(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 393 134**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)
C07K 14/32 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07856795 .5**
(96) Fecha de presentación: **17.12.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2094722**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

(54) Título: **Uso de polipéptidos contra enfermedades causadas por protozoos**

(30) Prioridad:

22.12.2006 EP 06026710
05.02.2007 EP 07002444

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

18.12.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

18.12.2012

(73) Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)
KROGSHÖJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK

(72) Inventor/es:

WEBER, GILBERT y
BROZ, JIRI

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 393 134 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

Uso de polipéptidos contra enfermedades causadas por protozoos

[0001] La presente invención se refiere al uso de un polipéptido aislado relacionado a un polipéptido de *Bacillus licheniformis* (aminoácidos 1-85 de la SEC ID nº 2) comprendiendo un amino y una secuencia que tiene un grado de identidad a los aminoácidos 1-85 de la SEC ID nº 12 de al menos 90% para el tratamiento y la profilaxis para uso como un coccidiosis occidiostat en aplicaciones farmacéuticas, incluyendo aplicaciones veterinarias. Un ejemplo de un polipéptido de la invención es la denominad proteína L12 de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos +1 a +85 de la SEC ID nº 2 aquí (en la que sigue los aminoácidos 1-85 de la SEC ID nº 2).

[0002] *Coccidia* es un nombre genérico que se da a organismos protozoarios celulares que son parásitos intestinales que infectan a ambos vertebrados e invertebrados. Los organismos causan coccidiosis y normalmente se instalan en el intestino delgado, tal como el colon. Infecciones EN animales, por ejemplo, animales de granja, con coccidia puede no solo seriamente reducir crecimiento, sino que esto puede ser un peligro para la vida. Síntomas de infección coccidial incluyen pérdida de células epiteliales, la denudación de mucosa intestinal y diarrea (frecuentemente con una pérdida concomitante de sangre). Para algunos animales de granja, tales como aves de granja, infección coccidial puede ser fatal, si no gravemente perjudicial para la salud del animal.

[0003] Las aves de corral son vulnerables particularmente a coccidiosis debido a diferentes razones: (1) el ciclo parasitario de 6 a 8 días les llega en una fase crítica entre las semanas 2 y 4, cuando crecimiento máximo se expresa normalmente. Ya que los parásitos prácticamente destruyen el epitelio intestinal entero, la absorción de nutrientes se reduce espectacularmente, lo que produce depresión de crecimiento marcada. Hasta matanza en 5 o 6 semanas, no hay suficiente tiempo para recuperación. (2) Hay 7 especies de *Eimeria* que pueden infectar a las aves de corral, más que en cualquier otra categoría animal, y al menos 4 de estas se ven regularmente en operaciones comerciales. Así, cuando un ciclo infeccioso concluye ya otro puede estar en una fase temprana de modo que coccidiosis se vuelva crónica. (3) En las aves de corral de las especies más patógenas (*Eimeria tenella, E. necatrix*) se observan, lo que induce hemorragias graves y en casos determinados pueden causar una mortalidad de hasta 50%. Tal caso agudo de coccidiosis podría fácilmente arruinar a un avicultor. (4) La agricultura intensiva de aves de corral (100.000 polluelos o más en una cama) en cama profunda facilita acceso de las aves a las fases infecciosas de coccidia en las heces vía coprofagia y así ayuda a una extensión rápida de la enfermedad a través de una bandada entera de aves. Si las condiciones sanitarias no son rigurosas, la enfermedad también se transferirá a otras camas de aves en la misma granja y se mantendrá en el mismo sitio durante años.

[0004] Coccidia interactúa con otros organismos del intestino, tales como Histomonas y dependen de estos para virulencia completa.

[0005] El término animal incluye todos los animales. Ejemplos de animales son rumiantes y no rumiantes. Animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como oveja, cabra y ganado bovino, por ejemplo, vaca tal como ganado bovino para carne y vacas de lechería. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Animales no rumiantes incluyen animales domésticos, por ejemplo, perros o gatos y animales monogástricos, por ejemplo, cerdo o puerco (incluyendo, pero no limitado a, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral tales como pavos, patos y pollos (incluyendo, pero no limitado a, pollos de engorde, gallinas ponedoras); pescado (incluyendo, pero no limitado a, salmón, trucha, tilapia, bagre y carpa); y crustáceos (incluyendo, pero no limitado a, gamba y cigala).

