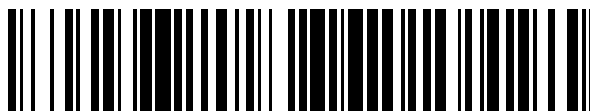


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 909**

51 Int. Cl.:

A23K 50/00 (2006.01)

A23K 10/40 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2014 PCT/SE2014/000123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15057121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2014 E 14853590 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 3057441**

54 Título: **Composición que previene la enteritis necrótica en Galloanserae**

30 Prioridad:

14.10.2013 SE 1300646

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2018

73 Titular/es:

**PERSTORP AB (100.0%)
284 80 Perstorp, SE**

72 Inventor/es:

**VAN IMMERSEEL, FILIP;
SYGALL, RICHARD;
VAN DRIESSCHE, KAROLIEN;
DUCATELLE, RICHARD y
SCHWARZER, CONRAD, GERARD**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 666 909 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

Composición que previene la enteritis necrótica en Galloanserae

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de una composición de éster de glicerol de al menos un ácido graso de cadena corta para prevenir y/o aliviar la enteritis necrótica en Galloanserae. La composición de éster de glicerol comprende al menos el 75 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 25 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 8 % en peso de monobutirato de glicerilo. La presente invención también se refiere al uso de dicha composición para modular la flora intestinal de Galloanserae.

Antecedentes de la invención

15 La enteritis necrótica es una infección aguda que afecta a Galloanserae. Las Galloanserae se dividen en los subgrupos galliformes (aves terrestres) como pollo, pavo, urogallo y faisán, y anseriformes (aves acuáticas) como patos, oca y cisne. La enteritis necrótica se ha convertido en un problema emergente especialmente entre aves de corral y se caracteriza por necrosis grave de la mucosa intestinal. La enfermedad clínica es habitualmente muy corta y a menudo los únicos signos son un aumento repentino de la mortalidad. Sin embargo, también pueden observarse
20 aves con depresión, plumas erizadas y diarrea. Las lesiones macroscópicas se encuentran principalmente en el intestino delgado (yeyuno), que puede estar hinchado, quebradizo y contener un fluido marrón nauseabundo.

El agente causante es la bacteria Gram-positiva, estricta, anaerobia *Clostridium perfringens*. Hay dos tipos principales de *C. perfringens*, A y C, asociados con enteritis necrótica en Galloanserae. Las toxinas producidas por
25 las bacterias causan daño al intestino delgado, pero también lesiones de hígado y mortalidad.

C. perfringens es una bacteria casi ubicua que se encuentra fácilmente en el suelo, polvo, heces, pienso y en lechos usados de aves de corral. También es un habitante normal de los intestinos de Galloanserae sanas. El desarrollo de enteritis necrótica depende de la presencia de factores de predisposición, tales como daño mucoso causado por patógenos coccídicos y pienso que contiene altos niveles de proteína.

Debido a que *C. perfringens* es casi ubicua, es importante prevenir la coccidiosis, así como cambios en la microflora intestinal que fomentarian su crecimiento. Esto se ha logrado anteriormente añadiendo rutinariamente antibióticos al pienso. Sin embargo, desde la prohibición de antibióticos que fomentan el crecimiento en la Unión Europea en 2006,
35 la enteritis necrótica se ha convertido en una enfermedad emergente entre, por ejemplo, las aves de corral. Hay una gran necesidad de métodos alternativos para contrarrestar esta enfermedad o disfunción.

Una alternativa a contrarrestar bacterias dañinas como *C. perfringens* a través de antibióticos es intentar equilibrar o normalizar la flora intestinal. La flora intestinal consiste en un complejo de especies de microorganismos que viven en el tubo digestivo. En este contexto intestinal es sinónimo de "del intestino" y flora de microbiota y microflora. Los microorganismos llevan a cabo un abanico de funciones útiles, tales como fermentar sustratos energéticos sin usar, entrenar al sistema inmunitario, prevenir el crecimiento de bacterias dañinas, patógenas, regular el desarrollo del intestino, producir vitaminas para el huésped y producir hormonas que dirigen al huésped a almacenar grasas. Sin embargo, en ciertas condiciones, se cree que algunas especies son capaces de causar enfermedades o disfunción produciendo infección o incrementando el riesgo de cáncer para el huésped.

