

REPUBLICA DE COLOMBIA

SIC

SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



SECRETARIA DE
INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : C332684 C2000000
Fecha (RC): 2000-12-07 17:16:45
Tramite : C32 PATENTES D : REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 72

DATOS DEL SOLICITANTE

71) Nombre y Apellidos o Razón Social

CHEMGEN CORPORATION ✓

Nº de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Departamento o Estado

Ciudad

Dirección

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
MARYLAND ✓

GAITHERSBURG

211 Perry Parkway, Gaithersburg, Maryland 20877 USA, ✓

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre
Dirección

DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN ✓
Carrera 11 numero 93-43 oficina 404, Santafe de Bogotá, S.A.

DATOS DEL INVENTOR Son (4) Inventores Nacionalidad

72) Nombre del Inventor (es)

Dirección y Domicilio

Identificación

- 1) ANDERSON, David M – Estadounidense ✓
 - 2) LIU, Lin – Estadounidense ✓
 - 3) HSIAO, Hung-Yu – Estadounidense ✓
 - 4) FODGE, Douglas W - Estadounidense ✓
-
- 1) 13601 Cherrydale Drive, Rockville, MD 20850 USA
 - 2) 13622 Time View Lane, Rockville, MD 20850 USA
 - 3) 1719 Glastonberry Road, Rockville, MD 20850 USA ✓
 - 4) 7308 Righters Mill Road, Derwood, MD 20855

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

4) Título de la invención **TRATAMIENTO ENZIMÁTICO** ✓

PRIORIDAD REIVINDICADA

Sí ☒

No ☐

(3) ESTADOS UNIDOS (32) DIC. 10, 1999

(31) Nº Solicitud 60/169,935

Normativa: Convenio de París Art 4º

CLASIFICACION INTERNACIONAL

A 61 K 38/43

OLPA390

CCR/SRR

2

NIT : B00176089-2

RECEIBO DE PAGO
Nº 1717543
FECHA 4 DE DICIEMBRE DE 2000
VALOR 1.570.000,00

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 74,310
FECHA : DICIEMBRE 4 DE 2000

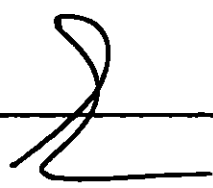
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CLARKE RODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	1717543	1,570,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	
1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,600.00
	TOTAL :	608,600.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

✓

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Enzimas de una clase particular, caracterizada por su capacidad para clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, que no contiene un agente antiinfeccioso, que presentan una actividad antiinfecciosa significativa. Cuando se administran por vía oral, estas enzimas son efectivas, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones del tracto digestivo en seres humanos y en animales. En este último caso, hay ventajas de una mayor tasa de crecimiento, eficacia alimentaria y estado de salud general.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica

☐

Poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C.

☐

Recibo de la tasa respectiva

☒

Se reivindica prioridad, el certificado respectivo (copia legalizada)

☐

Traducción oficial

☐

Capítulo descriptivo

☒

Dibujos, planos necesarios

☐

Capítulo reivindicatorio

☒

Tarjeta archivo propietario según formato

☒

Tarjeta archivo temático según formato

☒

Extracto para resumen o para publicación según formato

☒

Arte final 12 x 12 cms

☐

**SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES
NUEVA Y DE MI PROPIEDAD**

FIRMA DEL APODERADO

C.C. 41.854.882

TP N° 20824 CSJ

RESUP390

folio 4 extracto
202050
Feb 11 2002.

Folios 5 y 6
tarjetas A₂

TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una composición que comprende enzimas y con la metodología para utilizar dichas enzimas como agentes antiinfecciosos, en el contexto del tratamiento o la disminución del riesgo de infecciones en el tracto digestivo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En su *Revisión* del año 1998, del *Estimado y Proyecciones de Población Mundial*, la División del Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de Población, pertenecientes a las Naciones Unidas, estimaron que la población mundial alcanzaría los 6 billones para el año 1999. El informe también señaló que llevó solo 12 años para que la población aumentase de 5 a 6 billones, comparado a los 123 años que llevó el ir de 1 millón a 2 millones de habitantes. Para mediados del siglo XXI, la estimación sería de entre 7.3 billones y 10.7 billones. El notable aumento de la población de la última década se debe en parte a las eficientes ganancias en la producción de alimentos resultantes de la aplicación de tecnología y de prácticas de manejo agropecuarias intensivas en la producción de alimentos. Para el desarrollo futuro, será necesario una mayor ganancia eficiente en la producción animal para mantener el ritmo apropiado.

