9	6	317,7
5,3	225,0	7,5	565,5	5,4	237,4
5,7	276,2	7,4	546,9	5,6	262,9
5,3	225,0	7,5	565,5	4,4	127,2
5,7	276,2	7,5	565,5		
5	189,7	6,1	332,1		
Promedio	238,5		373,1		250,3
Desv. Est.	35,8		115,6		51,3
CV	14,99		30,97		20,50
Prueba T p contra 8	2,94 E-05			Prueba T contra 8	0,000193

EJEMPLO 2

- 5 Se condujo otro experimento usando semicelulasa (endo-1,4-β-mananasa). En este experimento, se alimentaron grupos de pollos (10 corrales cada uno, con 50 aves por corral) con una de cuatro dietas:

Tratamiento 1 (control): Alimento que comprende antibiótico BMD rociado después de la granulado con una formulación de control, y 35% de sorbitol con colorante alimentario marrón, aplicado a 100 ml/tonelada de alimento.

5 Tratamiento 2 (control): Alimento sin BMD rociado después de la granulado con una formulación de control que comprende 35% de sorbitol con colorante alimentario marrón, aplicada a 100 ml/tonelada de alimento.

Tratamiento 3: Alimento rociado después de la granulado con una formulación que comprende semicelulasa (endo-1,4- β -mananasa) que deriva de *B. lentus*, aplicada a 100 ml/tonelada de alimento.

10 Tratamiento 4: Alimento formulado con una composición en polvo (añadida en la mezcladora antes de la realización de las escamas) que comprende semicelulasa (endo-1,4- β -mananasa) derivado de *B. lentus* a 454 g de composición añadida/tonelada de alimento para proveer 100 MU/tonelada de alimento. (1 MU = 4000 UI)

15 Los pollos tenían 1 día de vida al inicio del experimento.

Las dietas se proporcionaron a voluntad. Se usaron alimentos de inicio (días 0-21), de crecimiento (días 21-35) y de acabado (días 35-42) con las siguientes composiciones como los alimentos base:

Cantidades Esperadas

Análisis de Nutrientes	Iniciación	Crecimiento	Acabado
EM Aves, KCAL	2960,0	3020,0	3080,0
Proteína cruda	22,0	19,4	17,5
Grasa %	3,1439	3,0647	3,4503
Calcio %	0,9	0,8	0,8
Fósforo total	0,7032	0,6315	0,515
Fósforo disponible	0,45	0,39	0,35
Sodio	0,18	0,18	0,18
Lisina %	1,205	1,0302	0,9014
Metionina	0,5446	0,3838	0,3435
Met + Cys	0,92	0,72	0,65

20

Ingrediente Añadidos

Ingrediente	Iniciación	Crecimiento	Acabado
Carbonato Cálcico	0,8291	0,7674	0,9012
Sal	0,2696	0,2698	0,2702
D-L Met	0,1963	0,0682	0,0532
Cloruro de Colina 70%	0,0500	0,0500	0,0500
Fosfato dicálcico	1,6869	1,4088	1,2295
Grasa	0,6517	0,4751	0,8162
Maíz	59,3780	67,4725	70,9038

Harina de Soja	33,5934	27,1132	22,4010
Harina de Carne de Ave	3,0	3,0	3,0
Premezcla de Vitaminas	0,25	0,25	0,25
Premezcla de Minerales	0,075	0,075	0,075
Salinomicina	0,05	0,05	0,05

El día 21 aproximadamente se recolectaron 3 ml de sangre de 3 aves por corral (30 por grupo). Se colocó la sangre en un tubo con heparina y se mezcló ligeramente. Los tubos se centrifugaron lentamente y se retiró el suero. Las muestras de suero se colocaron en tubos con tapas y se rotularon con el número de corral. El suero se congeló para el análisis posterior de AGP, como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Los anillos de inmunodifusión usados para cuantificar la glicoproteína ácida α -1 de pollo se miden fácilmente, son altamente reproducibles y exhiben un coeficiente de variación de 4% o menos.

Los resultados promedio a los 21 días de 30 aves por tratamiento se muestran en la tabla que sigue y en forma gráfica en la Figura 2. Puede observarse que si se deja el antibiótico (BMD) fuera de la dieta se genera un aumento extenso y significativo en el nivel plasmático de AGP (comparar Tratamiento 1 y Tratamiento 2). La adición de la formulación de semicelulasa (endo-1,4- β -mananasa) en la dieta sin BMD (Tratamientos 3 y 4) recuperó el AGP hasta el nivel observado con el uso de antibiótico, lo que indica una reducción significativa del estrés inmunológico.

Tratamiento		1	2	3	4
AGP	Prom.	214,35	267,99	220,28	233,09
	Desv. Est.	62,16	82,42	68,58	67,73
	CV	29,00	30,76	31,13	29,06
Prueba T	P Contra		0,003055 Trat. 1	0,008952 Trat. 2	0,03919 Trat. 2
Prueba T	P Contra				0,234892 Trat. 3
Prueba T	P Contra			0,363305 Trat. 1	0,134383 Trat. 1

Se analizó también el desempeño de crecimiento de los pollos, con los resultados resumidos en la tabla que sigue.

Desempeño de Crecimiento

Día 21								
	FCR ¹	Valor P	Aumento de peso	Valor P	FCR ² Aj. peso	Valor P	CV de ID ³	Valor P
T1	1,394	0,150	0,693	0,016	1,379	0,017	13,81	0,33
T2	1,412		0,657		1,424		14,77	
T3	1,404	0,605	0,673	0,197	1,404	0,248	14,03	0,46
T4	1,407	0,740	0,670	0,459	1,410	0,551	14,40	0,69
Día 42								
T1	1,776	0,006	2,102	0,189	1,772	0,007	11,23	0,19
T2	1,813		2,073		1,820		10,42	
T3	1,770	0,001	2,131	0,088	1,756	0,005	9,97	0,49
T4	1,761	0,0001	2,060	0,572	1,772	0,003	10,38	0,95

¹ FCR= Tasa de Conversión

² FCR Ajustado al Peso = Tasa de Conversión ajustada al peso

³ CV de ID = coeficiente de variación de los pesos individuales

5

De este modo, a los 21 días de edad , tanto la tasa de conversión y la tasa de conversión ajustada al peso se mejoraron significativamente en pollos que recibieron β -mananasa. Esto indica que la reducción en AGP sérica puede traducirse en una importancia real para el desempeño de los animales.

10

EJEMPLO 3

Se evaluó la capacidad de otras enzimas usadas comúnmente en alimentos para animales para determinar su posible efecto sobre AGP. Se realizaron compuestos de raciones de iniciación de pollo de tipo comercial (baja energía metabólica) con productos alimentarios comúnmente usados en los Estados Unidos. Estas raciones (en harina o granulado) se administraron a voluntad desde la fecha de arribo de los pollos hasta el Día 21 del estudio. Los alimentos de tratamiento experimentales se prepararon a partir de este alimento de iniciación basal. Los alimentos de tratamiento se mezclaron para asegurar una distribución uniforme del artículo de prueba respectivo.

15

20

Composición y Análisis de las Dietas Experimentales Basales

Ingredientes	
Maíz	59,398
Harina de soja (48,5% PC)	33,5934
Mezcla de Grasa Animal/Vegetal	0,6517
Fosfato dicálcico	1,6869
Fosfato Dicálcico	0,8291
Cloruro de sodio	0,2696
DL Metionina	0,1963
Harina de Carne de Ave	3,0
Cloruro de colina al 70%	0,05
Premezcla de vitaminas	0,25
Premezcla de minerales	0,075

Componentes	
	EM Bajo
ME _n aves (Kcal/kg)	2960
Proteína cruda, %	22,0
Fibra cruda, %	2,8899
Grasa, %	3,1439
Calcio, %	0,9
Fósforo total, %	0,7032
Fósforo disponible, %	0,45
Sodio, %	0,18
Lisina, %	1,205
Metionina x Cisteína, %	0,92
Treonina, %	0,8266

5

Se añadieron BMD a 50 g/t y Salinomicina a 60 g/t a todos los alimentos.

Preparaciones Enzimáticas

Muestra	Producto Enzimático	Datos de análisis	Vol. de Producto²	Diluyente	Notas	Nivel de uso
3	-	n. d.		20	más colorante alimentario	20 ml/100 kg
6	Adiseo, Rovabio Excel LC	Resabio, Producto comercial	10	10		20 ml/100 kg
7	Danisco, Avizyme (1500 Granulado)	Avizyme, Producto Comercial	Producto sólido	-		100 g/100 kg
8	PI-PLC	106 U/ml	50	-		1,0 ml/kg
9	Genencor Amylase FRED					20 ml/100 kg
10	Genencor Multifect XL					20 ml/100 kg
11	Dyadic Brewzyme BG					20 ml/100 kg
12	Hemicell	1092 MU/L	13	12		20 ml/100 kg
17	-	n. d.		20	más colorante alimentario	20 ml/100 kg

(1 MU = 4000 UI)

² En Inglés: "Stock Volume"**Información Adicional de las Preparaciones Enzimáticas**

Muestra	Actividad Principal	Nivel de Uso	Actividad menor de Endo-1,3-β-glucanasa*
3	-		
6	Endo-1,4-β-Xilanasa 350 AXC U/MI Endo-1,4-β-glucanasa 500 AGL U/ml	Endo-1,4-β-Xilanasa 350 AXC 63.350 AXC U/tonelada Endo-1,4-β-glucanasa 90.500 AGL U/tonelada	9139 UI/tonelada
7	Amilasa xilanasa proteasa	1,0 kg por tonelada	-
8	PI-PLC 106.000 UI / l	96.188 UI / tonelada o 24 MU / tonelada	-
9	Amilasa 4700 MU / l	1,88 x 10 ⁶ UI / tonelada o 470 MU / tonelada	-
10	Endo-1,4-β-Xilanasa 4500 MU / l	900.000 UI / tonelada o 225 MU / tonelada	-
11	Endo-β-1,4-1,3-glucanasa 1586 MU / l	634.400 UI / tonelada o 159 MU / tonelada	1040 UI /tonelada

Muestra	Actividad Principal	Nivel de Uso	Actividad menor de Endo-1,3-β-glucanasa*
12	Endo-1,4- β -mananasa 1095 MU / l	400.000 UI / tonelada o 100 MU / tonelada	580 UI /tonelada
17	-		

ChemGen MU = 4000 UI; AXC – unidades de xilanasa definidas por Adisseo;

AGL – unidades de glucanasa definidas por Adisseo; * - nivel aproximado medido por ChemGen Corp. por el ensayo de azúcares reductores.

