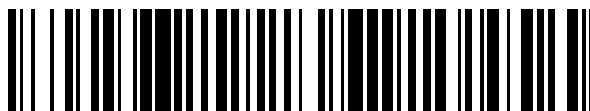


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 738**

51 Int. Cl.:

|                    |                              |           |
|--------------------|------------------------------|-----------|
| <b>A23K 10/18</b>  | (2006.01) <b>A23K 50/75</b>  | (2006.01) |
| <b>A23K 20/174</b> | (2006.01) <b>A61K 38/48</b>  | (2006.01) |
| <b>A23K 20/189</b> | (2006.01) <b>A61K 39/012</b> | (2006.01) |
| <b>A23K 10/14</b>  | (2006.01) <b>A23K 20/10</b>  | (2006.01) |
| <b>A23K 20/24</b>  | (2006.01) <b>A61K 38/47</b>  | (2006.01) |
| <b>A23K 20/22</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A23K 20/26</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A23K 20/28</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A23K 20/20</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A23K 50/70</b>  | (2006.01)                    |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2012** **PCT/EP2012/072979**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013** **WO13072521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2012** **E 12787031 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018** **EP 2782458**

54 Título: **Uso de proteasas estables al ácido en alimento para animales para aumentar el rendimiento de pollos de engorde vacunados contra coccidios**

30 Prioridad:

**17.11.2011 EP 11189542**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.02.2019**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (50.0%)**  
**Het Overloon, 1**  
**6411 TE Heerlen, NL y**  
**NOVOZYMES A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WARD , NELSON y**  
**KNAP, INGE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 700 738 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 proteasas estables al ácido en alimento para animales para aumentar el rendimiento de pollos de engorde vacunados contra coccidios

Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere al uso de proteasas estables al ácido en alimentos para animales en combinación con agentes anticoccidiales, en particular al uso de tales proteasas para aumentar el rendimiento de los animales vacunados.

[0002] El uso de proteasas en alimento para animales se conoce a partir de los siguientes documentos: W095/28850 describe un aditivo para alimento para animales que comprende una fitasa y una enzima proteolítica. Varias enzimas proteolíticas se especifican en la p. 7.

[0003] W096/05739 describe un aditivo alimentario enzimático que comprende xilanasas y una proteasa. Las proteasas adecuadas se enumeran en la p.25. W095/02044 describe proteasas derivadas de *Aspergillus aculeatus*, así como su uso en alimentos para animales.

[0004] US 3966971 describe un proceso para obtener proteína de una fuente de proteína vegetal mediante tratamiento con una fitasa ácida y opcionalmente una enzima proteolítica. Las proteasas adecuadas se especifican en la columna 2.

[0005] US 2006/134091 describe el uso de una combinación de una proteasa y una sal interna de un ácido carboxílico de amina cuaternaria para la preparación de un agente para el tratamiento y/o la profilaxis de la coccidiosis y de infecciones bacterianas tales como enteritis necróticas en animales.

[0006] PEEK H W ET AL: "Dietary protease can alleviate negative effects of a coccidiosis infection on production performance in broiler chickens", ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 150, nº. 1-2, 30 de marzo de 2009, páginas 151-15 también describe experimentos para determinar el efecto de la proteasa digestiva sobre la infección por coccidiosis.

[0007] J Parker ET AL: " Enzymes as feed additive to aid in responses against Eimeria species in coccidia-vaccinated broilers fed corn-soybean meal diets with different protein levels", Poultry science, 1 de abril de 2007, páginas 643-653 y C. L. Walk ET AL: " Effects of dietary enzymes on performance and intestinal goblet cell number of broilers exposed to a live coccidia oocyst vaccine ", Poultry science, vol. 90, no. 1, 21 de diciembre de 2010, páginas 91-98 describen investigaciones para evaluar los efectos de las enzimas digestivas en pollos de engorde vacunados con una vacuna de ooquistes de coccidios vivos.

Estado de la técnica

[0008] Coccidios es un nombre genérico dado a los organismos protozoarios unicelulares que son parásitos intestinales que infectan tanto a los vertebrados como a los invertebrados. Los organismos causan la coccidiosis y generalmente se asientan en el intestino delgado, por ejemplo en el colon. La infección con coccidios en animales de granja no solo puede reducir seriamente el crecimiento, sino que puede ser potencialmente mortal. Los síntomas de la infección con coccidios incluyen la pérdida de células epiteliales, la denudación de la mucosa intestinal y la diarrea (a menudo con una pérdida de sangre concomitante). Para algunos animales de granja, como las aves de corral, la infección por coccidios puede ser mortal, o dañar gravemente la salud del animal.