La presente invención divulga el uso de una composición de éster de glicerol para prevenir y/o aliviar enteritis necrótica en Galloanserae, como pollo y pavo. El uso de dicha composición para modular la flora intestinal de Galloanserae también se divulga. El uso de la composición según la invención equilibra o normaliza la flora intestinal de Galloanserae de tal manera que se inhibe el crecimiento de especies patógenas y se previenen enfermedades como enteritis necrótica. Se cree actualmente que un mecanismo tras este efecto es que se favorece el crecimiento de bacterias útiles y que esto previene el crecimiento de especies patógenas compitiendo por la nutrición y los sitios de unión al epitelio del colon.

55 Se conocen desde hace tiempo los efectos positivos del ácido butírico sobre la salud intestinal en aves de corral y otros animales. También se han explorado diferentes formas de distribución de ácido butírico, entre ellas distribuir ácido butírico en forma de ésteres de glicerol. En los últimos años, se ha prestado mucho interés al uso de monobutirato de glicerilo como aditivo alimentario para fomentar la salud intestinal del animal.

60 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que el uso de una composición de éster de glicerol, que comprende principalmente tributirato de glicerilo, es un modo más eficaz de prevención de enteritis necrótica en Galloanserae, tales como pollos de engorde, en comparación con proporcionar al animal ácido butírico en forma de monobutirato de glicerilo.

65 El documento de patente 1 describe composiciones antibacterianas y antimoho de monoglicéridos de ácidos orgánicos C1 a C7 y glicerol para su uso en piensos para animales. El documento de patente 2 se refiere a la mejora

de la salud gastrointestinal del ganado usando glicéridos de ácidos grasos de cadena corta, tales como de ácido butírico.

Documentos de la técnica anterior

- 5 Documento de patente 1: Documento US 2012/0029075 A1
- Documento de patente 2: Documento WO 2006/085346 A1

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de una composición de éster de glicerol que comprende un ácido graso de cadena corta, que se ha comprobado que es un modo eficaz de prevención de enteritis necrótica en Galloanserae, tales como pollos de engorde. La composición de éster de glicerol comprende al menos el 75 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 25 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 8 % en peso de monobutirato de glicerilo. Se sabe que el ácido butírico tiene un efecto positivo sobre la salud intestinal en Galloanserae. La presente invención muestra que distribuir el ácido butírico principalmente como tributirato de glicerilo es un modo eficaz de prevención de enteritis necrótica en Galloanserae, tales como pollos de engorde, y se ha comprobado que es más eficaz que distribuir ácido butírico principalmente en forma de monobutirato de glicerilo.

20 Según una realización de la presente invención la composición de éster de glicerol comprende al menos el 80 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 20 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 5 % en peso de monobutirato de glicerilo.

25 Según una realización preferida de la presente invención la composición de éster de glicerol comprende al menos el 85 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 15 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 4 % en peso de monobutirato de glicerilo.

30 Según una realización más preferida de la presente invención la composición de éster de glicerol comprende al menos el 90 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 10 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 2,5 % en peso de monobutirato de glicerilo.

35 El ácido butírico libre tiene un olor muy desagradable, lo que causa problemas de manipulación. Pueden evitarse estos problemas distribuyendo el ácido butírico en forma de ésteres de glicerol. Según una realización de la presente invención, la cantidad de ácido butírico libre en la composición de éster de glicerol está por debajo del 1 %, preferiblemente por debajo del 0,5 % y lo más preferiblemente por debajo del 0,2 % en peso. Mantener baja la cantidad de ácido butírico libre también garantiza que el pH en la composición de éster de glicerol se mantiene a un nivel en el que el éster de glicerol no experimentará hidrolización para dar glicerol y ácido libre, por tanto, el producto se mantiene estable.

40 Según una realización de la presente invención la composición de éster de glicerol se adsorbe sobre un portador inerte, tal como un portador de sílice. Éste permite distribuir la composición como un producto seco. Tal portador de sílice comprende preferiblemente partículas porosas de sílice con un tamaño de partícula promedio de 20-70 µm. Según una realización de la presente invención, la composición de éster de glicerol se adsorbe sobre partículas de sílice con una razón en peso del 50-80 % de éster de glicerol y del 20-50 % de partículas de sílice.

Puede añadirse la composición de éster de glicerol según la presente invención a cualquier pienso comercialmente disponible para Galloanserae. La composición de éster de glicerol puede incorporarse directamente en piensos comercialmente disponibles o alimentarse de manera complementaria a los piensos comercialmente disponibles.