- 5 Se encontró disponible alimento y agua a voluntad durante todo el ensayo. El día 15, las aves en el tratamiento 17 se inocularon por vía oral con un inóculo mixto que contenía aproximadamente 30.000 oocistos por ave de *E. acervulina*, 2.500 oocistos por ave de *E. maxima*, y 25.000 oocistos por ave de *E. tenella*. Los procedimientos de inoculación con oocistos coccidiales se describen en SPR SOP: IN1.002.
- 10 Se determinan las medias para el aumento de peso por jaula, el consumo de alimento y la tasa de conversión. Los resultados se mencionan a continuación. Sólo se infectaron los animales que recibieron la muestra 17.

vs.
Tratamiento 3

Datos de crecimiento a los 21 días

Muestra	Prueba T P=	Tratamiento	Prom AGP	Prom. Ganancia de peso vivo	Conv.	Nivel de enzima por tonelada métrica
3	-	Control	170,52	0,624	1,438	ninguno
6	0,2076	Rovabio	186,55	0,626	1,395	100 ml
7	0,2770	Avizyme	160,44	0,633	1,426	1,0 kg
8	1,1263	PI-PLC	196,35	0,650	1,406	106.000 UI
9	0,3962	Amilasa	164,05	0,622	1,434	
10	0,3783	Xilanasa	175,89	0,593	1,444	
11	0,2647	Glucanasa	182,00	0,629	1,396	
12	0,0178	Hemicelulasa	138,22	0,645	1,421	102 MU
17	0,0043	control – infectado	252,04	0,564	1,507	ninguno

- 15 Encontramos que los alimentos comerciales que comprenden cantidades estándar de amilasa, 1,3-glucanasa, 1,4-glucanasa, xilanasa y PI-PLC no redujeron los niveles de AGP. Efectivamente, sólo la semicelulasa (endo-1,4- β -mananasa) mostró un efecto significativo sobre los niveles de AGP. De manera adicional, la comparación entre

tratamiento 1 y 17 muestra claramente que AGP es altamente sensible a PFA en los pollos debido a que la infección aumentó el nivel de AGP 82 µg/ml. Ver también la Figura 3.

5 EJEMPLO 4

Se formula un alimento de prueba para animales que comprende 1,3-β-glucano para que incluya 1,3- β-glucanasa a una concentración de 400.000 UI (100 ChemGen MU) por tonelada de alimento. El alimento de prueba para animales se administra a pollos de prueba, mientras que los pollos de control reciben el mismo alimento para animales (que comprende 1,3-β-glucano) sin 1,3-β-glucanasa. Luego de 21 y 42 días con este régimen, los niveles séricos en sangre de AGP se evaluaron como se describió con anterioridad. Los pollos que recibieron el alimento para animales formulado con enzimas tienen niveles significativamente más bajos de AGP que los animales de control. Los pollos de prueba también muestran una mayor tasa de conversión del alimento y aumento de peso mejorado cuando se comparan con los pollos de control.

15 EJEMPLO 5

El alimento de prueba para animales que comprende una fuente de ADN bacteriano (por ej. Biolys[®] Lysine o otro producto de fermentación que contiene productos celulares) se formula para que incluya nucleasa no específica que deriva de *Cyanobacterium Anabaena* sp. 7120 (NucA), una de las nucleasas no específicas más activas conocidas (Meiss, G. et al., *Eur. J. Biochem.* 251(3): 924-934, 1998). La enzima se agrega a una concentración de 1×10^7 Unidades Kunitz de enzima/kg de alimento o aproximadamente 1 mg (base pura) por kg de alimento. El alimento de prueba para animales se administra a pollos de prueba, mientras que los pollos de control reciben el mismo alimento para animales (que comprende ADN bacteriano) sin nucleasa no específica. Luego de 21 días o 42 días con este régimen, los niveles séricos en sangre de AGP se evaluaron como se describió con anterioridad. Los pollos que recibieron el alimento para animales formulado con enzimas tienen niveles significativamente más bajos de AGP que los animales de control.

25 EJEMPLO 6

Se formula alimento de prueba para animales que comprende harina de carne y huesos, harina de sangre o otros sub-productos de origen animal, para que incluya fosfatidilserina descarboxilasa a una concentración de 400.000 UI/ tonelada de alimento. El alimento de prueba para animales se administra a pollos de prueba, mientras que los pollos de control reciben el mismo alimento para animales sin

fosfatidilserina descarboxilasa. Luego de 21 días o 42 días con este régimen, los niveles séricos en sangre de AGP se evaluaron como se describió con anterioridad. Los pollos que recibieron el alimento para animales formulado con enzima tienen niveles significativamente más bajos de AGP que los animales de control.

5

EJEMPLO 7

Se formula alimento de prueba para animales derivado de harina de soja u otras plantas para que incluya enzimas α -mananasa y/o 1,3- β -glucanasa que derivan de *B. lentus*, cada una a una concentración de 400.000 UI/ tonelada de alimento. El alimento de prueba para animales se administra a pollos de prueba, mientras que los pollos de control reciben el mismo alimento para animales sin α -mananasa o 1,3- β -glucanasa. Luego de 21 días o 42 días con este régimen, los niveles séricos en sangre de AGP se evaluaron como se describió con anterioridad. Los pollos que recibieron el alimento para animales formulado con enzimas tienen niveles significativamente más bajos de AGP que los animales de control.

10

15

EJEMPLO 8

En este ejemplo se demostró que Hemicell[®] mananasa agregada al alimento (una dieta común a base de soja y maíz) reduce la α -1-glicoproteína ácida (AGP) en el suero de pavos mientras que también mejora el desempeño animal. El experimento consistía en 48 corrales de 11 pavos machos (colocación inicial). Los seis tratamientos se replicaron en 8 bloques, randomizados dentro bloques con seis corrales cada uno:

20

Núm. Aves/Tratamiento	88
Núm. Reps/Tratamiento	8
Núm. Total de Tratamientos	6
Núm. Total de Corrales	48
Núm. Total de Aves	528

Un tratamiento que comprendía enzimas reductoras del estrés de acuerdo con la invención, el Tratamiento 1 (Hemicell[®] comercial con 100 MU/tonelada de alimento) se analizó para determinar el contenido de AGP. (1 MU = 4000 UI) El Tratamiento 2 fue un alimento de control sin enzima agregada.

25

Se mezcló el alimento para asegurar la distribución uniforme de alimentos basales entre tratamientos. Todas las enzimas se mezclaron (rociaron) para asegurar una distribución uniforme de las enzimas de prueba y para asegurar una condición del alimento similar entre tratamientos. Cada vez que se preparó alimento para el ensayo, se mezcló una muestra del inicio, del medio y del final de cada alimento para formar

30

una muestra compuesta. Se tomó una muestra del compuesto para cada tratamiento y para la verificación del nivel de enzima.

Las dietas de pavos alimentados al los Tratamientos 1 y 2 en este ensayo se describen en detalle en las tablas que siguen. Las tablas muestran la composición de componentes, los niveles calculados de nutrientes y finalmente algunos valores analizados de nutrientes con los alimentos devueltos. Las dietas son representativas de lo que podría usarse en una operación comercial de crecimiento de pavos y por este motivo la dieta se ajusta varias veces durante el período completo de 20 semanas. Las composiciones de las dietas se cambiaron a las 6, 9, 12, 15 y 18 semanas.

Las composiciones de las dietas en cada uno de los períodos son levemente diferentes para los Tratamientos 1 y 2. Se sabe bien que la mananasa Hemicell® tiene el efecto de aumentar el contenido de energía efectiva de los alimentos (ver Patente de EE.UU. 6.162.473). Por ese motivo, las dietas del Tratamiento 1 se formulan con menos calorías que las dietas del Tratamiento 2 con el fin de minimizar la diferencia de crecimiento entre los Tratamientos 1 y 2 para los fines de este estudio.

Composición de ingredientes y niveles calculados de nutrientes, 0-9 semanas

<i>Período:</i>	<i>0 – 6 semanas</i>		<i>6 – 9 semanas</i>	
Ingrediente (%)	Tratamiento 1 con Hemicell®	Tratamiento 2	Tratamiento 1 con Hemicell®	Tratamiento 2
Maíz	46,77	45,39	53,14	51,79
Harina de Soja	37,15	37,40	29,30	29,50
Harina de Carne de Aves	9,00	9,00	9,00	9,00
Grasa de aves	1,50	2,65	3,50	4,65
Carbonato Cálcico	1,20	1,20	1,25	1,25
Fosfato dicálcico 18,5	2,70	2,70	2,35	2,35
Sal	0,325	0,325	0,315	0,32
DL Metionina	0,315	0,315	0,245	0,25
L-Lisina-HCl	0,41	0,405	0,335	0,34
Pre-mezcla de vitaminas	0,25	0,25	0,25	0,25
Minerales en trazas	0,075	0,075	0,075	0,075
Colina Cl 60%	0,135	0,135	0,085	0,085
Sulfato de cobre	0,05	0,05	0,05	0,05
Coban 60 g/lb	0,055	0,055	0,05	0,05
BMD 50 g/lb	0,05	0,05	0,05	0,05
Hemicell®	0,0125	0,0	0,0125	0,0
Proteína cruda (%)	28,00	28,00	24,5	24,5
EM (Kcal / lb)	1323	1323	1408	1407
Calcio (%)	1,484	1,484	1,462	1,462

<i>Período:</i>	<i>0 – 6 semanas</i>		<i>6 – 9 semanas</i>	
Ingrediente (%)	Tratamiento 1 con Hemicell®	Tratamiento 2	Tratamiento 1 con Hemicell®	Tratamiento 2
Fósforo disponible (%)	0,797	0,797	0,764	0,763
Lisina (%)	1,794	1,793	1,502	1,501
Met + Cys (%)	1,179	1,177	1,018	1,021

Composición de ingredientes y niveles calculados de nutrientes, 9-15 semanas

<i>Período:</i>	<i>9 – 12 semanas</i>		<i>12 – 15 semanas</i>	
Ingrediente (%)	Tratamiento 1 con Hemicell®	Tratamiento 2	Tratamiento 1 con Hemicell®	Tratamiento 2
Maíz	56,88	55,55	62,45	61,05
Harina de Soja	24,55	24,75	21,15	21,40
Harina de Carne de Aves	9,00	9,00	7,00	7,00
Grasa de Aves	5,00	6,22	5,00	6,15
Carbonato Cálcico	1,20	1,20	1,15	1,15
Fosfato dicálcico 18,5	1,95	1,95	1,75	1,75
Sal	0,32	0,32	0,32	0,32
DL Metionina	0,22	0,22	0,30	0,30
L-Lisina-HCl	0,315	0,315	0,42	0,42
Pre-mezcla de vitaminas	0,25	0,25	0,25	0,25
Minerales en trazas	0,075	0,075	0,075	0,075
Colina Cl 60%	0,085	0,085	0,015	0,015
Sulfato de cobre	0,05	0,05	0,05	0,05
Coban 60 g/lb	0,05	0,05	0,00	0,00
BMD 50 g/lb	0,05	0,05	0,05	0,05
Hemicell®	0,0125	0,0	0,0125	0,0
Proteína cruda (%)	22,5	22,5	20,0	20,0
EM (Kcal / lb)	1469	1469	1490	1490
Calcio (%)	1,35	1,35	1,19	1,19
Fósforo disponible (%)	0,681	0,681	0,59	0,59
Lisina (%)	1,350	1,350	1,298	1,298
Met + Cys (%)	0,940	0,940	0,95	0,95