[0006] La presente invención se basa en el hallazgo de que polipéptidos que se definen posteriormente tienen actividad contra la coccidiosis y por lo tanto se pueden usar, por ejemplo, como coccidiostático y/o histomonastat en aplicaciones farmacéuticas. Aunque dichos polipéptidos ya han sido sugeridos como aditivos para pienso para animales (WO-A-2006/099871), no se había comprendido, hasta ahora, que estos compuestos podrían haber sido activos contra la coccidia. De hecho, en WO-A-2006/099871, los polipéptidos se añadieron en cambio a pienso para animales para mejorar utilización del pienso para animales mejorando la relación de conversión de pienso (FCR), y/o modulando la microflora instestinal y no se hizo ninguna mención de cualquier actividad contra la coccidiosis o histomonaisis.

[0007] Por lo tanto, en un primer aspecto, esta invención se refiere al uso de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
(a) un polipéptido comprendiendo una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad a los aminoácidos 1-85 de la SEC ID NO:2 de al menos 90%;
(b) un polipéptido que se codifica por una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones de astringencia bajas con (i) los nucleótidos 124-378 de la SEC ID nº 1, (ii) una subsecuencia de (i) de al menos 100 nucleótidos, o (iii) una cadena complementaria de (i), o (ii);

[0008] Usando un polipéptido tal como se ha definido anteriormente como un coccidiostático, uno puede emplear un compuesto de origen natural que es más posible que sea aceptable para el humano o animal que se trata para coccidiosis. También, grupos de industria y de consumidores están frecuentemente a favor de compuestos de origen

natural en vez de sintéticos. Los polipéptidos son orgánicos y pueden, por lo tanto, ser más baratos para proporcionar que compuestos sintéticos inorgánicos.

[0009] La presente invención además implica administrar los polipéptidos según la invención a ese humano o animal.

[0010] Los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados (i) en terapia, es decir, para tratamiento de coccidiosis y/o (ii) para profilaxis, es decir, tratamiento para prevenir la aparición de coccidiosis (profilaxis "primaria"). En un ejemplo de la presente divulgación la recurrencia de síntomas en una infección existente que se ha llevado bajo control (profilaxis "secundaria", terapia de mantenimiento) se provee.

[0011] Los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados (a) en medicina veterinaria, que es la aplicación de principios médicos, diagnóstico y terapéuticos para animales de compañía, domésticos, exóticos, salvajes y de producción; y/o (b) en medicina humana.

[0012] La invención además se refiere a farmacéutica incluyendo composiciones veterinarias comprendiendo el polipéptido de la invención para uso como coccidiostático. En una forma de realización particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo un polipéptido de la invención y un portador adecuado.

[0013] Secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican los polipéptidos tal y como se define anteriormente, construcciones de ácidos nucleicos, vectores y células huésped comprendiendo las secuencias de ácidos nucleicos para expresión y producción de polipéptidos aislados como anteriormente se define al igual que composiciones de polipéptido para un uso y preparación según esta invención se describen en WO-A-2006/099871.

[0014] En formas de realización particulares el polipéptido tiene, consiste esencialmente de, o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad a los aminoácidos 1-85 de la SEC ID nº 2 de al menos 90%, tal como, por ejemplo, el polipéptido de los aminoácidos 1-85 de SEC ID nº 2. Otros ejemplos específicos son los polipéptidos de los aminoácidos 1-85 de cualquiera de las SEC ID nº 8, 9 y 10 (identificadas como tipo L12 basándose en la prueba de PCR del ejemplo 1 de este documento).

[0015] Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano o fúngico.

[0016] Según la invención los polipéptidos son polipéptidos aislados puros.

[0017] Tal y como se define aquí, un polipéptido "aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de otros polipéptidos, por ejemplo, al menos 80% puro, preferiblemente al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, o al menos 90% puro, más preferiblemente al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, o al menos 96% puro, como determinado por SDS-PAGE (p. ej., por coloración de Coomassie y escaneado posterior por métodos conocidos en la técnica). Pureza puede determinarse también por HPLC, preferiblemente RP-HPLC (p. ej., usando una columna Waters µ-Bondapak C18, fase Mobil A: 0,1% TFA, fase Mobil B: acetonitrilo + 0,1% TFA, detección a 280nm). La pureza de SDS-PAGE, al igual que la pureza de HPLC, se refiere a la cantidad del polipéptido de la invención, en relación a la cantidad de proteína.