[0009] Las aves de corral son particularmente vulnerables a la coccidiosis debido a varias razones: (1) El ciclo parasitario de 6 a 8 días las afecta en una etapa crítica entre las semanas 2 y 4, cuando generalmente se expresa el crecimiento máximo. Dado que los parásitos destruyen prácticamente todo el epitelio intestinal, la absorción de nutrientes se reduce drásticamente, lo que resulta en una marcada reducción del crecimiento. Hasta el sacrificio a las 5 o 6 semanas, no hay tiempo suficiente para que se recuperen. (2) Hay 7 especies de *Eimeria* que pueden infectar a las aves de corral, más que en cualquier otra categoría de animales, y al menos 4 de ellas se ven regularmente en las operaciones comerciales. De este modo, cuando concluye un ciclo infeccioso, otro puede estar en una etapa temprana, de modo que la coccidiosis se convierte en crónica. (3) En las aves de corral, se observan las especies más patógenas (*Eimeria tenella*, *E. necatrix*), que inducen hemorragias graves y, en ciertos casos, pueden causar una mortalidad de hasta el 50%. Un caso tan agudo de coccidiosis podría arruinar fácilmente a un avicultor. (4) La cría intensiva de aves de corral (100 000 pollos o más en un criadero) en cama profunda facilita el acceso de las aves de corral a las etapas infecciosas de coccidios en las heces mediante coprofagia y, por lo tanto, favorece una rápida propagación de la enfermedad en un averío. Si las condiciones sanitarias no son rigurosas, la enfermedad también se transferirá a otros criaderos de aves en la misma granja y permanecerá en el sitio durante años.

[0010] Para combatir la coccidiosis, el alimento para animales a menudo se complementa con un coccidiostático y/o los animales se vacunan con un fármaco como, por ejemplo, Coccivac®B, una vacuna anticoccidial de Shering-Plough Animal Health Corporation. Los coccidiostáticos que han sido aprobados por la CEE para su uso con aves de corral (pollos, pavos, pollos de engorde y gallinas ponedoras) incluyen sulfonimidaz, amprolio, decoquinato e ionóforos.

[0011] Es bien sabido que la vacunación contra coccidiosis provoca una disminución del rendimiento del pollo de engorde. En particular, la vacunación contra coccidiosis causa una reducción en la ingesta de alimento y en la eficiencia alimenticia. Actualmente, el 20% de todos los pollos de engorde producidos en los Estados Unidos están vacunados contra la coccidiosis. Se espera que el uso de la vacunación contra coccidiosis aumente hasta el 50% para 2020 en la producción de pollos de engorde en los Estados Unidos. Por lo tanto, el uso de la vacuna contra coccidiosis tiene un enorme impacto económico para los productores de pollos de engorde.

#### Resumen de la invención

[0012] Sorprendentemente, se ha descubierto que la adición de al menos una proteasa estable al ácido como se define más adelante a la dieta de las aves vacunadas contra coccidiosis da como resultado una mejora significativa del rendimiento del animal. Los inventores han descubierto que, especialmente, el uso de serin-proteasas en combinación con la vacunación contra coccidiosis mejora el rendimiento de los pollos de engorde. En particular, el uso de serin-proteasas mejora el aumento de peso y mejora el índice de transformación del alimento (FCR) de las aves vacunadas con coccidiosis. Por lo tanto, el uso de tales proteasas puede superar los problemas causados por el uso de la vacunación contra coccidiosis.

[0013] El término "aves" incluye aves de corral como pavos, patos y pollos (incluidos, entre otros, pollos de engorde, gallinas ponedoras).

#### Descripción detallada de la invención

[0014] Las proteasas se clasifican en función de su mecanismo catalítico en los siguientes grupos: serin- proteasas (S), cistein-proteasas (C), proteasas aspárticas (A), metaloproteasas (M) y proteasas desconocidas o todavía sin clasificar (U), véase el manual Handbook of Proteolytic Enzymes, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (eds), Academic Press (1998), en particular la parte de introducción general.