50 Según una realización de la presente invención la cantidad de composición de éster de glicerol alimentada a las Galloanserae es de desde el 0,05 hasta el 1,5 % en peso, preferiblemente desde el 0,1 hasta el 1,0 % en peso de la ración diaria de pienso de las Galloanserae.

55 Según otra realización de la presente invención se administra la cantidad de dicha composición de éster de glicerol a lo largo de intervalos de tiempo de 5-10 días y disminuye a lo largo de un periodo de 1-5 semanas.

Según aún otra realización de la presente invención la disminución de dicha cantidad es del 20-50 % de la cantidad proporcionada durante el intervalo previo.

60 Ejemplo de realización

Ensayo *in vivo* sobre la eficacia de butiratos de glicerilo para controlar la enteritis necrótica inducida por *Clostridium perfringens* en pollos de engorde.

65 Cepas bacterianas y vacunas

Se aisló la cepa de exposición usada en los ensayos *in vivo*, cepa 56 de *C. perfringens*, del intestino de un pollo de engorde con lesiones necróticas de una bandada con problemas de aumento de peso y que se ha mostrado que es muy virulenta en ensayos *in vivo* anteriores. Se clasificó la cepa como una cepa de tipo A (positiva para netB, negativa para beta-2 y enterotoxina) y produce cantidades moderadas de toxina alfa *in vitro* (Gholamiandehkordi *et al.*, 2006).

Para la inoculación, se hizo crecer la cepa durante 24 h en un caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

Se usó una dosis de diez veces de la vacuna anticoccídica Paracox® - 8 (Schering-Plough Animal Health, Bruselas, Bélgica), que contenía ovocitos vivos, atenuados de *Eimeria (E.) acervulina* (dos líneas), *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. mitis* y *E. tenella* en este estudio. Se administró la vacuna Nobilis Gumboro D 78 (Schering-Plough Animal Health, Bruselas, Bélgica) en el agua potable.

Animales y alojamiento

En este experimento, se usaron 114 pollos de engorde de ambos sexos. Se obtuvieron con un 1 día de edad de un criadero comercial. Antes del ensayo, se descontaminaron todas las salas con Metatectyl® (Clim'oMedic) y con un desinfectante comercial anticoccídico (Bi-OO-cyst®; Biolink Ltd, York, R.U.). Se dividieron las aves en 4 jaulas de 1,5 m², sobre virutas de madera. Se les proporcionó agua potable y pienso a voluntad. Se aplicó un programa de 23 h/1 h de luz-oscuridad.

Diseño del estudio experimental:

Los primeros 7 días, se alimentó a los pollos con una dieta de inicio y desde el día 8 hasta el 15 con una dieta de crecimiento. Tanto la dieta de inicio como la de crecimiento eran dietas basadas en trigo/centeno (43%/7,5%), con harina de soja como fuente de proteínas. Desde el día 17 en adelante, se usó la misma dieta con la excepción de que se usó harina de pescado (30%) como fuente de proteínas. El Instituto de Investigación Agrícola y Pesquera (ILVO) proporcionó el pienso. Los productos sometidos a prueba se mezclaron en el pienso. Se administró la vacuna Gumboro en el agua potable el día 16 en todos los grupos. Se expusieron todos los grupos por vía oral una vez al día a aproximadamente 4.10⁸ ufc de la cepa 56 de *C. perfringens* los días 17, 18, 19 y 20. El día 18 se les inoculó por vía oral a todos los pájaros una dosis de diez veces de Paracox-8™. Los días 21, 22 y 23, se sacrificaron 9 animales de cada grupo mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico.

Modelo:

	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22	d23
Gumboro	x							
Pienso + harina de pescado		x	x	x	x	x	x	x
Inoculación de <i>C. perfringens</i>		x	x	x	x			
Paracox® x10			x					
Puntuación						x	x	x

Tabla 1. Programa de tiempo para el estudio *in vivo*

Productos sometidos a prueba:

- Corral 1: control positivo
- Corral 2: monobutirato de glicerilo (adsorbido sobre un portador de sílice), añadido al pienso a una concentración inferior
- Corral 3: monobutirato de glicerilo (adsorbido sobre un portador de sílice), añadido al pienso a una concentración superior
- Corral 4: tributirato de glicerilo (adsorbido sobre un portador de sílice)

Se añadieron los productos al pienso a las concentraciones mostradas en la tabla 2 a continuación:

	Monobutirato de glicerilo, sobre portador de sílice, baja concentración	Monobutirato de glicerilo, sobre portador de sílice, alta concentración	Tributirato de glicerilo, sobre portador de sílice
Semana 1	5	7,5	5
Semana 2	2,5	6	2,5

Semana 3	2	5,5	2
----------	---	-----	---

Tabla 2. Concentración de productos añadidos al pienso (kg/tonelada)

5 Se puntuaron de manera ciega las lesiones intestinales en el intestino delgado (del duodeno al íleon) de la siguiente manera:

0: sin lesiones macroscópicas

1: mucosa intestinal congestionada

10 2: ulceración o necrosis focal pequeña (1-5 focos)

3: ulceración o necrosis focal (5-16 focos)

15 4: ulceración o necrosis focal (16 o más focos)

5: zonas de necrosis de 2-3 cm de largo

20 6: necrosis difusa típica de casos en campo

Se clasificaron las puntuaciones de lesiones de 2 o más como positivas para enteritis necrótica

Análisis estadístico

25 Se usó el software GraphPad Prism, Inc. para determinar si había diferencias significativas entre grupos. Se determinó la significación estadística a un valor de p de $<0,05$.

Observaciones clínicas

30 No se observaron observaciones clínicas anómalas.

3 pollos murieron durante el ensayo.

35 - 1 pollo murió en el corral 1

- 2 pollos murieron en el corral 3

40 La tabla 3 muestra el número de aves con lesiones de enteritis necrótica para cada grupo, el día 21, día 22 y día 23. También se muestra el número total de aves con lesiones por grupo.

	Control positivo	Monobutirato de glicerol, baja cantidad	Monobutirato de glicerol, alta cantidad	Tributirato de glicerol
Día 21	9/9	5/9	4/9	3/9
Día 22	4/9	3/9	5/9	2/9
Día 23	4/10	2/10	3/8	2/11
Total	17/28	10/28	12/26	7/29
Total (%)	61	36	46	24

Tabla 3. Número de aves con lesiones macroscópicas de enteritis necrótica en los tres días de muestreo

45 El porcentaje de pollos positivos (con una puntuación de lesiones macroscópicas = 2) se muestra en la figura 1.

Los resultados en la figura 1 muestran que añadir tributirato de glicerilo al pienso proporciona un resultado significativamente mejor, con respecto a prevenir la enteritis necrótica inducida por *Clostridium perfringens* en pollos de engorde, que añadir monobutirato de glicerilo a una cualquiera de las dos concentraciones sometidas a prueba.

50 Si la adición de monobutirato de glicerilo a la concentración superior se compara con la adición de tributirato de glicerilo, es aproximadamente el mismo peso de ácido butírico que se añade (suponiendo que el glicerol y el ácido butírico tienen aproximadamente los mismos pesos molares). A pesar de este hecho, el tributirato de glicerilo proporciona un resultado mucho mejor (el 24 % de pollos positivos en total para el tributirato de glicerilo en comparación con el 46 % de pollos positivos en total para monobutirato de glicerilo a la concentración superior).

55 También es notable que añadir una concentración inferior de monobutirato de glicerilo proporciona un mejor resultado que añadir una concentración superior (el 36 % de pollos positivos en total para monobutirato de glicerilo a

la concentración inferior en comparación con el 46 % de pollos positivos en total para monobutirato de glicerilo a la concentración superior).

5 Los resultados muestran que usar una composición de éster de glicerol según la presente invención es una manera eficaz de prevención de enteritis necrótica inducida por *Clostridium perfringens* en Galloanserae.

10 El ejemplo de realización debe interpretarse como ilustrativo y no limitativo de ningún modo. La composición de éster de glicerol puede comprender por ejemplo una combinación de ésteres de glicerol de diferentes ácidos grasos de cadena corta, tales como ácido butírico, ácido propiónico y ácido valérico. Los niveles de dosificación tendrán que calcularse entonces con respecto a la cantidad total de ésteres de glicerol.