Composición de ingredientes y niveles calculados de nutrientes, 15-20 semanas

<i>Período:</i>	<i>15 – 18 semanas</i>		<i>18 – 20 semanas</i>	
Componente (%)	Tratamiento 1 con Hemicell®	Tratamiento 2	Tratamiento 1 con Hemicell®	Tratamiento 2
Maíz	67,25	65,85	70,60	69,15
Harina de Soja	17,90	18,15	15,60	15,85
Harina de Carne de Aves	5,00	5,00	4,00	4,00
Grasa de aves	6,00	7,15	6,50	7,70
Carbonato Cálculo	1,00	1,00	0,85	0,85
Fosfato dicálcico 18,5	1,50	1,50	1,23	1,23
Sal	0,33	0,33	0,34	0,34
DL Metionina	0,205	0,205	0,193	0,193
L-Lisina-HCl	0,340	0,340	0,235	0,235
Pre-mezcla de vitaminas	0,25	0,25	0,25	0,25
Minerales en trazas	0,075	0,075	0,075	0,075
Colina Cl 60%	0,02	0,02	0,02	0,02
Sulfato de cobre	0,05	0,05	0,05	0,05
Coban 60 g/lb	0,00	0,00	0,00	0,00
BMD 50 g/lb	0,05	0,05	0,05	0,05
Hemicell®	0,0125	0,0	0,0125	0,0
Proteína cruda (%)	17,5	17,5	16,0	16,0
EM (Kcal / lb)	1539	1539	1570	1570
Calcio (%)	0,982	0,982	0,85	0,85
Fósforo disponible (%)	0,490	0,490	0,41	0,41
Lisina (%)	1,10	1,10	0,93	0,93
Met + Cys (%)	0,791	0,791	0,74	0,74

Análisis de Alimentos Devueltos, 0 – 12 semanas

Nutriente	<i>Tratamiento 1 con Hemicell®</i>		Tratamiento 2	
	Calculado	Analizado	Calculado	Analizado
	0 – 3 semanas			
Proteína	28	27,46	28	27,57
Grasa	4,2	4,03	5,3	4,99
Calcio	1,48	1,38	1,48	1,45
Fósforo total	1,02	0,96	1,02	1,08
Unidades de Hemicell	100	70,1	0	8,9
	3 – 6 semanas			
Proteína	28	25,90	28	27,17
Grasa	4,2	4,01	5,3	5,16
Calcio	1,48	1,63	1,48	1,52
Fósforo total	1,02	1,15	1,02	1,12
Unidades de Hemicell	100	99,3	0	8,9
	6 – 9 semanas			
Proteína	24,5	23,42	24,5	24,17
Grasa	6,3	6,33	7,4	7,00
Calcio	1,46	1,69	1,46	1,65
Fósforo total	0,96	1,09	0,96	1,06
Unidades de Hemicell	100	138,6	0	14,4
	9 – 12 semanas			
Proteína	22,5	22,61	22,5	23,61
Grasa	7,9/8,0	7,91	9,0	9,02
Calcio	1,35	1,37	1,35	1,32
Fósforo total	0,86	0,93	0,86	0,90
Unidades de Hemicell	100	83,9	0	12,0

Análisis de Alimentos Devueltos, 12 – 20 semanas

Nutriente	<i>Tratamiento 1 con Hemicell®</i>		Tratamiento 2	
	Calculado	Analizado	Calculado	Analizado
	12 – 15 semanas			
Proteína	20	20,49	20	21,09
Grasa	7,79	8,25	8,89	9,03
Calcio	1,19	1,16	1,19	1,09
Fósforo total	0,76	0,78	0,76	0,77
Unidades de Hemicell	100	90,5	0	13,6
	15 – 18 semanas			
Proteína	17,5	17,20	17,5	16,24
Grasa	8,68	8,00	9,78	9,21
Calcio	0,98	0,96	0,98	0,94
Fósforo total	0,65	0,68	0,65	0,70
Unidades de Hemicell	100	98,6	0	5,6
	18 – 20 semanas			
Proteína	16,0	15,95	16,0	15,14
Grasa	9,14	8,93	10,29	10,39
Calcio	0,82	0,79	0,82	0,87
Fósforo total	0,57	0,61	0,57	0,65
Unidades de Hemicell	100	113,4	0	13,6

Medición de Glicoproteína

Se obtuvo sangre al final del ensayo de cuatro aves por corral seleccionadas al azar de los tratamientos 1, 2, y 5. La sangre se recolectó en tubos que contenían EDTA como anticoagulante, se mezcló, a continuación se centrifugó para precipitar las células enteras.

Se obtuvieron placas de prueba de AGP de pavo de Cardiotech Services (Louisville, KY). La prueba de AGP es un análisis basado en inmunodifusión. Se agregaron volúmenes iguales de muestras de prueba o de suero en los pocillos como lo recomienda el fabricante, luego de dos días de incubación a temperatura ambiente, se midió el diámetro de los anillos de inmunoprecipitación resultantes.

Se evaluó una muestra de estándar de AGP de pavo purificada provista en el kit en varias concentraciones para realizar una curva estándar como se muestra en la Figura 4. Se usó una ecuación de ajuste de la curva polinomial desarrollada a partir de los estándares para calcular el nivel plasmático de AGP de pavo en las muestras de prueba.

Cálculo de los Niveles de AGP y análisis estadístico con la prueba T de Student

Mananasa Hemicel (Tratamiento 1)			Control (Tratamiento 2)		
mm	AGP	valor atípico	mm	AGP	valor atípico
5,2	231,5		5,7	304,5	
4,8	181,6		5,1	218,4	
5	205,7		5,6	288,8	
5	205,7		5,3	245,1	
5	205,7		5,1	218,4	
5,1	218,4		5,1	218,4	
5,3	245,1		5,9	337,3	
6,1	372,3		5	205,7	
5,8	320,6		6,3	409,6	
4,7	170,2		7,5		687,1
4,9	193,4		6,45	439,1	
5	205,7		5,4	259,2	
5,2	231,5		5,1	218,4	
5,5	273,8		5,3	245,1	
5,7	304,5		5,1	218,4	
5,1	218,4		5,6	288,9	
4,7	170,2		5,6	288,9	
5	205,7		6,05	363,3	
4,5	148,5		5,6	288,9	
5,3	245,1		5,4	259,2	
5,2	231,5		5	205,7	
4,4	138,3		5	205,7	
4,3	128,4		5,2	231,5	
6,35	419,3		5,4	259,2	
4,9	193,4		4,8	181,6	
5,65	296,6		5	205,7	
5,2	231,5		5,2	231,5	
5	205,7		5,4	259,2	
4,8	181,6		4,8	193,4	
5,2	231,5		5,1	218,4	
7,5		687,1	4,2	118,9	
5	205,7		6,5	449,3	
Prom	226,4			260,5	
Desv. Estándar	63,4			74,6	
CV	28,0			28,6	
	Valor P de Prueba T			0,0284	

Se eliminaron los valores atípicos > 2 desviaciones estándar de la media.

El AGP plasmático promedio para el grupo tratado con enzimas fue significativamente menor que el control no tratado. Para este análisis, se eliminó un valor atípico del análisis de cada grupo. Estas pueden ser aves que experimentaron

una cantidad inusual de estrés debido a lesión o infección. La disminución de AGP causada por el alimento enzimático tuvo correlación con una mejora estadísticamente significativa en el rendimiento de las aves como se muestra a continuación en el Tratamiento 1 (mananasa) versus el Tratamiento 2.

5

Resultado de Crecimiento a los 140 días

Hemicell							
<i>Corral</i>	<i>Peso</i>	<i># Mort.</i>	<i>Peso Mort.</i>	<i>Alimento consumido</i>	<i>Tasa de Conversión</i>	<i>Aumento de Peso vivo</i>	<i>CV de peso a 140 días</i>
3	200,25	0	0	487,35	2,434	18,147	5,766
7	193,3	0	0	479,55	2,481	17,512	7,426
14	143,95	3	10,817	389,05	2,514	17,934	6,857
21	164,1	2	24,205	448,70	2,383	18,172	4,411
29	185,8	1	0,975	448,90	2,403	18,521	6,092
36	161,1	2	16,49	419,90	2,364	17,839	8,352
37	182,1	1	7,611	443,70	2,339	18,150	5,944
47	182,55	1	13,115	449,05	2,295	18,195	3,405
Prom.				445,78	2,402	18,059	6,032
	Prueba T Contra Trat. 2	Valor P			0,05	0,01	0,05
Control							
5	144,1	2	13,085	389,00	2,475	15,950	14,518
12	196,1	0	0	486,70	2,482	17,766	5,288
13	178,7	1	14,65	466,25	2,411	17,810	9,717
23	141,95	3	21,912	389,40	2,376	17,684	8,012
28	190,2	0	0	482,10	2,535	17,231	9,331
35	194,5	0	0	486,25	2,500	17,622	9,722
42	159,25	2	10,814	409,40	2,407	17,635	5,054
48	176,65	1	9,05	459,10	2,472	17,605	4,772
	Prom.			446,03	2,457	17,413	8,302

Las aves que reciben alimento con mananasa tenían un aumento de peso promedio mayor en un 3,7%, reducción de la conversión de alimento en un 2,3% y reducción en el CV (coeficiente de variación = desviación estándar / promedio) de la uniformidad del peso corporal. La reducción en el estrés inmunológico según lo indicaron los niveles reducidos de AGP sérico se correlacionaron con las mediciones de la mejora de crecimiento.

10

EJEMPLO 9

En este ejemplo se agregaron 1,4- β -mananasa de *B. lentus*, 1,3- β -glucanasa de *B. lentus*, y una combinación de las dos enzimas al alimento (una dieta convencional de maíz y soja). Cada uno de los tratamientos enzimáticos mejoraron el desempeño del crecimiento vivo en pavos hembra Nicholas 700 de seis semanas de vida, los resultados logrados por la combinación fueron inesperadamente mayores que los resultados logrados con los tratamientos que utilizaron sólo una de las enzimas.

El experimento usó 80 corrales de 40 pavos hembra. Los tratamientos se replicaron en diez (10) bloques, con ocho tratamientos (siete tratamientos con enzimas y un control negativo) randomizados en cada bloque.