[0015] Las proteasas para uso de acuerdo con la invención son proteasas estables al ácido. Las proteasas de acuerdo con la invención son serin-proteasas estables al ácido. El término serin proteasa se refiere a las serin peptidasas y sus clones como se define en el manual anterior. En la versión de 1998 de este manual, las serin peptidasas y sus clones se tratan en los capítulos 1-175. Las serin proteasas pueden definirse como peptidasas en las que el mecanismo catalítico depende del grupo hidroxilo de un residuo de serina que actúa como el nucleófilo que ataca el enlace peptídico. Algunos ejemplos de serin proteasas para usar de acuerdo con la invención son proteasas de Clan SA, por ejemplo la familia S2 (estreptogrisina), por ejemplo la subfamilia S2A (proteasa alfa-lítica), como se define en el manual anterior. La actividad de la proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo, en el que se emplee un sustrato, que incluya enlaces peptídicos relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El pH del ensayo y la temperatura del ensayo también deben adaptarse a la proteasa en cuestión. Algunos ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11. Algunos ejemplos de temperaturas de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70 °C.

[0016] Algunos ejemplos de sustratos de proteasa son la caseína y los sustratos pNA, tales como Suc-AAPF-NA (disponible, por ejemplo, de Sigma S7388). Las letras mayúsculas en este sustrato pNA se refieren al código de aminoácidos de una letra. Otro ejemplo es Protazyme AK (caseína reticulada teñida con azurina preparada en comprimidos por Megazyme T-PRAK). Para estudios de actividad de pH y estabilidad de pH, se prefiere el sustrato pNA, mientras que para estudios de actividad de temperatura, se prefiere el sustrato Protazyme AK.

[0017] No hay limitaciones para el origen de la serin-proteasa estable al ácido para su uso de acuerdo con la invención. Por lo tanto, el término proteasa incluye no solo proteasas naturales o de tipo salvaje, sino también cualquier mutante, variante, fragmento, etc. de las mismas, que muestre actividad de proteasa, así como proteasas sintéticas, tales como proteasas barajadas y proteasas de consenso. Dichas proteasas modificadas genéticamente pueden prepararse como se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo por mutagénesis dirigida, por PCR (utilizando un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada como uno de los cebadores en las reacciones de PCR), o por mutagénesis aleatoria. La preparación de proteínas de consenso se describe, por ejemplo, en la EP 0 897 985.

[0018] Algunos ejemplos de proteasas estables al ácido utilizadas son:

- a) las proteasas derivadas de Nocardiosis sp. NRRL 18262, y Nocardiosis alba;
- b) proteasas de al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o al menos 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las proteasas de (i);

c) proteasas de al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o al menos 95% de identidad con cualquiera de las SEC ID NO: 1, y/o la SEC ID NO: 2.

[0019] Para calcular el porcentaje de identidad, se puede utilizar cualquier programa informático conocido en la técnica. Algunos ejemplos de tales programas informáticos son el algoritmo Clustal V (Higgins, D. G., y Sharp, P. M. (1989), Gene (Amsterdam), 73, 237-244 ; y el programa GAP proporcionado en el paquete de programas GCG versión 8 (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453.

[0020] En una forma de realización particular, la proteasa utilizada es una proteasa microbiana, teniendo en cuenta que el término microbiano indica que la proteasa se deriva de un microorganismo, o procede de, o es un análogo, un fragmento, una variante, un mutante o una proteasa sintética derivada de un microorganismo. Puede producirse o expresarse en la cepa microbiana original de tipo salvaje, en otra cepa microbiana o en una planta; por ejemplo, el término cubre la expresión de proteasas naturales de tipo salvaje, así como la expresión en cualquier hospedador de proteasas recombinantes, genéticamente modificadas o sintéticas. Algunos ejemplos de microorganismos son las bacterias, por ejemplo las bacterias del filo Actinobacteria phy. nov., por ejemplo de la clase I: Actinobacterias, por ejemplo de la subclase V: Actinobacteridae, por ejemplo del orden I: Actinomycetales, por ejemplo del suborden XII: Streptosporangineae, por ejemplo de la familia II: Nocardiopsaceae, por ejemplo del género I: Nocardiopsis, por ejemplo Nocardiopsis sp. NRRL 18262, y Nocardiopsis alba; por ejemplo de la especie Bacillus o mutantes o variantes de las mismas que muestran actividad proteasa. Esta taxonomía se basa en Berge's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, 2000, Springer (versión preliminar: Road Map to Bergey's).