[0018] La cantidad de proteína se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, *Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC*), y la cantidad del polipéptido de la invención se puede determinar por SDS-PAGE y escaneado posterior, también por métodos conocidos en la técnica.

[0019] En un ejemplo de la presente divulgación, comprendiendo la invención, los polipéptidos codificados por secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención también incluyen polipéptidos fundidos o polipéptidos divisibles de fusión en los que otro polipéptido se funde al N-terminal o el C-terminal del polipéptido o fragmento de este. Un polipéptido fusionado se produce por fundición de una secuencia de ácidos nucleicos (o una parte de esta) que codifica otro polipéptido a una secuencia de ácidos nucleicos (o una parte de esta) de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que estas están en marco y expresión del polipéptido fusionado está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

[0020] En un ejemplo, el polipéptido es una variante hipoalergénica, diseñado para invocar una respuesta inmunológica reducida cuando se expone a animales, incluyendo hombres. El término respuesta inmunológica debe entenderse como cualquier reacción por el sistema inmunológico de un animal expuesto al polipéptido. Un tipo de respuesta inmunológica es una respuesta alérgica llevando a niveles aumentados de IgE en el animal expuesto. Variantes hipoalergénicas pueden prepararse usando técnicas conocidas en técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede conjugar con partes de protección de fracciones polímericas o epítopos del polipéptido implicado en una respuesta inmunológica. Conjugación con polímeros puede implicar acoplamiento químico in vitro de polímero al polipéptido, por ejemplo, como se describe en WO 96/17929, WO98/30682, WO98/35026, y/o WO99/00489. Conjugación puede además o alternativamente a esto implicar acoplamiento *in vivo* de polímeros al polipéptido. Tal conjugación se puede conseguir por ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Otra vía de provisión de variantes hipoalergénicas es ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido para provocar que los polipéptidos se auto-

oligomericen, haciendo que monómeros de polipéptido puedan proteger los epítopos de otros monómeros de polipéptido y así reducir la antigenicidad de los oligómeros. Tales productos y su preparación se describe, por ejemplo, en WO 96/16177. Epítopos implicados en una respuesta inmunológica se pueden identificar por varios métodos tales como el método de exposición en fago descrito en WO 00/26230 y WO 01/83559, o el método aleatorio descrito en EP 561907. Una vez un epítopo ha sido identificado, su secuencia de aminoácidos se puede alterar para producir propiedades inmunológicas alteradas del polipéptido por técnicas de manipulación de genes conocidas tales como mutagénesis dirigida al sitio (ver, por ejemplo, WO 00/26230, WO 00/26354 y/o WO 00/22103) y/o conjugación de un polímero puede realizarse en proximidad suficiente al epítopo para que el polímero proteja al epítopo.

[0021] Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar según métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. El polipéptido para ser incluido en la composición se puede estabilizar según métodos conocidos en la técnica.

[0022] La dosificación de la composición del polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa pueden determinarse basándose en métodos conocidos en la técnica.

[0023] Generalmente, la composición de la invención comprende una cantidad eficaz del polipéptido antimicrobiano de la invención. El término "cantidad eficaz" cuando se usa aquí se destina para significar una cantidad de los polipéptidos de la invención, que es suficiente para inhibir crecimiento del microorganismo en cuestión.

[0024] Formulaciones de los polipéptidos de la invención se pueden administrar a un huésped que padece o tiene predisposición a una infección de coccidiosis. Generalmente, la dosis de los polipéptidos de la invención será suficiente para reducir la población microbiana por al menos aproximadamente 50%. Los polipéptidos (o compuestos) de la presente invención se pueden administrar en una dosificación que reduce la población microbiana mientras que minimiza cualquier efecto secundario. Se contempla que la composición se obtendrá y se usará bajo la guía de un médico o veterinario para uso *in vivo*.

[0025] Varios métodos para administración pueden emplearse. La fórmula farmacéutica puede ser dada oralmente, o se puede inyectar por vía intravascular, subcutánea, peritoneal, por aerosol, oftálmicamente, intra-vejiga, tópicamente, etc. La dosificación de la formulación terapéutica variará mucho, dependiendo de la frecuencia de administración, el estilo de administración y similares. La dosis inicial puede ser mayor, seguida de dosis de mantenimiento más pequeñas. La dosis se puede administrar tan infrecuentemente como semanal o bisemanalmente, o fraccionada en dosis más pequeñas y administrada una o varias veces, diario, semi-semanal, etc. para mantener un nivel de dosificación eficaz. En muchos casos, administración oral requerirá una dosis más alta que se administra por vía intravenosa. Los enlaces amida, al igual que los amino y carboxi terminales, se pueden modificar para estabilidad superior en administración oral. Por ejemplo, se puede amidar el terminal carboxi.