El Tratamiento 3 usó una composición que comprende una enzima reductora del estrés inmunológico de acuerdo con la invención, 1,4- β -mananasa a 100 MU/tonelada de alimento. El Tratamiento 6 también usó una composición que comprende una enzima reductora del estrés inmunológico de acuerdo con la invención, 1,3- β -glucanasa a 60 MU/tonelada de alimento. El Tratamiento 8 usó una composición combinada de acuerdo con la invención, que comprende 1,4- β -mananasa a 100 MU/tonelada de alimento y 1,3- β -glucanasa a 60 MU/tonelada de alimento. El Tratamiento 1 fue un alimento de control sin enzima agregada. (1 MU = 4000 UI)

Se mezcló el alimento para asegurar la distribución uniforme de alimentos basales entre tratamientos. Las enzimas se mezclaron (rociaron) para asegurar una distribución uniforme de enzimas de prueba y para asegurar una condición similar del alimento entre tratamientos. Cada vez que se preparó el alimento para el tratamiento, se mezclaron una muestra del comienzo, el medio y el final de cada uno de los alimentos de tratamiento para formar una muestra compuesta. Se tomó una muestra del compuesto para cada tratamiento y para la verificación del nivel de enzimas.

Las dietas de los pavos alimentados en este estudio son alimentos típicos comerciales para pavos. Las dietas son representativas de lo que podría usarse en una operación comercial de crecimiento de pavos y por este motivo la dieta se ajustó luego de 3 semanas. Los resultados del crecimiento para los Tratamientos 1, 3, 6 y 8 se muestran en la tabla que sigue.

Tratamiento		Parámetros de crecimiento en 6 semanas			
		Mortalidad (%)	Peso Vivo Promedio (lbs)	Tasa de Conversión ¹	Conversión de alimento ajustada al peso ²
T1	Control	1,75 ^A	5,406 ^A	1,500 ^A	1,520 ^A
T3	1,4- β -mananasa (100 MU/tonelada)	1,50 ^A	5,484 ^{ABC}	1,495 ^{AB}	1,502 ^{AB}

Tratamiento		Parámetros de crecimiento en 6 semanas			
		Mortalidad (%)	Peso Vivo Promedio (lbs)	Tasa de Conversión ¹	Conversión de alimento ajustada al peso ²
T6	1,3-β-glucanasa (60 MU /tonelada)	1,50 ^A	5,540 ^C	1,467 ^C	1,465 ^C
T8	1,4-β-mananasa (100 MU/ tonelada) y 1,3-β-glucanasa (60 MU/ tonelada)	3,25 ^A	5,718 ^D	1,420 ^D	1,389 ^D

(1 MU = 4000 UI)

Nota 1: La tasa de conversión está corregida por la mortalidad.

Nota 2: La tasa de conversión ajustada al peso para cada tratamiento se calcula de la siguiente manera: (a) El peso vivo promedio de la prueba completa se resta del peso vivo promedio para el tratamiento, lo que da como resultado la Cantidad A; (b) la Cantidad A se divide por 6, lo que da como resultado la Cantidad B; (c) la Cantidad B se resta de la conversión de alimento, lo que resulta en la conversión de alimento ajustada al peso para el tratamiento. La estadística que se muestra es para el análisis de LSD; $P < 0,05$.

En comparación con el Tratamiento 1 (control), los pavos hembra que recibieron el Tratamiento 3 (alimento con 1,4-β-mananasa) tenían una mejora numérica en el peso vivo promedio y una mejora numérica en la conversión de alimento (reducción). De manera similar, los pavos hembra que recibieron el Tratamiento 6 (alimento con 1,3-β-glucanasa) presentaron peso vivo promedio mejorado en forma estadísticamente significativa y conversión de alimento mejorada en forma estadísticamente significativa (reducción).

De manera sorprendente, los pavos hembra que reciben el Tratamiento 8 (alimento con una combinación de 1,4-β-mananasa y 1,3-β-glucanasa) presentaron una mejora estadísticamente significativa inusualmente grande en el peso vivo promedio y una mejora estadísticamente significativa inusualmente grande en la tasa de conversión (reducción). Los resultados observados con el Tratamiento 8 fueron mayores de lo que podría explicarse con un efecto aditivo de las dos enzimas administradas en forma individual. De este modo, el tratamiento combinado que comprende 1,4-β-mananasa y 1,3-β-glucanasa produjo una mejora inesperadamente grande en el rendimiento.

EJEMPLO 10

En este ejemplo, se agregaron 1,3- β -glucanasa de *B. lentus*, xiloglucanasa de *B. lentus* y una combinación de las dos enzimas al alimento (una dieta común de soja y maíz). Cada uno de los tratamientos con enzimas mejoró el rendimiento vivo en pollos de carne machos de 35 días de vida, los resultados logrados por la combinación fueron mayores que los resultados logrados con los tratamientos que usan solamente una de las enzimas.

El experimento usó 49 corrales de 44 pollos macho Cobb x Cobb. Los tratamientos se replicaron en siete bloques, con siete tratamientos (seis tratamientos con enzimas y un control negativo) randomizados en cada bloque.

El Tratamiento 4 usó una composición que comprende una enzima reductora del estrés inmunológico de acuerdo con la invención, 1,3- β -glucanasa a 70 MU/tonelada de alimento. El Tratamiento 5 usó también una composición que comprende una enzima reductora del estrés inmunológico de acuerdo con la invención, xiloglucanasa a 100 MU/tonelada de alimento. El Tratamiento 6 usó una composición combinada de acuerdo con la invención, que comprende xiloglucanasa a 100 MU/tonelada de alimento y 1,3- β -glucanasa a 60 MU/tonelada de alimento. El Tratamiento 1 fue un alimento de control sin enzima agregada. (1 MU = 4000 UI).

Se mezcló el alimento para asegurar la distribución uniforme de alimentos basales entre tratamientos. Todas las enzimas se mezclaron (rociaron) para asegurar una distribución uniforme de enzimas de prueba y para asegurar una condición similar del alimento entre tratamientos. Cada vez que se preparó el alimento para el tratamiento, se mezclaron una muestra del comienzo, el medio y el final de cada uno de los alimentos de tratamiento para formar una muestra compuesta. Se tomó una muestra del compuesto para cada tratamiento y para la verificación del nivel de enzimas.

Las dietas administradas en este estudio son alimentos típicos para pollos de carne. Las dietas son representativas de lo que podría usarse en una producción comercial de pollos de carne y por este motivo la dieta se ajustó luego de 3 semanas. Los resultados del crecimiento para los Tratamientos 1, 4, 5, y 6 luego de 35 días de crecimiento se muestran en la tabla que sigue:

		Parámetros de crecimiento en 6 semanas			
Tratamiento		Mortalidad (%)	Peso Vivo Promedio (lbs)	Tasa de Conversión ¹	Tasa de Conversión ajustada al peso ²
T1	Control	3,25 ^A	4,347 ^A	1,675 ^A	1,690 ^A
T4	1,3-β-glucanasa (70 MU /tonelada)	3,25 ^A	4,433 ^{AB}	1,651 ^{AB}	1,651 ^{AB}
T5	Xiloglucanasa (100 MU /tonelada)	2,92 ^A	4,415 ^{AB}	1,646 ^{AB}	1,650 ^{AB}
T6	Xiloglucanasa (100 MU/ tonelada) y 1,3-β-glucanasa (70 MU/ tonelada)	4,55 ^A	4,461 ^{AB}	1,643 ^{AB}	1,639 ^{AB}

(1 MU = 4000 UI)

Nota 1: La tasa de conversión se corrige por la mortalidad.

Nota 2: La tasa de conversión ajustada al peso para cada tratamiento se calcula como se describió con anterioridad. Las estadísticas que se muestran son para el análisis de LSD; P < 0,05.

En comparación con el Tratamiento 1 (control), los pollos que recibieron el Tratamiento 4 (1,3-β-glucanasa) presentaron una mejora numérica en el peso vivo promedio y una conversión de alimento numéricamente mejorada (reducción). De manera similar, los pollos que recibieron el Tratamiento 5 (alimento con xiloglucanasa) presentaron una mejora numérica en el peso vivo promedio y una conversión de alimento numéricamente mejorada (reducción).

Los pollos que recibieron el Tratamiento 6 (una combinación de 1,3-β-glucanasa y xiloglucanasa) lograron mejoras en su peso vivo promedio y conversiones de alimentos mayores que el efecto observado cuando las enzimas se administraron en forma individual. De este modo, el tratamiento combinado que comprende 1,3-β-glucanasa y xiloglucanasa logró una mejora significativa en el desempeño de crecimiento.

EJEMPLO 11

Reducción de PFA sérica de pollo por aplicación de enzimas en el alimento

Se criaron pollos de carne de 1 a 14 días y se alimentaron con una dieta de inicio típica de soja y maíz (como se muestra en la Tabla de Composición de la dieta a continuación) con el agregado de varias enzimas (como se resume en la tabla de

Enzimas a continuación). Los tamaños de muestras para cada tipo de enzima incluyeron tres jaulas con ocho aves por jaula.

Composición de la dieta

Ingerdiente	Porcentaje
Maíz, 7,35% PC	53,98
Harina de soja 47,2 PC	39,03
Aceite de soja	3,0
Caarbonato Cálcico	1,307
Fosfato dicálcico	1,735
Sal (NaCl)	0,331
DL Metionina	0,186
Pre-mezcla de vitaminas	0,25
Cloruro de colina al 60%	0,05
Sulfato de cobre	0,05

5

Enzimas

Trat.	Enzima 1	Enzima 2	Enzima 3	Mg/l AGP	Val P Prueba T
A	-	-	-	268,1	
B	1,3- β -galactanasa (46,495 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (85,312 UI/ tonelada)	-	281,4	
C	1,3- β -galactanasa (9,8911 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (181,488 UI/ tonelada)	-	266,6	
D	1,4- β -galactanasa (81,046 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (174,889 UI/ tonelada)	-	261,7	
E	1,4- β -galactanasa (114,418 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (246,902 UI/ tonelada)	-	261,7	
F	xilanasa (95,225 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (381,142 UI/ tonelada)	-	257,8	
G	quitinasa (5,218 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (27,016 UI/ tonelada)	-	263,8	
H	quitinasa (5,218 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (205,807 UI/ tonelada)	-	220,2	0,040
I	1,3- β -glucanasa (127,042 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (181,488 UI/ tonelada)	-	236,9	0,125
J	xilanasa (126,758 UI/ tonelada)	1,4- β -mananasa (362,976 UI/ tonelada)	esterasa	234,5	0,083

La "esterasa" en el Tratamiento J es una enzima no caracterizada de un gen de *B. lentus* en el mismo operón con xilanasa. El sustrato para esta enzima no se identificó. Su asignación como "esterasa" se basa en la similitud de la secuencia de ADN de este gen con otros genes de esterases conocidas. La actividad de esterasa no se determinó, pero sería similar al nivel de xilanasa si las dos proteínas tienen actividades específicas similares.

La 1,4- β -galactanasa y la 1,3-galactanasa se midieron usando un ensayo de azúcares reductores con sustrato de pectina.