Puede comprobarse además que es útil alimentar la composición de éster de glicerol al animal durante un periodo de tiempo más corto o más largo y extrapolar los niveles de dosificación en consecuencia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de éster de glicerol que comprende al menos el 75 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 25 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 8 % en peso de monobutirato de glicerilo, para su uso en la prevención y/o el alivio de enteritis necrótica en Galloanserae, mediante lo cual la composición se incorpora directamente al pienso o se alimenta de manera complementaria al pienso.
- 10 2. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha enteritis necrótica está causada por *Clostridium perfringens*.
- 15 3. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que dichas Galloanserae son galliformes, tales como pollo, pavo, urogallo o faisán.
- 20 4. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que dichas Galloanserae son anseriformes, tales como patos, oca o cisne.
- 25 5. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición de éster de glicerol comprende al menos el 80 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 20 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 5 % en peso de monobutirato de glicerilo.
- 30 6. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición de éster de glicerol comprende al menos el 85 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 15 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 4 % en peso de monobutirato de glicerilo.
- 35 7. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición de éster de glicerol comprende al menos el 90 % en peso de tributirato de glicerilo, por debajo del 10 % en peso de dibutirato de glicerilo y por debajo del 2,5 % en peso de monobutirato de glicerilo.
- 40 8. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad de ácido butírico libre en dicha composición de éster de glicerol está por debajo del 1 %, preferiblemente por debajo del 0,5 % y lo más preferiblemente por debajo del 0,2 % en peso.
- 45 9. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dicha composición de éster de glicerol se adsorbe sobre un portador, tal como un portador de sílice, permitiendo de ese modo que se distribuya dicha composición de éster de glicerol como un producto seco.
- 50 10. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 9, en la que dicho portador comprende partículas porosas de sílice con un tamaño de partícula promedio de 20-70 μm .
- 55 11. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 9, en la que dicha composición de éster de glicerol se adsorbe sobre partículas de sílice en una razón en peso del 50-80 % de éster de glicerol y del 20-50 % de partículas de sílice.
12. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que dicha composición de éster de glicerol se alimenta a dichas Galloanserae en una cantidad de entre el 0,05 y el 1,5 % en peso de la ración diaria de pienso de las Galloanserae.
13. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que dicha composición de éster de glicerol se alimenta a dichas Galloanserae en una cantidad de entre el 0,1 y el 1,0 % en peso de la ración diaria de pienso de las Galloanserae.
14. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 12 o 13, en la que dicha cantidad de dicha composición de éster de glicerol se administra a lo largo de intervalos de tiempo de 5-10 días y en la que dicha cantidad disminuye a lo largo de un periodo de 1-5 semanas.
15. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 14, en el que la disminución de dicha cantidad es del 20-50 % de la cantidad proporcionada durante el intervalo previo.

[Fig. 1]

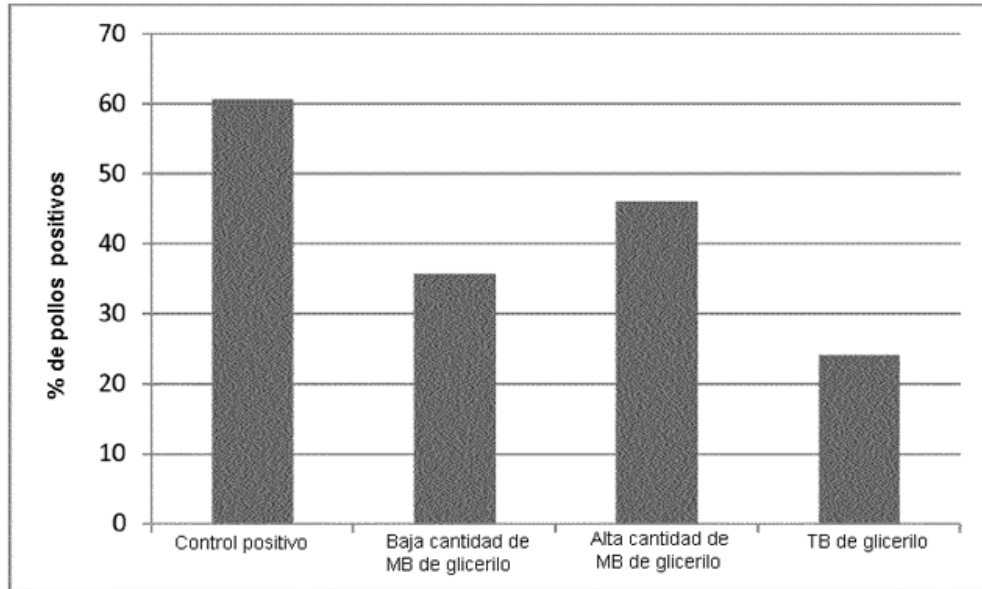


Figura 1: Porcentaje de pollos positivos (con puntuación de lesiones macroscópicas ≥ 2).