[0026] Los compuestos de esta invención se pueden incorporar en una variedad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los compuestos de la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas por combinación con portadores apropiados farmacéuticamente aceptables o diluyentes, y se pueden formular en preparaciones en formas sólida, semi-sólida, líquida o gaseosa, tal como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, cremas, espumas, soluciones, supositorios e inyecciones. Como tal, administración de los compuestos se puede conseguir de varias maneras, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmico, transdérmico, intratecal, etc.. Los polipéptidos de la invención se pueden localizar por el uso de un implante u otra formulación que actúa para retener la dosis activa en el sitio de implantación.

[0027] Para preparaciones orales, los compuestos pueden utilizarse solos o en combinación con aditivos apropiados para hacer comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con ligantes, tales como celulosa cristalina, derivados químicos de la celulosa, acacia, almidón de maíz o gelatinas; con desintegradores, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y, si se desea, con, agentesdiluyentes amortiguadores, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

[0028] Los compuestos se pueden formular en preparaciones para inyecciones por disolución, suspensión o emulsión de estos en un solvente no acuoso o acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácido alifático sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenoglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

[0029] Además, los compuestos pueden hacerse en supositorios mediante la mezcla con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía rectal por medio de un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboceras y glicoles de politileno, que se funden a temperatura corporal, sin embargo, son sólidos a temperatura ambiente.

[0030] Formas de dosificación unitarias para administración rectal u oral tales como jarabes, elixires y suspensiones pueden proporcionarse donde cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, pastilla o supositorio,

contiene una cantidad predeterminada de la composición con uno o más compuestos de la presente invención. De forma similar, formas de dosificación unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el compuesto de la presente invención en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro portador farmacéuticamente aceptable.

[0031] Implantes para formulaciones de liberación sostenidas son bien conocidos en la técnica. Implantes se formulan como microesferas, tiras, etc. con polímeros no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que es bien tolerado por el huésped.
El implante con los polipéptidos antimicrobianos de la invención se coloca próximo al sitio de infección, de modo que la concentración local del agente activo aumenta en relación al resto del cuerpo.

[0032] El término "forma de dosificación unitaria", como se utiliza en este caso, se refiere a unidades físicamente específicas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, cada unidad con una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en la asociación con un diluyente farmacéuticamente aceptable, portador o vehículo. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la presente invención dependen del compuesto empleado particular y el efecto para ser conseguido, y la farmacodinámica asociada al compuesto en el huésped.

[0033] Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están disponibles fácilmente al público. Por otra parte, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como pH ajustado y agentes amortiguadores, agentes de tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, están disponibles fácilmente al público.

[0034] En otro ejemplo de la presente divulgación. La composición puede comprender además otro agente farmacéuticamente activo, tal como un agente biocida adicional, tal como otro polipéptido antimicrobiano que muestra actividad antimicrobiana tal como se ha definido anteriormente o tal como otro coccidiostáticos.

[0035] El agente biocida puede ser un antibiótico, como se conoce en la técnica. Clases de antibióticos incluyen penicilinas, por ejemplo, penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, etc.; penicilinas en combinación con inhibidores de beta-lactamasa, cefalosporinas, por ejemplo, cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactamo, etc.; carbapenemos; monobactamos; aminoglicósidos; tetraciclina; macrólidos; lincomicinas; polimixinas; sulfonamidas; quinolonas; cloranfenical; metronidazol; espectinomicina; trimetoprima; vancomicina; etc. el agente biocida puede también ser un agente anti-micótico, incluyendo polienos, por ejemplo, anfotericina B, nistatina; 5-flucosyn; y azoles, por ejemplo, miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol.

[0036] Agentes antimicóticos pueden ser también útiles, incluyendo polienos, por ejemplo, anfotericina B, nistatina; 5-flucosyn; y azoles, por ejemplo, miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Fármacos antituberculóticos incluyen isoniazida, etambutolo, estreptomicina y rifampicina. Citocinas también pueden incluirse en una formulación de los polipéptidos antimicrobianos de la invención, por ejemplo, interferón gama, factor de necrosis tumoral alfa; interleuquina 12, etc. Ejemplos de otros coccidiostáticos que pueden usarse también son ionóforos tales como lasalocid, monensina, salinomicina, maduramicina, semduramycin y agentes químicos como amprolium, nicarbazin, diclazuril.