A los 14 días, se recolectó suero de la sangre de todas las aves y se analizaron las muestras para determinar el contenido de α -1-glicoproteína ácida (AGP) como se describió con anterioridad. El nivel promedio de α -1-glicoproteína ácida de cada uno de los grupos de tratamiento se muestra en la tabla anterior.

Como se refleja la tabla, con relación al Tratamiento A (sin enzima), los Tratamientos H, I y J dieron como resultado la reducción de AGP sérica.

El Tratamiento H (quitinasa más 1,4- β -mananasa) produjo resultados significativos luego de sólo dos semanas de crecimiento. Aunque las cantidades de enzimas fueron a niveles que no mostraron una respuesta en otros Tratamientos (comparar con el Tratamiento G con una cantidad comparable de quitinasa y los Tratamientos E y F con una cantidad comparable de 1,4- β -mananasa), la combinación de quitinasa y 1,4- β -mananasa dio como resultado una reducción significativa de AGP, que no podría predecirse a partir de los resultados obtenidos cuando sólo se usó una enzima.

El Tratamiento I (1,3- β -glucanasa y 1,4- β -mananasa) produjo resultados notables, aunque no claramente significativos a nivel estadístico en este experimento (valor P de 0,125). En otros análisis de duración mayor, el tratamiento con 1,3- β -glucanasa y 1,4- β -mananasa tuvo un efecto significativo en el nivel de AGP.

La comparación del Tratamiento J (xilanasa, 1,4- β -mananasa, esterasa; P = 0,083 vs Tratamiento A control) con el Tratamiento F (xilanasa + 1,4- β -mananasa, sin "esterasa") revela que el Tratamiento J produjo un efecto notable, donde el Tratamiento F no mostró reducción de AGP.

EJEMPLO 12

Este ejemplo evalúa la hipótesis de que alterar una composición alimentaria para que incluya ingredientes que estimulan el sistema inmunológico innato aumentará los niveles séricos de PFA.

Se realizó un ensayo en pollos de carne de 21 días usando una dieta de soja y maíz basal con una dieta de alta energía con aceite de soja como control. Para obtener las dietas de prueba, la dieta de control se modificó para que contenga

materiales prácticos que se sospecha que tienen componentes estimulantes inmunológicos mientras que mantiene el mismo valor nutricional equivalente aproximado. Las dietas de prueba incluyeron las siguientes variaciones:

Maíz/soja /aceite de soja como control

5 Inclusión de aceite AV mezclado (aceite animal vegetal mezclado);

Inclusión de lecitina de soja;

Inclusión de Harina de carne de ave;

Inclusión de DDGS (granos de destilería de maíz desecados con solubles) al 5% con cáscara de soja;

10 Inclusión de DDGS al 15% sin cáscara de soja.

Las dietas se describen en mayor detalle en las tablas que siguen.

Se espera que la AV mezclado y lecitina de soja contenga fosfolípidos que comprenden fosfatidilserina estimulante del sistema inmunológico innato. El harina de carne de aves puede contener fosfatidilserina, hialuronano y varios estimulantes microbianos que derivan de crecimiento microbiano secundario o los desperdicios que podrían ocurrir antes del procesamiento. Se espera que DDGS contenga abundante residuo de levadura, entre los que se incluye paredes celulares que comprenden α -manano, 1,3- β -glucano y quitina, así como polímeros de carbohidrato no fermentado potencialmente estimulantes del sustrato de fermentación original.

20

Composición de la dietas

Ingrediente	Porcentaje de la Composición					
	Dieta #1	Dieta #2	Dieta #3	Dieta #4	Dieta #5	Dieta #6
Maíz 7,35% PC	56,9707	56,2985	56,2985	59,878	47,7939	49,3523
Harina de Soja 48,5% PC	36,4392	36,5403	36,5402	29,048	29,0293	29,0284
Aceite de soja	2,5279	0	0	1,7221	3,1922	2,6831
Aceite AV	0	3,0975	0	0	0	0
Lecitina de soja	0	0	3,0975	0	0	0
BPM de Ave ^a 65%	0	0	0	5,0	0	0
Cáscara de soja ^d	0	0	0	1,0559	1,0586	0
DDGS ^b	0	0	0	0	15	15
Carbonato Cálcico	1,3129	1,3118	1,3118	1,2224	1,4158	1,4293
Fosfato dicálcico	1,7527	1,7544	1,7544	1,766	1,5615	1,5576
Sal	0,3312	0,3315	0,3315	0,2313	0,1416	0,1407
DL-metionina	0,2404	0,241	0,240	0,2276	0,2419	0,2392
L-lisina HCl	0	0	0	0,0131	0,1402	0,1402
Pre-mezcla de vitamina 0,25%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Pre-mezcla mineral 0,075%	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075

Ingrediente	Porcentaje de la Composición					
	Dieta #1	Dieta #2	Dieta #3	Dieta #4	Dieta #5	Dieta #6
Cloruro de colina 60%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sulfato de cobre	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

^a BPM = Harina de sub-productos de ave; DDGS = Granos de destilería de maíz desecados con soluble);

^c AV Mezclado = Aceite animal vegetal mezclado;

^d La adición de cáscaras de soja a la dieta con harina de sub-productos de aves
5 igualara el contenido de manano para compensar la reducción en la harina de soja

Para cada dieta, se criaron pollos de carne (Cobb x Cobb) en tres jaulas en baterías Petersime con ocho aves por jaula (0,059 m² por ave). Luego de 21 días, los niveles séricos de AGP de cada ave se analizaron como se describe en los ejemplos
10 anteriores.

Las dietas modificadas mostraron evidencia clara de estimulación del sistema inmunológico innato basada en aumentos significativos en el AGP sérico a los 21 días, como se muestra en la tabla que sigue. Los datos también resaltan las oportunidades para reducir el estrés inmunológico causado por los componentes de la dieta de acuerdo con la invención, tales como por el uso de composiciones que comprenden
15 enzimas que degradan los componentes inductores del estrés inmunológico.

Dieta	Adición	Mg/L AGP	Prueba T (valor P contra 1)
1	Control	221,9	
2	AV Mezclado	301,2	0,01882
3	Lecitina	309,0	0,01052
4	Harina de sub-productos de ave	265,8	0,08613
5	DDGS con cáscara	307,6	0,00002
6	DDGS	386,7	0,00275

EJEMPLO 13

Este ejemplo demuestra la eficacia de las composiciones que comprenden 1,3- β -glucanasa en la reducción del estrés inmunológico asociado con 1,3- β -glucano, que está presente en productos alimentarios y, en virtud de su asociación con las paredes celulares fúngicas, es un patrón molecular aparentemente reconocido a nivel universal por el sistema inmunológico innato de los animales. Los resultados muestran que, al igual que 1,4- β -mananasa, 1,3- β -glucanasa reduce los niveles séricos de PFA y mejora el rendimiento del crecimiento animal.

Se criaron pollos de carne (Cobb x Cobb) desde el día 1 hasta 21 con una dieta típica de maíz y soja con bajo contenido de grasa como se muestra en la tabla que sigue. En dos casos, las dietas se suplementaron por rocío en forma uniforme soluciones concentradas de enzima líquida preparada con fermentaciones de *B. lentus* para aplicar 400.000 UI/ tonelada de 1,4- β -mananasa o 264.000 UI/ tonelada de 1,3- β -glucanasa. (En este caso, una tonelada representa 907,4 kg.)

Composición de la dieta

Ingrediente	% Dieta
Maíz 7,35% PC	59,5757
Harina de Soja 48,5% PC	36,0474
Aceite de soja	0,321
Carbonato Cálcico	1,3175
Fosfato dicálcico	1,7461
Sal	0,3294
DL-metionina	0,2378
Pre-mezcla de vitaminas 0,25%	0,25
Pre-mezcla mineral 0,075%	0,075
Cloruro de colina 60%	0,05
Sulfato de cobre	0,05

Para cada tipo de dieta, se criaron las aves en tres jaulas en baterías Petersime con ocho aves por jaula (0,059 m² por ave). Luego de 21 días, los niveles séricos de AGP de cada ave se analizaron como se describe en los ejemplos anteriores. Los pesos de las aves y el alimento consumido se determinaron usando procedimientos estándar y se calculó la conversión de alimento. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

La WAFC (Tasa de conversión ajustada al peso) se calcula de la siguiente manera:

$$WAFC = FC - 2,204 * ((W-Wa)/3)$$

donde

FC = peso de alimento consumido/peso aumentado

Wa = peso promedio de todas las aves en el ensayo

W = promedio de aumento de peso vivo por jaula

5

Tratamiento	mg/L AGP	Prueba T, P contra Control	WAFC	Valor P
Control (sin enzima)	255,4	-	1,47	a
1,4-β-mananasa	184,1	0,011	1,39	ab
1,3-β-glucanasa	157,7	0,001	1,26	c

10 Tanto 1,4-β-mananasa y 1,3-β-glucanasa redujeron los niveles séricos de α-1-glicoproteína ácida (AGP). Ambos tratamientos con enzimas redujeron la conversión de alimento ajustada al peso, y la reducción en el grupo que recibió 1,3-β-glucanasa fue estadísticamente significativa.

EJEMPLO 14

15 Se condujo un ensayo en pollos de carne en jaulas en baterías Petersine con el alimento y los métodos descritos en el Ejemplo 13 anterior, excepto que con diferentes tratamientos con enzimas, como se resume en la tabla a continuación.

20 Se obtuvo Lyticase, un producto crudo de 1,3-β-glucanasa obtenido por la fermentación de *Arthrobacter luteus*, de Sigma Chemical Company, St. Louis Mo. La actividad de Lyticase se determinó por el método de azúcares reductores descrito más abajo y se aplicaron 60 MU/tonelada (equivalente a 240.000 UI/toneladas). De acuerdo con el fabricante, este producto también contiene otras actividades, entre las que se incluye la actividad de quitinasa, que no se midió.

Tratamiento	Enzima(s)	Dosis (MU /tonelada)	AGP (mg/l)
1	ninguna	0	215,5
2	1,3-β-glucanasa	3	213,7
3	1,3-β-glucanasa	15	199,4
4	1,3-β-glucanasa	30	185,5
5	1,3-β-glucanasa	60	201,0
6	1,3-β-glucanasa 1,4-β-mananasa	60 100	189,2
7	1,3-β-glucanasa	75	194,9
8	1,3-β-glucanasa	90	180,7
9	Lyticase	60	165,2

Tratamiento	Enzima(s)	Dosis (MU /tonelada)	AGP (mg/l)
10	Xiloglucanasa	100	162,2

(1 MU = 4000 UI)

El aumento en los niveles de 1,3- β -glucanasa de hasta alrededor de 30 MU/tonelada (120.000 UI/ tonelada) aumentó el efecto sobre el nivel de AGP (por ej., una respuesta a la dosis). Al suministrar este tipo de alimento para animales con alrededor de 30 MU/tonelada (120.000 UI/ tonelada) se espera que la 1,3- β -glucanasa reduzca el estrés inmunológico, como refleja un nivel reducido de AGP sérico y/o una mejora en el rendimiento del crecimiento animal.