[0021] Otros ejemplos de microorganismos son los hongos, tales como las levaduras o los hongos filamentosos. En el uso de acuerdo con la invención, la proteasa se puede dar al animal antes, después o al mismo tiempo que la dieta para aves vacunadas contra coccidios. Se prefiere lo último.

[0022] En el presente contexto, el término estable al ácido significa que la actividad de proteasa de la enzima proteasa pura, en una dilución correspondiente a  $A_{280} = 1,0$ , y después de la incubación durante 2 horas a 37 °C en el siguiente tampón:

- 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES,
- 100mM de CABS, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM de KCl, Triton®X-100 al 0,01%, pH 3,5, es al menos el 40% de la actividad de referencia, según se mide utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 1 de este documento (sustrato: Suc-AAPF-pNA, pH 9,0, 25 °C).

[0023] En formas de realización particulares de la definición de estabilidad al ácido anterior, la actividad de proteasa es al menos el 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o al menos el 97% de la actividad de referencia.

[0024] El término actividad de referencia se refiere a la actividad de proteasa de la misma proteasa, después de la incubación en forma pura, en una dilución correspondiente a  $A_{280} = 1,0$ , durante 2 horas a 5°C en el siguiente tampón: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM de KCl, Triton®X-100 al 0,01%, pH 9,0, en el que la actividad se determina como se ha descrito anteriormente.

[0025] En otras palabras, el método para determinar la estabilidad al ácido comprende los siguientes pasos:

- a) La muestra de proteasa que se va a analizar (en forma pura,  $A_{280} = 1,0$ ) se divide en dos partes alícuotas (I y II);
- b) La parte alícuota I se incuba durante 2 horas a 37 °C y pH 3,5;
- c) Se mide la actividad residual de la alícuota I (pH 9,0 y 25 °C);
- d) La parte alícuota II se incuba durante 2 horas a 5 °C y pH 9,0;
- e) Se mide la actividad residual de la parte alícuota II (pH 9,0 y 25 °C);
- f) Se calcula el porcentaje de actividad residual de la parte alícuota I en relación con la actividad residual de la parte alícuota II.

[0026] Alternativamente, en la definición anterior de estabilidad al ácido, el valor de pH del tampón del paso b) puede ser 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3 o 3.4.

[0027] En otras formas de realización alternativas de la definición de estabilidad al ácido anterior relacionada con los valores de pH del tampón del paso alternativo b) anterior, la actividad de proteasa residual en comparación con la referencia, es de al menos el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o al menos el 97%.

[0028] En formas de realización alternativas, se pueden aplicar valores de pH de 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, u 8.5 para el tampón del paso d).

[0029] En la definición de estabilidad al ácido anterior, el término  $A_{280} = 1,0$  significa tal concentración (dilución) de dicha proteasa pura que da lugar a una absorción de 1,0 a 280 nm en una cubeta de 1 cm de longitud respecto a un blanco de tampón.

[0030] Asimismo, en la definición anterior de estabilidad al ácido, el término proteasa pura se refiere a una muestra con una relación de  $A_{280}/A_{260}$  por encima o igual a 1,70.

[0031] En otra forma de realización particular, la proteasa para uso de acuerdo con la invención, además de ser estable al ácido, también es termoestable.

[0032] El término termoestable significa uno o más de los siguientes: que la temperatura óptima es al menos 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C, 64 °C, 66 °C, ° 68 °C, o al menos 70 °C.

[0033] La proteasa, por supuesto, debe aplicarse en una cantidad efectiva, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar el índice de transformación del alimento en aves vacunadas con una vacuna anticoccidial.

[0034] En un ejemplo preferido, la dosis prevista de la proteasa es de 0,01 a 200 mg de proteína de enzima proteasa por kg de alimento final.

[0035] El término índice de transformación del alimento se determina en función de un ensayo de crecimiento que comprende un primer tratamiento en el que la composición de acuerdo con la invención se agrega al alimento para animales en una concentración adecuada por kg de alimento, y un segundo tratamiento (control) sin adición de la composición al alimento para animales.

[0036] Como se sabe generalmente, un FCR mejorado es más bajo que el FCR de control. En formas de realización particulares, el FCR se mejora (es decir, se reduce) en comparación con el control en al menos un 1,0% o un 5%.