[0037] Como se describe en WO-A-2003/009700, se ha descubierto que ácidos grasos poliinsaturados tienen actividad coccidiostática también. Por lo tanto, en una forma de realización preferida particular de la invención además ingredientes activos de la composición farmacéutica son ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

[0038] El PUFA puede bien ser un único PUFA o dos o más diferentes PUFA. Cada PUFA puede ser de la familia n-3 o n-6. Preferiblemente es un PUFA C 18, C20 o C22. Puede tener al menos 18 átomos de carbono y 3 enlaces dobles. El PUFA se puede proporcionar en forma de un ácido graso libre, una sal, como un éster de ácido graso (por ejemplo, metil o etil éster), como fosfolípidos y/o en forma de un mono-, di-o triglicérido. PUFA (n-3 y n-6) adecuados incluyen:
- ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6Q3), adecuadamente de algas o hongos, tales como el *Crypthecodinium* (dinoflagelado) o el *Thraustochytrium* (hongo);
- ácido γ-linolénico (GLA, 18: Ω6);
- ácido a-linolénico (ALA, 18: Ω3);
- ácido linoleico conjugado (ácido octadecadienoico, CLA);
- ácido dihomo-y-linolénico (DGLA, 20: Ω6);
- ácido araquidónico (ARA, 20: Ω6); y
- ácido eicosapentaenoico (AEP, 20: 5 Ω3).

[0039] PUFA preferidos incluyen ácido araquidónico (ARA), ácido docosahexaenoica (DHA), ácido eicosapentanoico (EPA) y/o ácido y-linoleico (GLA). En particular, ARA se prefiere.

[0040] El PUFA puede ser de una fuente natural (por ejemplo, vegetal o marina) o puede derivar de una única célula o fuente microbiana. En particular, el PUFA se puede producir por una bacteria, alga, hongo o levadura. Hongos se prefieren, preferiblemente del orden *Mucorales*, por ejemplo, *Mortierella, Phycomyces, Blakeslea, Aspergillus, Thraustochytrium, Pythium* o *Entomophthora*. La fuente preferida de ARA es de *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora*,

Aspergillus terreus o *Pythium insidiosum*. Algas pueden ser dinoflageladas y/o incluir *Porphyridium*, *Nitszchia*, o *Crypthecodinium* (por ejemplo, *Crypthecodinium cohnii*).

[0041] Levaduras incluyen aquellas del género *Pichia* o *Saccharomyces*, tal como *Pichia ciferii*. Bacterias pueden ser del género *Propionibacterium*.

[0042] El PUFA puede estar presente o añadirse a la composición como un aceite (por ejemplo, comestible). El aceite puede ser un líquido (a temperatura ambiente). El aceite puede ser un aceite microbiano (por ejemplo, célula única), marino (por ejemplo, atún) o un aceite vegetal. Un aceite adecuado que incluye ARA está disponible de DSM N. V., Alexander Flerninglaan 1 o Wateringseweg 1, P. O. Box 1,2600 MA Delft, Países Bajos, bajo la marca registrada VEVODAR. Otro aceite comercialmente disponible (ARA) es ARASCO de Martek Corporation, 6480 Dobbin Road, Columbia, MD 21045, Estados Unidos de América. Otros PUFA están disponibles, por ejemplo, DHA como un aceite DHA (DHASCO de Martek Corporation o DHA de Pronova, Noruega, bajo marca registrada PAX).

[0043] Varios documentos describen la producción de aceites crudos PUFA. Aceites microbianos con ARA se describen en WO-A-92/13086 (Martek), EPA en WO-A-91/14427 (Martek) y DHA en WO-A-91/11918 (Martek). Varios métodos para extraer aceites PUFA de fuentes microbianas se pueden encontrar en WO-A-97/36996 y WO-A-97/37032 (ambos Gist-brocades). Preparación de aceites ARA, DHA y con EPA también se describen en WO-A-92/12711 (Martek).