Los resultados también muestran que la xiloglucanasa fue efectiva en la reducción de los niveles de AGP. La xiloglucanasa (EC 3.2.1.151) es una 1,4- β -glucanasa con especificidad por xiloglucano, un polímero estructural en plantas.

Con excepción de la Lyticase, la totalidad de la enzimas usadas en este ejemplo fueron producidas por *B. lentus*. La Lyticase es producida por *A. luteus* que se ha reclasificado como *Cellulosimicrobium cellulans*. La fermentación de *A. luteus* ha demostrado que produce múltiples formas de 1,3- β -glucanasa. Ver, por ej., (Ferrer, P. *Microb Cell Factories* 5:10, 2006, publicado online el 17 de marzo de 2006. doi: 10.1186/1475-2859- 5-10). Los resultados anteriores muestran que la Lyticase redujo el AGP sérico del pollo por lo menos tanto como la preparación con *B. lentus* de 1,3- β -glucanasa, indicando que el origen de la enzima no es importante. Es decir, pueden usarse enzimas de cualquier origen de acuerdo con la invención. También es posible que la quitinasa (de la que informó Sigma que está presente en la Lyticase) pueda haber mejorado el rendimiento del tratamiento con Lyticase.

EJEMPLO 15

Pueden usarse los siguientes ensayos para evaluar la actividad de las enzimas

(I) Xiloglucanasa

La actividad de xiloglucanasa puede valorarse usando el siguiente protocolo:

Reactivo DNS: NaOH 10 g/l, fenol 2 g/l, ácido dinitrosalicílico 10 g/l, tartrato ácido de potasio tetrahidrato 1200 g/l, se prepara diariamente. Inmediatamente antes de usar, se adiciona 0,5 g/l de sulfito de sodio anhidro.

Soluciones estándar y Curva estándar: Se prepara una serie de soluciones estándar de D-(+)-manosa disuelta en agua en el intervalo de concentración de 0,1 a 0,5 g/litro. Se adiciona 0,6 ml de cada estándar de manosa (por duplicado o triplicado) a 1,5 ml de solución de trabajo de DNS en tubos de vidrio de 13 x 100 mm. Una muestra con una alícuota de 0,6 ml de agua puede usarse como blanco de reactivo

para llevar a cero el espectrofotómetro. Las soluciones se calientan en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, se enfrían hasta la temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 550 nm. El resultado esperado es una respuesta de dosis lineal entre 0,20 y 1,2 unidades O.D. La pendiente de la curva estándar (O.D. 550/g/l de manosa) se calcula a partir de la porción lineal de la curva solamente. Con esta pendiente, se determina el valor en g/l de azúcar reductor en las reacciones enzimáticas.

Sustrato de xiloglucano: El xiloglucano (Tamarind) que se obtiene de Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Co., Irlanda, se disuelve a 5 g/l en buffer Tris 50 mM, pH 7,5 con glucosa 0,05%.

Condiciones de la reacción: Se usan 0,25 ml de sustrato xiloglucano 5 g/l con una dilución enzimática de 0,05 ml en buffer Tris 50 mM, y la mezcla de reacción se incuba a 40°C. Se adiciona 0,75 ml de reactivo DNS para detener la reacción, y la mezcla de reacción interrumpida se calienta en un baño de agua hirviendo durante cinco minutos y luego se enfría para leer la absorbancia a 550 nm. Se usa un punto de tiempo cero con solución enzimática para determinar el nivel de fondo.

Cálculos: Una MU de xiloglucanasa de ChemGen se define como la capacidad de producir 0,72 gramos de azúcar reductor por minuto (usando manosa pura, un azúcar reductor, como estándar). Una MU de ChemGen es equivalente a 4000 UI. En otras palabras, una U CG es equivalente a 250 UI (UI = 1,0 μ mol/minuto).

(II) B-1,3-glucanasa

La actividad de β -1,3-glucanasa puede evaluarse usando el siguiente protocolo:

Este ensayo usa el mismo reactivo de DNS, soluciones estándar, curva estándar, y cálculo de unidad enzimática y cantidad de dilución como se describió con anterioridad para el análisis de xiloglucanasa. El buffer usado es un buffer MOPS (Ácido 4- Morfolinpropansulfónico, PM = 209,26) 50 mM a pH 6,5.

Sustrato CM pachyman: El carboximetil pachyman (CM Pachyman, CMP) se obtiene de Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Co., Irlanda. El sustrato de CMP se prepara a 5 g/l por la incorporación lenta de CMP en una solución con agitación rápida de buffer MOPS 50 mM (pH 6,5) a alrededor de 90°C. El polvo enzimático se dispersa bien, y el recipiente se cubre o se sella herméticamente, mientras que la suspensión se calienta lentamente hasta hervir y se mantiene durante 30 minutos con agitación en una placa de agitación calentada, para obtener un gel bien hidratado sin pequeños coágulos de gel no hidratado visibles en la solución. La solución se enfría hasta la temperatura ambiente, se almacena a 4°C cuando no está en uso, y se mezcla bien antes de usar luego de almacenar.

Condiciones de la reacción: Se usan 0,25 ml de sustrato de CM Pachyman 5 g/l con 0,05 ml de dilución enzimática en buffer MOPS y la mezcla de reacción se incuba

a 40°C varias veces, hasta 45 minutos. Se adiciona 0,75 ml de reactivo DNS para detener la reacción. La mezcla de reacción detenida se calienta en un baño de agua hirviendo durante cinco minutos y luego se enfría antes de leer la absorbancia a 550 nm. Se usa un punto de tiempo cero con solución enzimática para determinar el nivel de fondo.

(III) Quitinasa

La actividad de quitinasa puede determinarse usando el sustrato fluorogénico de quitina que se describe en Thompson et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4001-008 (2001), 4-metilumbelliferil-beta-D-N,N',N'',N'''-tetraacetilquitotetraósido. El sustrato se disuelve en DMSO a 2,5 mM.

En un ensayo ejemplificativo, se usa 20 µl de sustrato de quitina (2,5 mM) con 150 µl de Tris (20,0 mM, pH 7,5). La mezcla de sustrato se coloca en una placa de microtitulación negra de 98 pocillos y se pre-calienta hasta 37°C durante 10 minutos. Se inician múltiples repeticiones de las reacciones con la adición de 30 µl de enzima diluida y se continúa la incubación a 37°C. Las reacciones individuales se detienen a los 2, 4, 6, 8 y 10 minutos con 50 µl de Na₂CO₃ 3 M. La fluorescencia se lee en un lector de placas de microtitulación (Fluoroscan II) usando longitudes de onda del filtro de paso de banda de excitación a 355 nm y filtro de paso de banda de emisión a 460 nm. La enzima se diluye de manera tal que se produce 4-metilumbelliferona a un índice lineal durante el término de la reacción y dentro del intervalo de una curva estándar producida en condiciones idénticas al ensayo enzimático pero sin presencia de enzima y sustrato. La liberación de un micromol de 4-metilumbelliferona por minuto se define como una UI. Se realiza una curva estándar con múltiples concentraciones entre cero y 1x10⁻⁴ micromoles de 4-metilumbelliferona en 200 µl de solución buffer de reacción seguido de la incorporación de 50 µl de Na₂CO₃ 3 M.

Aunque la invención se ha descrito y ejemplificado en detalle suficiente para ser realizada y usada por los expertos en la técnica, varias alternativas, modificaciones y mejoras resultarán obvias sin alejarse del alcance de la invención. Los ejemplos provistos en la presente memoria son representativos de las realizaciones preferidas, son ejemplificativos y no pretenden ser limitativos del alcance de la invención. Las personas con experiencia en la técnica idearán modificaciones a la misma y otros usos. Esas modificaciones están abarcadas dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de alimento para animales apropiada para administración oral a un animal que comprende una cantidad de una enzima reductora del estrés inmunológico efectiva para reducir el nivel de proteína de fase aguda positiva en dicho animal, aumentar el nivel de proteína de fase aguda negativa en dicho animal, y/o mejorar el desempeño del crecimiento animal, en un vehículo aceptable para administración oral, en donde:

(i) dicha cantidad efectiva es por lo menos 20 UI de enzima/kg de alimento;

(ii) dicha enzima es distinta de una semicelulasa tipo β -mananasa o fosfolipasa;

(iii) dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en 1,3- β -glucanasa, β -glucosidasa, xiloglucanasa, ARNasa L, adenosina desaminasa específica de dsARN, endonucleasa de restricción específica de CG, N-glicanasas, α -1,2-fucosidasa, α -1,3-1,4-fucosidasa, α -1,6-manosidasa, α -1,2-manosidasa, α -1,3-manosidasa, β -1,4-galactosidasa, endo- β -N-acetilglucosaminidasa F (endo F), péptido-N-(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), PNGasa A, endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H), endo D, endo C, α -N-acetilgalactosamidasa, β -1,3-galactosidasa, endo-N-acilneuraminidasa (endo N), α -2,3-neuraminidasa, α -2,6-neuraminidasa, α -2,8-neuraminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, endo- β -N-galactosidasa, endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, endo- α -1,6-D-mananasa, arabinogalactanasa, α -mananasa, α -manosidasa, esfingomielinasa, quitinasa, quitin desacetilasa, carbohidrato desacetilasa, N-acetilglucosaminidasa, fosfatidilserina descarboxilasa, sulfatasa, p-galactosidasa, arabinanasa, hialuronidasa, α -arabinofuranosidasa, condroitinasa, glucocerebrosidasa, metil esterasa, esterasa de ácido ferúlico, furuloil esterasa, acetil esterasa, carbohidrato desacetilasa, fosforilcolina hidrolasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, fosforilcolina esterasa y fosforilcolina fosfatasa.

2. Una composición líquida apropiada para administración oral a un animal que comprende una enzima reductora del estrés inmunológico en un vehículo aceptable para administración oral, en donde:

(i) dicha composición comprende por lo menos 40.000 UI de enzima/L;

(ii) dicha enzima es distinta de una semicelulasa tipo β -mananasa o fosfolipasa;

- (iii) dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en 1,3- β -glucanasa, β -glucosidasa, xiloglucanasa, ARNasa L, adenosina desaminasa específica de dsARN, endonucleasa de restricción específica de CG, N-glicanasas, α -1,2-fucosidasa, α -1,3-1,4-fucosidasa, α -1,6-manosidasa, α -1,2-manosidasa, α -1,3-manosidasa, β -1,4-galactosidasa, endo- β -N-acetilglucosaminidasa F (endo F), péptido-N-(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), PNGasa A, endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H), endo D, endo C, α -N-acetilgalactosamidasa, β -1,3-galactosidasa, endo-N-acilneuraminidasa (endo N), α -2,3-neuraminidasa, α -2,6-neuraminidasa, α -2,8-neuraminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, endo- β -N-galactosidasa, endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, endo- α -1,6-D-mananasa, arabinogalactanasa, α -mananasa, α -manosidasa, esfingomielinasa, quitinasa, quitin desacetilasa, carbohidrato desacetilasa, N-acetilglucosaminidasa, fosfatidilserina descarboxilasa, sulfatasa, β -galactosidasa, arabinanasa, hialuronidasa, α -arabinofuranosidasa, condroitinasa, glucocerebrosidasa, metil esterasa, esterasa de ácido ferúlico, furuloil esterasa, acetil esterasa, carbohidrato desacetilasa, fosforilcolina hidrolasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, fosforilcolina esterasa y fosforilcolina fosfatasa; y
- (iv) si dicha enzima comprende 1,3- β -glucanasa, dicha composición líquida comprende por lo menos 155.000 UI de 1,3- β -glucanasa/L.