[0037] Para los usos de acuerdo con la invención, no es necesario que la proteasa sea tan pura; puede incluir, por ejemplo, otras enzimas, incluso otras proteasas estables al ácido, en cuyo caso podría denominarse una preparación de enzimas o proteasas. Aun así, una preparación de enzimas/proteasas bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente en el alimento una proteasa que está esencialmente libre de interferir o contaminar otras proteasas. El término dosis se refiere correctamente, en particular, al objetivo de obtener resultados regulares y constantes, y a la capacidad de optimizar la dosis en función del efecto deseado.

[0038] En una forma de realización preferida de un concepto de alimentación de aves de corral, la proteasa se usa en forma de un aditivo para piensos.

[0039] La incorporación de la composición de aditivos para piensos, como se ejemplifica en el presente documento, a los alimentos para aves se lleva a cabo en la práctica utilizando un concentrado o una premezcla. Una premezcla designa una mezcla preferiblemente uniforme de uno o más microingredientes con diluyente y/o vehículo. Las premezclas se utilizan para facilitar la dispersión uniforme de microingredientes en una mezcla más grande. Se puede agregar una premezcla según la invención a los ingredientes del alimento o al agua para beber en forma de sólidos (por ejemplo, como polvo soluble en agua) o líquidos.

[0040] Aparte de la proteasa estable al ácido de la invención, los aditivos para piensos de la invención contienen al menos una vitamina soluble en grasa, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un oligoelemento, y/o al menos un macromineral.

[0041] Además, otros ingredientes opcionales de aditivos para piensos son los agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tales como betacaroteno, astaxantina, cantaxantina, apo-éster y luteína; compuestos aromáticos; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); especies generadoras de oxígeno reactivo; y/o al menos una enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4., fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (EC 3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

[0042] Algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, Leucocina A, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina, y Ovispirina como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasina y Estatinas.

[0043] Algunos ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosohexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

[0044] Algunos ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son sustancias químicas tales como perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

[0045] Por lo general, las vitaminas solubles en grasa y en agua, así como los oligoelementos, forman parte de la llamada premezcla destinada a ser agregada al alimento, mientras que los macrominerales generalmente se agregan por separado al alimento.

5 [0046] Las siguientes son listas no excluyentes de ejemplos de estos componentes:

- Algunos ejemplos de vitaminas solubles en grasa son la vitamina A, la vitamina D3, la vitamina E y la vitamina K, por ejemplo la vitamina K3.
- Algunos ejemplos de vitaminas solubles en agua son la vitamina B12, la biotina y la colina, la vitamina B1, la vitamina B2, la vitamina B6, la niacina, el ácido fólico y el pantotenato, por ejemplo el Ca-D-pantotenato.
- Algunos ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.
- Algunos ejemplos de macro minerales son calcio, fósforo y sodio.

15 [0047] Una premezcla puede contener, por ejemplo, por tonelada de alimento para aves, de 50 a 200 g de una solución de propilenglicol de la mezcla de los compuestos activos, de 20 a 1000 g de un agente emulsionante, de 50 a 900 g de cereales y subproductos, de 20 a 100 g de un soporte proteico (leche en polvo, caseína, etc.) y de 50 a 300 g de un componente mineral (sílice expandida, cal de calidad alimentaria, fosfato dicálcico, etc.).

20 [0048] Finalmente, se agrega a la composición de alimento para animales un aditivo para pienso o una premezcla como se ha descrito anteriormente. Se prepara y se agrega de tal manera que la cantidad de proteasa corresponde a una adición prevista de 0,01 a 200 mg de proteína proteasa por kg de alimento.

25 [0049] Las composiciones o alimentos para animales tienen un contenido relativamente alto de proteínas. De acuerdo con las publicaciones del National Research Council (NRC) mencionadas anteriormente, las dietas para aves de corral y cerdos se pueden caracterizar como se indica en la Tabla B de la WO 01/58276. Una composición de pienso para animales de acuerdo con la invención tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg, y además comprende al menos una proteasa como se reivindica en el presente documento.

30 [0050] Además, o como alternativa (al contenido de proteína bruta indicado anteriormente), la composición de alimento para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10 - 30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1 a 200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1 a 200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1 a 100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1 a 150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

35 [0051] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de cualquiera de los rangos 2, 3, 4 o 5 como se describe en la Tabla B de la WO 01/58276.

40 [0052] Para determinar los mg de proteína proteasa por kg de alimento, la proteasa se purifica a partir de la composición de alimento, y la actividad específica de la proteasa purificada se determina utilizando un ensayo relevante (véase actividad de proteasa, sustratos y ensayos). La actividad de la proteasa de la composición de alimento como tal también se determina utilizando el mismo ensayo y, en función de estas dos determinaciones, se calcula la dosis en mg de proteína proteasa por kg de alimento.