[0044] Se prefiere que la mayor parte del PUFA esté en forma de triglicéridos. Así, preferiblemente al menos 50%, tal como al menos 60%, u óptimamente al menos 70%, del PUFA está en la forma de triglicérido. No obstante, la cantidad de triglicéridos puede ser mayor, tal como al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, óptimamente al menos 95% o 98% del aceite.

[0045] La presente invención por lo tanto incluye:
El uso de un polipéptido aislado para un polipéptido de *Bacillus licheniformis* (p. ej. ATCC 14580) comprendiendo (aminoácidos 1-85 de la SEC ID nº 2).

Ejemplo 1: Cepas de *Bacillus* con genes L12-tipo, como identificados por PCR

[0046] Genes similares al gen que codifica la proteína L12 (SEC ID nº 1) se identificaron en un número de otras cepas de *Bacillus licheniformis* por PCR. ADN para uso como un molde para la reacción PCR se aisló de ocho cepas de *Bacillus licheniformis* diferentes crecidas durante toda la noche a 37°C en placas de agar TY (para receta, véase ejemplo 1 de WO-A-2006/099871). Un tubo de inoculación con células de cada cepa se suspendió en 0,1 ml de H_2O y se hirvió durante 10 min, se centrifugó, y 5 microlitros de sobrenadante de cada uno se usó como molde de ADN en reacciones PCR como se describe abajo.

[0047] Las reacciones PCR se ejecutaron en "Pure TaqTM Ready-To_GoTM PCR Beads" de Amersham Biosciences: 5 microlitros de molde de ADN + 2 x 1 microlitro de cebador Pep481 (SEC ID nº 6) y Pep482 (SEC ID nº 7) + 18 microlitros de H2O. Programa PCR: 1) 95°C 3min; 2) 95°C 10seg; 3) 65°C 30seg -1°C pr. ciclo; 4) 72°C 1 min; 5) Go To 2) 9 veces; 6) 95°C 10seg; 7) 55°C 30seg; 8) 72°C 1min; 9) Go To 6) 19 veces; 10) 72°C 5min; 11) 4°C para siempre, que significa que paso siguiente 10) la temperatura se baja a 4°C.

Cebadores:

[0048]
Pep481 AATTACGCGTGTTGGTGCGATAGTAGTAACG-3' (SEC ID nº 6)
Pep482 TTAAGAATTCGAATGAAAGAGGAGGAATG-3' (SEC ID nº 7)

[0049] El fragmento de PCR 0,4kb resultante de cinco cepas positivas (positivo significado dado a banda de ADN del tamaño adecuado) se purificaron y se usaron en un experimento de secuenciación del ADN, usando una vez más como cebadores de secuencia los cebadores Pep481 (SEC ID nº 6) y Pep482 (SEC ID nº 7).

[0050] Tres de las cinco cepas positivas dieron la misma secuencia de ADN: *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus licheniformis* NCIMB 6346 (=DSM 8785) y cepa de *Bacillus licheniformis* 712, dando como resultado la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2. En la cepa de *Bacillus licheniformis* 470, cambios de ADN dieron como resultado dos cambios de aminoácidos (SEC ID nº 9), no obstante, ninguno en el péptido maduro. En la cepa de *Bacillus licheniformis* 009, cambios de ADN dieron como resultado quince cambios de aminoácidos (SEC ID nº 8), ocho de los cuales fueron en el péptido maduro. Además, una secuencia de consenso (SEC ID nº 10) se derivó de las SEC ID nº 2, 8 y 9.

[0051] Téngase en cuenta que, en este experimento, los nucleótidos que codifican los siete aminoácidos terminales de la SEC ID nº 2 se incluyen en el cebador Pep481 (SEC ID nº 6), y los siete residuos de aminoácidos C-terminales de las SEC ID nº 8-9 pueden por lo tanto no ser correctos. No obstante, la corrección de las SEC ID nº 8-9 se confirmó más tarde.

[0052] Además, 44 otras cepas de *Bacillus licheniformis* se evaluaron como se ha descrito anteriormente. Una respuesta positiva de PCR se encontró en 27 de estas cepas. Ejemplos de cepas adicionales públicamente disponibles de *Bacillus licheniformis* que se encontró que eran L12-positivas tienen los siguientes números de depósito: NCTC 1024, NCTC 1025, NCTC 2120, NCTC 7589, NCTC 9932, ATCC 21424, NCIMB 10689, ATCC 53757. NCTC es la National Collection of Type Cultures. ATCC es la American Type Culture Collection. NCIMB es la National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria.