3. Una composición sólida para administración oral a un animal que comprende una enzima reductora del estrés inmunológico en un vehículo aceptable para administración oral, en donde:

- (i) dicha composición comprende por lo menos 40.000 UI de enzima/kg,
- (ii) dicha enzima es distinta de una semicelulasa tipo β -mananasa o fosfolipasa;
- (iii) dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en 1,3- β -glucanasa, β -glucosidasa, xiloglucanasa, ARNasa L, adenosina desaminasa específica de dsARN, endonucleasa de restricción específica de CG, N-glicanasas, α -1,2-fucosidasa, α -1,3-1,4-fucosidasa, α -1,6-manosidasa, α -1,2-manosidasa, α -1,3-manosidasa, β -1,4-galactosidasa, endo- β -N-acetilglucosaminidasa F (endo F), péptido-N-(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), PNGasa A, endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H), endo D, endo C, α -N-acetilgalactosamidasa, β -1,3-galactosidasa, endo-N-acilneuraminidasa (endo N), α -2,3-neuraminidasa, α -2,6-neuraminidasa, α -2,8-neuraminidasa,

- β -N-acetilhexosaminidasa, endo- β -N-galactosidasa, endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, endo- α -1,6-D-mananasa, arabinogalactanasa, α -mananasa, α -manosidasa, esfingomielinasa, quitinasa, quitin desacetilasa, carbohidrato desacetilasa, N-acetilglucosaminidasa, fosfatidilserina
- 5 descarboxilasa, sulfatasa, β -galactosidasa, arabinanasa, hialuronidasa, α -arabinofuranosidasa, condroitinasa, glucocerebrosidasa, metil esterasa, esterasa de ácido ferúlico, furuloil esterasa, acetil esterasa, carbohidrato desacetilasa, fosforilcolina hidrolasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, fosforilcolina esterasa y fosforilcolina fosfatasa; y
- 10 (iv) si dicha enzima comprende 1,3- β -glucanasa, dicha composición comprende por lo menos 300.000 UI de 1,3- β -glucanasa/kg.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición es un alimento para animales que comprende un componente que induce una respuesta inmunológica en el animal y en donde la enzima comprende una enzima que degrada dicho
- 15 componente.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde dicho componente es un antígeno presentado por un microorganismo patogénico.
6. La composición de la reivindicación 3 que comprende por lo menos una enzima reductora del estrés inmunológico en una cantidad de por lo menos 80.000 UI de
- 20 enzima/kg.
7. La composición de la reivindicación 3 que comprende por lo menos una enzima reductora del estrés inmunológico en una cantidad de por lo menos 160.000 UI de enzima/kg.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la enzima
- 25 comprende 1,3- β -glucanasa.
9. La composición de la reivindicación 1, que comprende por lo menos 30 UI de 1,3- β -glucanasa/kg de alimento.
10. La composición de la reivindicación 2, que comprende por lo menos 230.000 UI de 1,3 - β -glucanasa/L.
- 30 11. La composición de la reivindicación 3, que comprende por lo menos 450.000 UI de 1,3- β -glucanasa/kg.
12. Una composición de alimento para animales que comprende dos o más de las enzimas reductoras del estrés inmunológico seleccionadas del grupo que consiste en 1,4- β -mananasa, 1,3- β -glucanasa, β -glucosidasa, xiloglucanasa, ARNasa L, adenosina desaminasa específica de dsARN, endonucleasa de restricción específica
- 35 de CG, N-glicanasas, α -1,2-fucosidasa, α -1,3-1,4-fucosidasa, α -1,6-manosidasa, α -1,2-manosidasa, α -1,3-manosidasa, β -1,4-galactosidasa, endo- β -N-

- acetilglucosaminidasa F (endo F), péptido-N-(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), PNGasa A, endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H), endo D, endo C, α -N-acetilgalactosamidasa, β -1,3-galactosidasa, endo-N-acilneuraminidasa (endo N), α -2,3-neuraminidasa, α -2,6-neuraminidasa, α -2,8-neuraminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, endo- β -N-galactosidasa, endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, endo- α -1,6-D-mananasa, arabinogalactanasa, α -mananasa, α -manosidasa, esfingomielinasa, quitinasa, quitina desacetilasa, carbohidrato desacetilasa, N-acetilglucosaminidasa, fosfatidilserina descarboxilasa, sulfatasa, β -galactosidasa, arabinanasa, hialuronidasa, α -arabinofuranosidasa, condroitinasa, glucocerebrosidasa, metil esterasa, esterasa de ácido ferúlico, furuloil esterasa, acetil esterasa, carbohidrato desacetilasa, fosforilcolina hidrolasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, fosforilcolina esterasa y fosforilcolina fosfatasa, siempre que, si la composición contiene 1,4- β -mananasa y 1,3- β -glucanasa, contiene por lo menos 20 UI de 1,3- β -glucanasa/kg de alimento.
13. Una composición líquida que comprende dos o más de las enzimas reductoras del estrés inmunológico seleccionadas del grupo que consiste en 1,4- β -mananasa, 1,3- β -glucanasa, β -glucosidasa, xiloglucanasa, ARNasa L, adenosina desaminasa específica de dsARN, endonucleasa de restricción específica de CG, N-glicanasas, α -1,2-fucosidasa, α -1,3-1,4-fucosidasa, α -1,6-manosidasa, α -1,2-manosidasa, α -1,3-manosidasa, β -1,4-galactosidasa, endo- β -N-acetilglucosaminidasa F (endo F), péptido-N-(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), PNGasa A, endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H), endo D, endo C, α -N-acetilgalactosamidasa, β -1,3-galactosidasa, endo-N-acilneuraminidasa (endo N), α -2,3-neuraminidasa, α -2,6-neuraminidasa, α -2,8-neuraminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, endo- β -N-galactosidasa, endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, endo- α -1,6-D-mananasa, arabinogalactanasa, α -mananasa, α -manosidasa, esfingomielinasa, quitinasa, quitina desacetilasa, carbohidrato desacetilasa, N-acetilglucosaminidasa, fosfatidilserina descarboxilasa, sulfatasa, β -galactosidasa, arabinanasa, hialuronidasa, α -arabinofuranosidasa, condroitinasa, glucocerebrosidasa, metil esterasa, esterasa de ácido ferúlico, furuloil esterasa, acetil esterasa, carbohidrato desacetilasa, fosforilcolina hidrolasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, fosforilcolina esterasa y fosforilcolina fosfatasa, siempre que, si la composición contiene 1,4- β -mananasa y 1,3- β -glucanasa, contiene por lo menos 155.000 UI de 1,3- β -glucanasa/L.
14. Una composición sólida que comprende dos o más de las enzimas reductoras del estrés inmunológico seleccionadas del grupo que consiste en 1,4- β -mananasa, 1,3- β -glucanasa, β -glucosidasa, xiloglucanasa, ARNasa L, adenosina desaminasa específica

de dsARN, endonucleasa de restricción específica de CG, N-glicanasas, α -1,2-fucosidasa, α -1,3-1,4-fucosidasa, α -1,6-manosidasa, α -1,2-manosidasa, α -1,3-manosidasa, β -1,4-galactosidasa, endo- β -N-acetilglucosaminidasa F (endo F), péptido-N-(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), PNGasa A, 5 endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H), endo D, endo C, α -N-acetilgalactosamidasa, β -1,3-galactosidasa, endo-N-acilneuraminidasa (endo N), α -2,3-neuraminidasa, α -2,6-neuraminidasa, α -2,8-neuraminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, endo- β -N-galactosidasa, endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, endo- α -1,6-D-mananasa, arabinogalactanasa, α -mananasa, α -manosidasa, 10 esfingomielinasa, quitinasa, quitin desacetilasa, carbohidrato desacetilasa, N-acetilglucosaminidasa, fosfatidilserina descarboxilasa, sulfatasa, β -galactosidasa, arabinanasa, hialuronidasa, α -arabinofuranosidasa, condroitinasa, glucocerebrosidasa, metil esterasa, esterasa de ácido ferúlico, furuloil esterasa, acetil esterasa, carbohidrato desacetilasa, fosforilcolina hidrolasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, 15 fosforilcolina esterasa y fosforilcolina fosfatasa, siempre que, si la composición contiene 1,4- β -mananasa y 1,3- β -glucanasa, contiene por lo menos 300.000 UI de 1,3- β -glucanasa/kg.

15. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende por lo menos uno de 1,4- β -mananasa y 1,3- β -glucanasa.

20 16. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la composición se selecciona del grupo que consiste en (i) una composición que comprende 1,4- β -mananasa y quitanasa; (ii) una composición que comprende 1,4- β -mananasa y xiloglucanasa; (iii) una composición que comprende 1,4- β -mananasa y arabinanasa; (iv) una composición que comprende 1,3- β -glucanasa y quitanasa; (v) 25 una composición que comprende 1,3- β -glucanasa y xiloglucanasa; (vi) una composición que comprende 1,3- β -glucanasa y arabinanasa y (vii) una composición que comprende 1,4- β -mananasa, 1,3- β -glucanasa y arabinanasa.

17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende 1,4- β -mananasa y 1,3- β -glucanasa.

30 18. Una composición de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende por lo menos 30 UI de 1,3- β -glucanasa/kg de alimento.

19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende 1,4- β -mananasa y 1,3- β -glucanasa.

20. Una composición de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende por lo 35 menos 230.000 UI de 1,3- β -glucanasa/L.

21. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende 1,4- β -mananasa y 1,3- β -glucanasa.

22. Una composición de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende por lo menos por lo menos 450.000 UI de 1,3- β -glucanasa/kg.

23. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, que comprende además, una o más enzimas reductoras del estrés inmunológico
5 adicionales.

24. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, para usar en la reducción del estrés inmunológico en un animal.

25. La composición para uso de la reivindicación 24, en donde a dicho animal se le administra un componente que induce una respuesta inmunológica en el animal y en
10 donde dicha composición comprende por lo menos una enzima reductora del estrés inmunológico que degrada dicho componente.

26. La composición para uso de la reivindicación 25, en donde dicho componente y dicha enzima se administran en la misma composición.