45 [0053] Los mismos principios se aplican para determinar los mg de proteína proteasa en aditivos para piensos.

50 [0054] La proteasa de *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262 de acuerdo con la invención se puede preparar usando métodos convencionales, como se describe en general en WO01/58276. Un aditivo para piensos que comprende la proteasa de *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262 también está disponible comercialmente (por ejemplo, como Ronozyme®ProAct, suministrado por DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Suiza) o puede ser preparado fácilmente por una persona experta utilizando procesos y métodos ya conocidos en la técnica anterior.

55 [0055] La invención es según las reivindicaciones adjuntas.

[0056] Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

## Ejemplos

### 60 Ejemplo 1 ensayo de estabilidad del pH

[0057] Se usó Suc-AAPF-pNA (Sigma S-7388) para obtener los perfiles de estabilidad del pH.

65 [0058] Tampón de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 150 mM de KCl, Triton®X-100 al 0,01% ajustado a valores de pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 o 11.0 con HCl o NaOH.

[0059] Cada muestra de proteasa (en 1 mM de ácido succínico, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM de NaCl, pH 6.0 y con una absorción de  $A_{280} > 10$ ) se diluyó en el tampón de ensayo con cada valor de pH analizado a  $A_{280} = 1,0$ . Las muestras de proteasa diluidas se incubaron durante 2 horas a 37 °C.

[0060] Después de la incubación, las muestras de proteasa se diluyeron en 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM de KCl, Triton®X-100 al 0,01%, pH 9,0, llevando el pH de todas las muestras a pH 9,0.

[0061] En la siguiente medición de actividad, la temperatura fue de 25 °C.

[0062] Se mezclaron 300 µl de la muestra de proteasa diluida con 1,5 ml del tampón de ensayo a pH 9,0 y la reacción de la actividad se inició mediante la adición de 1,5 ml de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluidos 45 veces con Triton®X-100 al 0,01%) y, después de mezclar, el aumento en  $A_{405}$  fue monitoreado por un espectrofotómetro como medición de la actividad de la proteasa (residual).

[0063] La incubación a 37° C se realizó a los diferentes valores de pH y las mediciones de actividad se representaron como actividades residuales frente al pH. Las actividades residuales se normalizaron con la actividad de una incubación paralela (control), donde la proteasa se diluyó a  $A_{280} = 1,0$  en el tampón de ensayo a pH 9.0 y se incubó durante 2 horas a 5 °C antes de la medición de la actividad como las otras incubaciones. Las muestras de proteasa se diluyeron antes de la medición de la actividad para asegurar que todas las mediciones de la actividad estuvieran dentro de la parte lineal de la curva de dosis-respuesta para el ensayo.

## **Ejemplo 2 - Alimentación de aves vacunadas con proteasas estables al ácido.**

[0064] Se llevó a cabo un ensayo de aves criadas en suelo utilizando aves machos Ross 708 de un día. Se usaron un total de 27 corrales en la prueba y se colocaron 10 aves por corral el día 1 de edad. Los corrales se asignaron al azar en 3 tratamientos con 9 repeticiones/tratamiento. Se alimentó a las aves con dietas basales nutricionalmente adecuadas basadas en harina de maíz/soja y se ajustaron a la edad de las aves suministrando una dieta de inicio del día 1 al 21 y una dieta de crecimiento del día 22 al 42.

### Tratamiento 1: Dieta basal

[0065] Cocci Vac® B el día 1 de edad + Monteban® alimentario (coccidiostático) 80 ppm. Todas las aves recibieron Cocci Vac® B el día 1 de edad, administrado por vía nasal en el criadero.

### Tratamiento 2:

[0066] Cocci Vac® B en el día 1 de edad sin Monteban®

### Tratamiento 3:

[0067] Como el tratamiento 2 más 400 ppm de la mezcla de enzimas RONOZYME® (suministrada por DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Suiza)

[0068] Se suministró Monteban para suprimir el efecto de Cocci Vac. Cocci-Vac induce la inmunidad a la coccidiosis al causar un nivel bajo de la enfermedad.