Listado de secuencias

[0053]

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Uso de polipéptidos contra la enfermedades provocadas por protozoos

<130> 25880WO

<140> PC//EP2007/011058
<141> 2007-12-17

<160> 10

<170> Versión de patentIn 3.3

<210> 1
<211> 381
<212> ADN
<213> Bacillus licheniformis ATCC 14580

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(378)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (124)..(378)

<400> 1

```
atg aaa aat cat ttg tat gag aaa aaa aag agg aaa cct ttg act cgg      48
Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
    -40                 -35                 -30

aca att aaa gcg acg ctc gcc gtg ttg aca atg tcc atc gct ttg gtg      96
Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
-25                 -20                 -15                 -10

gga ggc gct acg gtg cct tca ttt gca tgg gtg aat ccg ggt tat cac     144
Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
                -5              -1  1               5

tac cag tac cca tcg gaa ggt ggt aca tgg agg tat gga ttc gta aac     192
Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
        10                  15                  20

gcc ggg ctc cgt tca gag tac aac cac ccg aca aag gtc cac ggc tcg     240
Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
    25                  30                  35

aca gtg caa aag ctc atc gat gga aaa gtg gat aaa acg aat aga agt     288
Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
40                  45                  50                  55

att gat acg gct gcg ggc cgc tac tct aat gcc tat gtc gga gcc ata     336
Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
                60                  65                  70

aac tca cct ggt ctt aag ggt cgt tac tac tat cgc acc aac taa         381
```

<210> 2
<211> 126
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis ATCC 14580

<400> 2

Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
-40 -35 -30

Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
-25 -20 -15 -10

Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
-5 -1 1 5

Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
10 15 20

Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
25 30 35

Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
40 45 50 55

Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
60 65 70

Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
75 80 85

<210> 3
<211> 1581
<212> ADN
<213> Bacillus licheniformis

<220>
<221> CDS
<222> (601)..(978)

<400> 3

gaattttccg gaagctgaaa cacccgtgat atatataacc ataaattaaa cagcataggc 60

ggattgtgcg agttcctcca cattcggagt atttctgaat gatagagcca cacggtccac 120

gttctcactg gctaaccgga tcaaatgatc ttcaggagtc agcataatac atccagttca 180

ggtagataag atttgaattt ggtgacttgc ttttgttctt cttctttcat tttctgacta 240

atccaaactg gaaaaagcag gtcttttaac agattaggag gtttctgaca tgcaccattc 300

ggtcactaac cgaatgcagt aaaggacact gtggtgcttg ccagccatta gggtattgag 360

gaggtgatca aaatgctagg tgacagtatt tcgtcgaagt ggacaagtcg tgaccaaatg 420

acctcggatc gagggttggt catggaggaa aaaattgatg tctggtgaca aagaggagtc 480

atgatcatgg caccgccaac gagggaaaaa actcttcccg catcgacacg gtatgtgggc 540

ggtgacaaac taacttatag agtaaattta ttagtcgaat gaaagaggag gaatgaaata 600

atg aaa aat cat ttg tat gag aaa aaa aag agg aaa cct ttg act cgg 648
Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
1 5 10 15

aca att aaa gcg acg ctc gcc gtg ttg aca atg tcc atc gct ttg gtg 696
Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
20 25 30

gga ggc gct acg gtg cct tca ttt gca tgg gtg aat ccg ggt tat cac 744
Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
35 40 45

tac cag tac cca tcg gaa ggt ggt aca tgg agg tat gga ttc gta aac 792
Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
50 55 60

gcc ggg ctc cgt tca gag tac aac cac ccg aca aag gtc cac ggc tcg 840
Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
65 70 75 80

aca gtg caa aag ctc atc gat gga aaa gtg gat aaa acg aat aga agt 888
Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
85 90 95

att gat acg gct gcg ggc cgc tac tct aat gcc tat gtc gga gcc ata 936
Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
100 105 110

aac tca cct ggt ctt aag ggt cgt tac tac tat cgc acc aac 978
Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
115 120 125