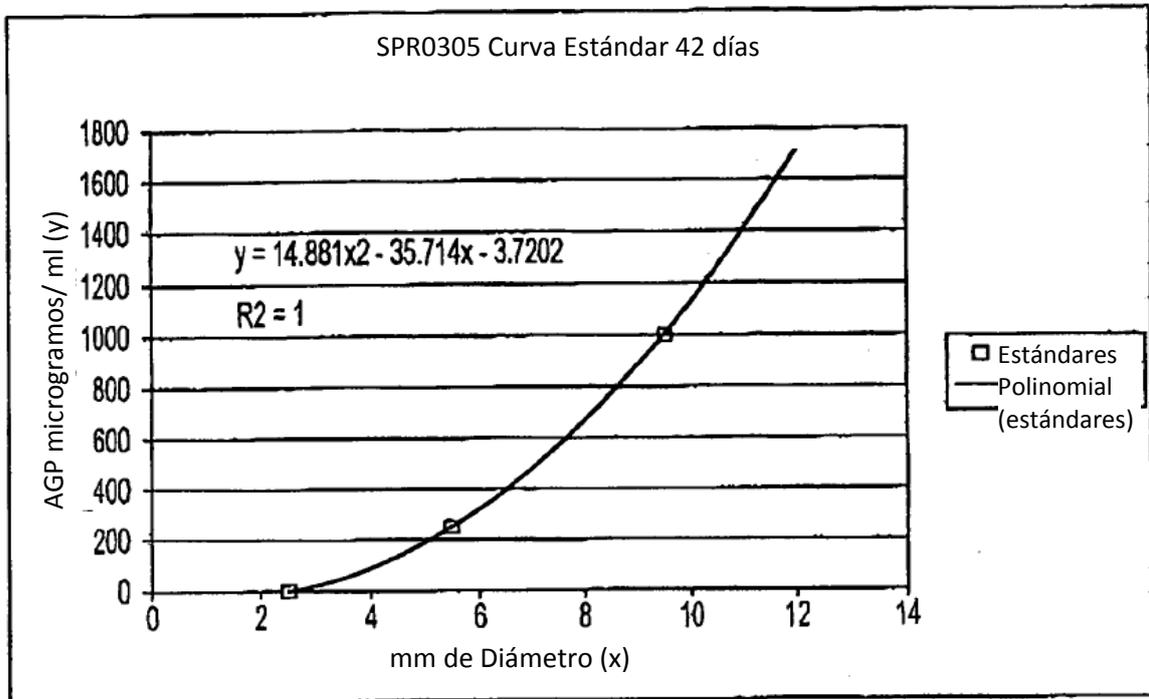


FIG. 1

SPR 0805 alfa-1-Glicoproteína ácida (AGP) en sangre
Dos formulaciones de mananasa contra Antibiótico BMD

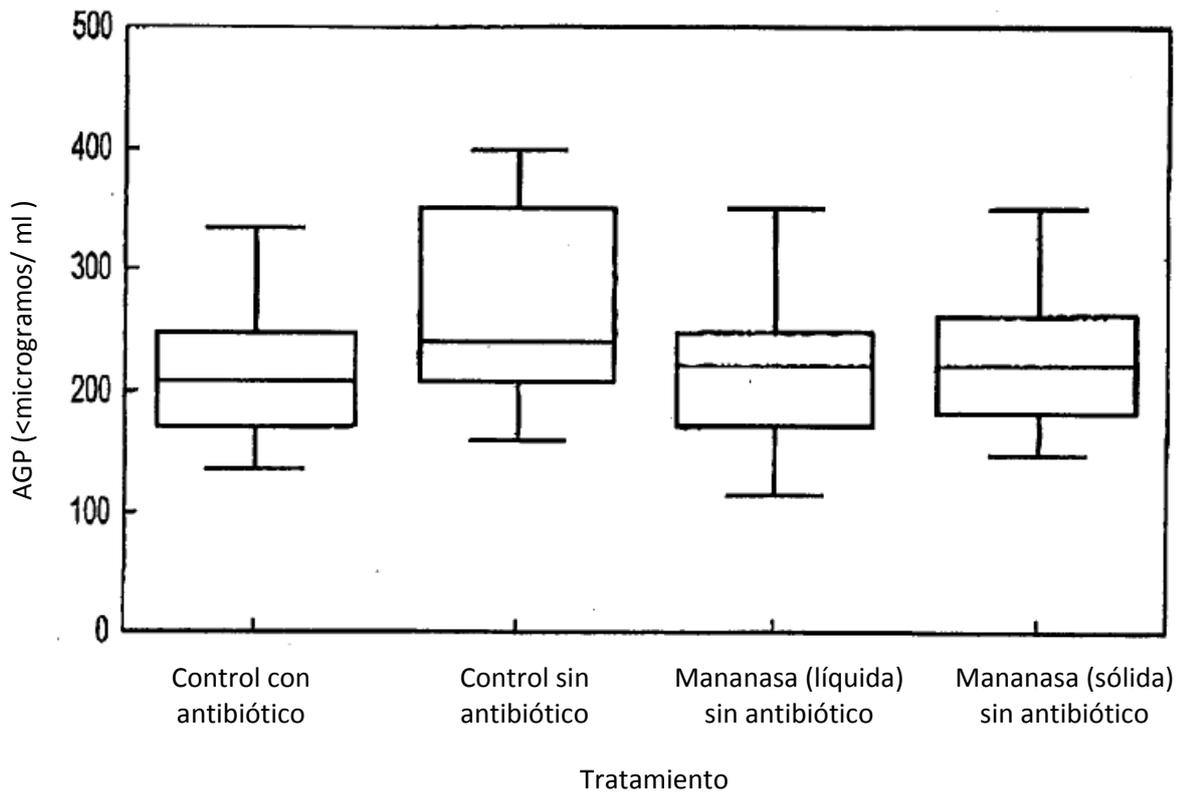


FIG. 2

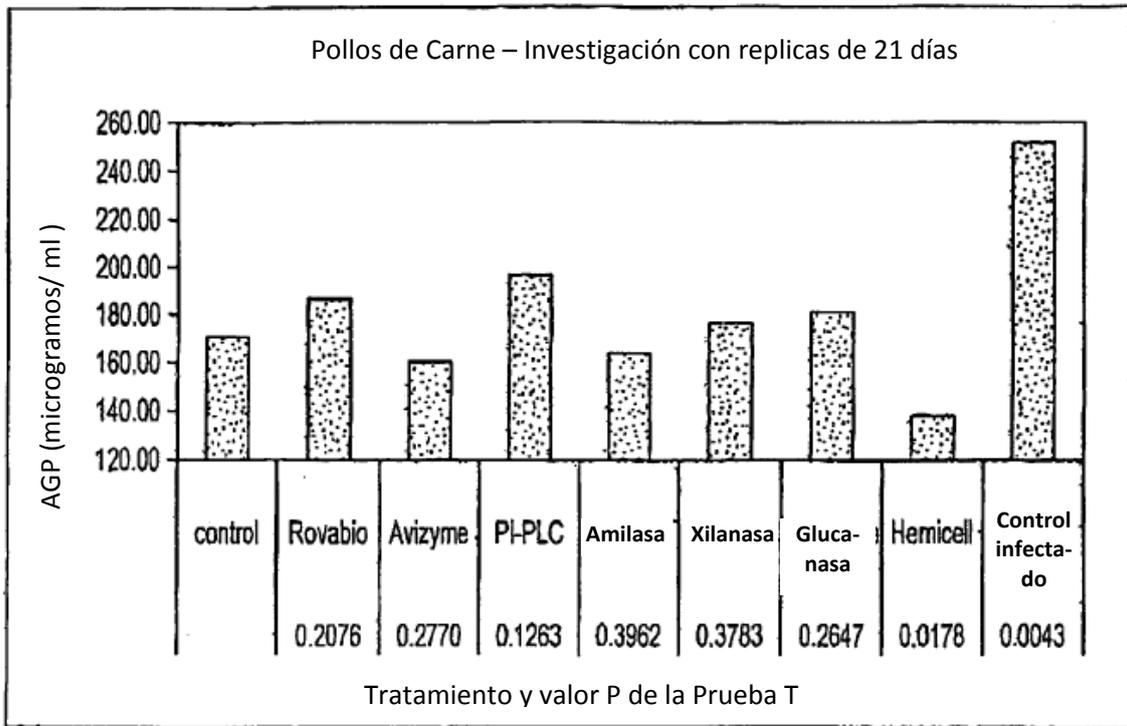


FIG. 3

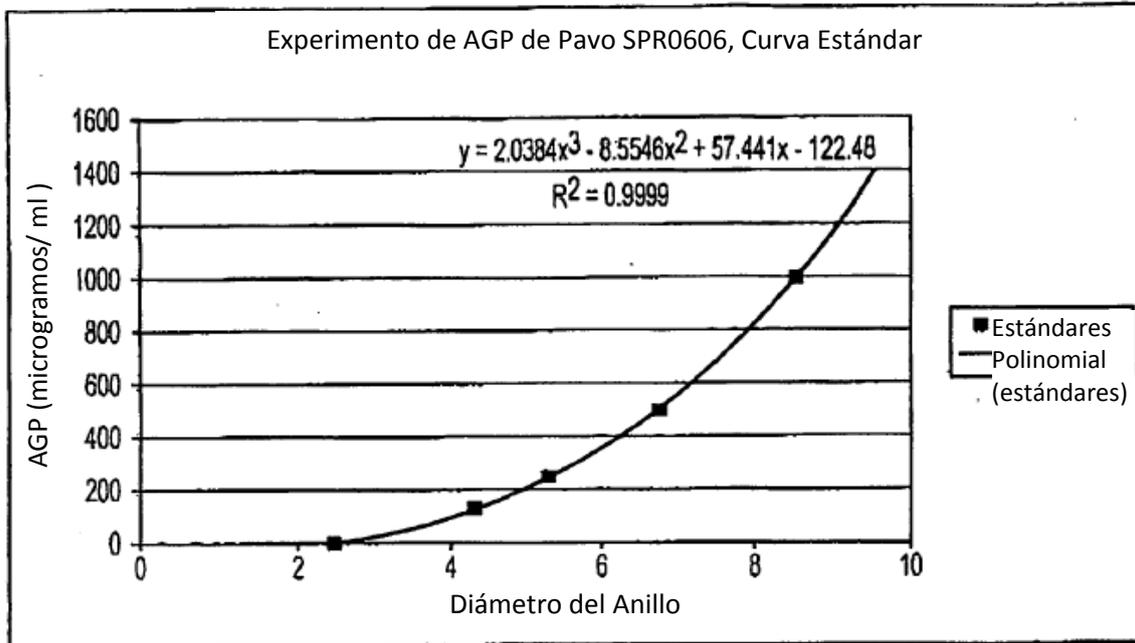


FIG. 4