[0069] La mezcla de enzimas comprendía:

- 200 ppm de RONOZYME®ProAct (proteasa estable al ácido) y
- 100 ppm de RONOZYME WX + 50 ppm de RONOZYME A + 50 ppm de ROXAZYME G2 (= mezcla de enzimas que contiene xilanas, amilasa, celulosa, beta-glucanasa y otras)

[0070] Al final de la prueba en el día 42, se determinó el peso promedio de las aves y el consumo promedio de alimento y se calculó el índice de transformación del alimento (FCR) dividiendo la ingesta de alimento por el aumento de peso para cada tratamiento.

[0071] Los resultados se resumen en las siguientes tablas, donde la tabla 1 enumera el peso corporal en el día 42 y la tabla 2 enumera el FCR en el día 42.

Tabla 1. Peso corporal promedio de 42 días

|                      | <b>Peso corporal promedio en g</b> |
|----------------------|------------------------------------|
| <b>Tratamiento 1</b> | 2832 <sup>a</sup>                  |
| <b>Tratamiento 2</b> | 2546 <sup>c</sup>                  |

|                      |                   |
|----------------------|-------------------|
| <b>Tratamiento 3</b> | 2710 <sup>b</sup> |
| abcP <0,05           |                   |

Tabla 2. Índice de transformación del alimento día 42

|                      | <b>FCR</b>         |
|----------------------|--------------------|
| <b>Tratamiento 1</b> | 1,544 <sup>b</sup> |
| <b>Tratamiento 2</b> | 1,656 <sup>a</sup> |
| <b>Tratamiento 3</b> | 1,559 <sup>b</sup> |
| abcP <0,05           |                    |

[0072] Los resultados muestran claramente que la vacunación contra coccidios (Tratamiento 2) disminuyó el peso corporal y afectó adversamente al FCR, mientras que el coccidiostático (Tratamiento 1) eliminó estos efectos. La adición de la mezcla de enzimas dio como resultado un peso corporal significativamente mayor y un FCR mejorado en comparación con el Tratamiento 2. La adición de la mezcla de enzimas a las aves que experimentaban coccidiosis hizo que el rendimiento de las aves fuera cercano al de las aves que recibieron el coccidiostático.

### Ejemplo 3 - Alimentación de aves vacunadas con proteasas estables al ácido.

[0073] Se llevó a cabo un ensayo de aves criadas en suelo utilizando pollitos Cobb X Cobb macho. Un total de 2160 fueron asignados al estudio. El experimento consistió en 48 corrales de 45 pollos de engorde macho. Los tratamientos se replicaron en ocho (8) bloques con seis (6) tratamientos aleatorizados en cada uno. Se alimentó a las aves con dietas basales nutricionalmente adecuadas basadas en harina de maíz/soja y se ajustaron a la edad de las aves suministrando una dieta de inicio del día 1 al 16 y una dieta de crecimiento del día 17 al 32 y una dieta de finalización del día 33 al 42. Los 6 tratamientos fueron los siguientes:

Tratamientos

[0074]

| Tratamiento                                                                                                                                                                                                                                | 1-16                                    | 17-32                                   | 33-42                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1. PC (salinomicina)                                                                                                                                                                                                                       | --                                      | --                                      | --                                      |
| 2. NC (Cocci Vac® B)                                                                                                                                                                                                                       | --                                      | --                                      | --                                      |
| 3. NC (Cocci Vac® B)                                                                                                                                                                                                                       | 200 ppm de ProAct                       | 200 ppm de ProAct                       | 200 ppm de ProAct                       |
| 4. NC (Cocci Vac® B)                                                                                                                                                                                                                       | 200 ppm de ProAct + 200 ppm de Rono AX  | 200 ppm de ProAct + 200 ppm de Rono AX  | 200 ppm de ProAct + 200 ppm de Rono AX  |
| 5. NC (Cocci Vac® B)                                                                                                                                                                                                                       | 200 ppm de ProAct + 160 ppm de WX       | 200 ppm de ProAct + 160 ppm de WX       | 200 ppm de ProAct + 160 ppm de WX       |
| 6. NC (Cocci Vac® B)                                                                                                                                                                                                                       | 200 ppm de ProAct + 100 ppm de Roxazyme | 200 ppm de ProAct + 100 ppm de Roxazyme | 200 ppm de ProAct + 100 ppm de Roxazyme |
| Como tratamiento, se utilizaron productos de enzimas RONOZYME, suministrados por DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Suiza.<br>Ronozyne® AX = 80% de Ronozyne® WX + 20% de Ronozyne® A<br>Ronozyne® ProAct = producto de proteasa pura. |                                         |                                         |                                         |

[0075] Todas las aves recibieron Cocci Vac® B el día 1 de edad, administrado por vía nasal en el criadero, excepto las aves de control positivo, que recibieron una dosis estándar del coccidiostático Salinomicina de 60 g/tonelada de alimento durante todo el estudio.