taatcaaagg gaaaacggtt gctgtcaacg gggctagcat ggcaagaccc agaaaagttc 1038

tgggagatcc cgctttgcat aagcgtatta tagtggatga cgcgggcttt gttgtttaca 1098

cttcttgcac ctgctgacgg caatcatccc tatctatgaa atcgagattt cagcaggccg 1158

ttattttcga gagagttaaa tctatattca ttgtttttat tttggtaagg acataccgga 1218

ttttaggttt ggattaccgg tcgagttagc ttgtcttttc gcccactacc gtgtcgatgc 1278

gggagcaatt taccagaagc acttaccgat tgatagtttt ttattccggt gattgcaaag 1338

tttcataaac tctgagaatt caataggggt aataccccgc tttgaggggc gcggcatttt 1398

atgcgccccg agtatttatt cttaaaattt ttaaattaat gtatctatat aaaaaggaga 1458

tgctttcggt gtactgccaa agcatctcca caaaagatag tgcatatctg caggaaaaaa 1518

cataaaatgc aactaacatt tttttggaaa gcaataggtt tatttaattt tgtagtttta 1578

tct 1581

<210> 4
<211> 126
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis

<400> 4

Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
1 5 10 15

Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
20 25 30

Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
35 40 45

Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
50 55 60

Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
65 70 75 80

Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
85 90 95

Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
100 105 110

Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
115 120 125

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis ATCC 14580

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> N-terminal

<400> 5

Trp Val Asn Pro Gly Tyr His Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly
1 5 10 15

<210> 6
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Pep 481

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador

<400> 6
aattacgcgt gttggtgcga tagtagtaac g ???31

<210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Pep 482

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador

<400> 7
ttaagaattc gaatgaaaga ggaggaatg ???29

<210> 8
<211> 125
<212> PRT
<213> Cepa de Bacillus licheniformis 009

<220>
<221> mat_peptide
<222> (41)..(125)

<400> 8

```
Met Lys Asn Leu Leu Asn Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg Thr
-40                 -35                 -30                 -25

Ile Lys Ala Thr Phe Ala Val Leu Thr Val Ser Ile Gly Leu Val Gly
                -20                 -15                 -10
```

Gly Ala Thr Val Pro Ala Phe Ala Trp Val Asn Pro Asp Tyr His Tyr
-5 -1 1 5

Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn Leu
10 15 20

Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Lys Lys Val His Gly Ser Thr
25 30 35 40

Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Glu Lys Thr Asn Arg Ser Leu
45 50 55

Asp Thr Ala Pro Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Val Val Asn
60 65 70

Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
75 80 85

<210> 9
<211> 126
<212> PRT
<213> Cepa de Bacillus licheniformis 470

<220>
<221> mat_peptide
<222> (42)..(126)

<400> 9

Met Lys Asn Tyr Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
-40 -35 -30

Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
-25 -20 -15 -10

Gly Gly Ala Thr Val Pro Ala Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
-5 -1 1 5

Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
10 15 20

Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
25 30 35

Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser

40 45 50 55

Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
60 65 70

Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
75 80 85

<210> 10
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de consenso

<220>
<221> mat_peptide
<222> (42)..(126)

<400> 10

Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
-40 -35 -30

Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
-25 -20 -15 -10

Gly Gly Ala Thr Val Pro Ala Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
-5 -1 1 5

Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
10 15 20

Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
25 30 35

Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
40 45 50 55

Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
60 65 70

Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
75 80 85

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste en:
(a) un polipéptido comprendiendo una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad a los aminoácidos 1-85 de la SEC ID nº 2 de al menos 90%; y
(b) un polipéptido que se codifica por una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones de astringencia bajas con
(i) los nucleótidos 124-378 de SEC ID nº 1,
(ii) una subsecuencia de (i) de al menos 100 nucleótidos, o
(iii) una cadena complementaria de (i), o (ii);
en la producción de una formulación farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de coccidiosis.

2. Uso según la reivindicación 1, donde la fórmula farmacéutica es un medicamento para uso veterinario o humano.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde al menos un ácido graso poliinsaturado (PUFA) de la familia n-3 o n-6 y siendo un PUFA C 18, C20 o C22, que tiene actividad coccidiostática se añade a la formulación.

4. Composición farmacéutica comprendiendo un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste en:
(a) un polipéptido comprendiendo una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad a los aminoácidos 1-85 de la SEC ID nº 2 de al menos 90%; y
(b) un polipéptido que se codifica por una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones de astringencia bajas con
(i) los nucleótidos 124-378 de la SEC ID nº 1
(ii) una subsecuencia de (i) de al menos 100 nucleótidos, o
(iii) una cadena complementaria de (i), o (ii); para uso como un coccidiostático.

5. Composición para uso según la reivindicación 4 donde la composición comprende además al menos un ácido graso poliinsaturado de la familia n-3 o n-6 y siendo un PUFA C18 C20 o C22.