[0076] La salinomicina es el coccidiostático más utilizado que suprime el desarrollo de la enfermedad muy común de la coccidiosis.

[0077] Cocci Vac® B induce inmunidad a la coccidiosis al causar un nivel bajo de la enfermedad.

[0078] Al final de la prueba, en el día 42, se determinó el peso promedio de las aves (Ganancia de peso promedio) y el consumo promedio de alimento (Consumo de alimento) y se calculó el índice de transformación del alimento (FRC) dividiendo la ingesta de alimento por la ganancia de peso para cada tratamiento

|                        |                    | <b>Día 42</b> |                         |
|------------------------|--------------------|---------------|-------------------------|
|                        | <b>Consumo</b>     | <b>FCR</b>    | <b>Ganancia</b>         |
| <b>Tratamiento</b>     | <b>de alimento</b> |               | <b>de peso promedio</b> |
| 1. Salinomicina 60 g/t | 191,58 a           | 1,719 d       | 2,490 a                 |

|                                          |           |          |         |
|------------------------------------------|-----------|----------|---------|
| 2. Cocci Vac® B (CVB)                    | 189,96 ab | 1,792 a  | 2,372b  |
| 3. CVB ProAct 200 ppm                    | 187,85 bc | 1,760 b  | 2,412 b |
| 4. CVB ProAct 200 ppm + Rono AX 200 ppm  | 184,91 c  | 1,724 cd | 2,400 b |
| 5. CVB ProAct 200 ppm + Rono WX 200 ppm  | 181,27 d  | 1,747 bc | 2,393 b |
| 6. CVB ProAct 200 ppm + Roxazyme 100 ppm | 186,16 c  | 1,712 d  | 2,472 a |

[0079] Cocci Vac (Tratamiento 2) disminuyó el peso corporal y afectó adversamente al FCR, en comparación con PC, que recibió el tratamiento con Salinomycin.

5 [0080] La adición de la proteasa RONOZYME ProAct además de Cocci Vac® B dio como resultado una mejora significativa del FCR en comparación con Cocci Vac (Tratamiento 2). La adición de cualquiera de las mezclas de enzimas junto con el producto RONOZYME PROACT resultó en una mejoría aún mayor de las aves que experimentaban coccidiosis, lo que hizo que el rendimiento de las aves se acercara al de las aves que recibieron el coccidiostático.

10

#### LISTADO DE SECUENCIAS

[0081]

15

<110> DSM IP Assets

<120> Adiciones de ProAct a aves vacunadas contra coccidios

20

<130> 28320

<160> 2

<170> versión de PatentIn 3.5

25

<210> 1

<211> 188

<212> PRT

<213> Nocardioides sp. NRRL 18262

30

<400> 1

# ES 2 700 738 T3

Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser  
1 5 10 15

Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr  
20 25 30

Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly  
35 40 45

Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe  
50 55 60

Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr  
65 70 75 80

Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Ala Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile  
85 90 95

Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly  
100 105 110

Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val  
115 120 125

Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly  
130 135 140

Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr  
165 170 175

Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr  
180 185

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Nocardiosis alba

<400> 2

Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser  
1 5 10 15

Val

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de al menos una proteasa estable al ácido en combinación con la vacunación anticoccidial de aves para mejorar el aumento de peso y/o mejorar el índice de transformación del alimento (FCR) en el animal en comparación con un segundo tratamiento (control) sin adición de la proteasa al alimento para animales, en el que la proteasa tiene una identidad de al menos el 70% con la SEC ID NO: 1.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que la proteasa se usa en alimento para aves que incluyen aves de corral tales como pavos, patos y pollos.
- 15 3. Uso según la reivindicación 2, en el que la dosis prevista de la proteasa es de 0,01 a 200 mg de proteína de enzima proteasa por kg de alimento.
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el FCR mejora en al menos un 1,0% en comparación con el control.
- 20 5. Uso según la reivindicación 4, en el que el FCR mejora en al menos un 5,0% en comparación con el control.
- 20 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el uso comprende además una fitasa, xilanasas, galactanasas, beta-glucanasas, amilasas y/o celulasas.