Un enfoque, que ha hecho que la producción animal sea más eficiente, implica el empleo extendido de productos químicos antimicrobianos y antibióticos en el alimento para animales. En establecimientos de producción a gran escala, la propagación de infecciones es muy rápida bajo condiciones de producción intensiva. Las enfermedades comunes son entonces controladas a través de la profilaxis y del empleo de sustancias terapéuticas. Por ejemplo, es de práctica diaria incorporar productos químicos a los alimentos de los animales para controlar las infecciones coccidiosis (ej: salinomicina, monensina, roxarsone (3-nitro), halquinola, carbadox.y olaquinox) así como antibióticos antimicrobianos (ej: bacitracina, virginiamicina, tilosil, tetraciclina, clortetraciclina, penicilina, oleandomicina, novobiocina, lincomicina, bambamomicina, apramicina, espiramicina, eritromicina, neomicina y otros). Esta práctica es de bien conocida para aumentar el crecimiento y mejorar la conversión de alimentos.

El aumento de resistencia a los antibióticos en patógenos humanos, tales como

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycobacterium tuberculosis*, ha creado el temor de que la resistencia a antibióticos desarrollada en microbios asociados con animales de granja podrían migrar a los patógenos humanos a través factores transferibles de resistencia de droga. No existen evidencias que indiquen que los animales alimentados con antibióticos son fuente de bacteria con factores transferibles de resistencia. Ver Hooge, *Feedstuffs* 71 (20):59, 1999. Aunque el empleo de antibióticos en animales y en humanos es en general diferente, existen similitudes en mecanismos que podrían resultar en resistencia cruzada.

Las fluoroquinolonas aprobadas para el control de infecciones de *E.coli* (colibacilosis) en algunos animales, son también empleados en medicina humana. Hooge, *supra*. Recientemente la FDA/CVM ha propuesto retirar la aprobación para el empleo de fluoroquinolona enrofloxacin en aves, dado el desarrollo de la resistencia de campilobacter fluoroquinolona y su transmisión a humanos. Ver Murhead, *S. Feedstuffs* 72 (45):1-4. 2000

Existe también cierta preocupación entre las industrias productoras de carne, respecto de posibles pérdidas en la producción y el posible resurgimiento de enfermedades animales, si existiese una prohibición del empleo de agentes antibióticos y antimicrobianos en alimentos. En 1986, por ejemplo, Suecia prohibió el empleo de antibióticos en la alimentación y la enfermedad animal aumentó. Esto se acompañó por un aumento del empleo de antibióticos terapéuticos que dieron como resultado un aumento general en el empleo de antibióticos así como un aumento en los costos de la producción de carne bovina. Ver Smith, *Feedstuffs* 71 (13):1, 1999. En diciembre 1998, el Consejo de Ministros de la Unión Europea, decidió suspender el empleo de seis agentes antimicrobianos que habían sido anteriormente aprobados como de uso sin receta en alimentos promotores de crecimiento (*Official Journal of the European Communities* 29, 12.98, Regulación del Consejo N° 2821/98 relacionada con la Directiva 70/524). Dos aditivos basados en la quinoxalina fueron también prohibidos en agosto de 1999 dada la preocupación existente referente a los residuos en carne. Los resultados de estas acciones es un aumento del predominio de condiciones que habían desaparecido, por ejemplo; enteritis necrótica en pollos, enteritis causada por *Clostridium perfringens* en cerdos destetados.; disentería en cerdos y diarrea

espiroquetal; y diarrea causada por *E.Coli* . Ver Miller, *United States Animal Health Association, 1999 Proceedings "Antibiotic Usages in In Food Animal Production and Resistance –European Perspective"*.

Ocurren 30.000 muertes anuales causadas por infecciones intrahospitalarias por patógenos resistentes, pero muchas menos muertes causadas por patógenos de los alimentos. Ninguna de las muertes por patógenos de los alimentos han sido relacionados con la resistencia a antibióticos (ver Smith, *supra*). Por consiguiente, no es claro si el empleo de antibióticos en la industria de producción de alimentos ha contribuido al problema de resistencia de los patógenos a las drogas en las infecciones humanas. Otro motivo de preocupación es la falta de nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones resistentes a patógenos. Ver Henry, C.M., *Chemical and Engineering News*, marzo 6, 2000, pp 41-58. Esto indicaría que cuando se desarrollan patógenos resistentes a antibióticos significativos podría no haber nuevos antibióticos disponibles para tratar la infección. La dificultad en desarrollar antibióticos, el tamaño de mercado y temas regulatorios parecen haber motivado a las grandes compañías farmacéuticas a disminuir los esfuerzos de Investigación y Desarrollo de antibióticos, especialmente para uso animal. Las nuevas reglamentaciones propuestas para el registro de una droga de uso animal son tan restrictivas que se está deteniendo el desarrollo de las mismas. Ver Smith, *supra*. Existen, sin embargo, varias pequeñas compañías involucradas en el desarrollo de nuevos antibióticos. (Henry, *supra*).

En ciertas poblaciones de animales, la infección es ya pandémica. Por ejemplo, coccidiosis en aves es una enfermedad manejable, pero no realmente bajo control. Prácticamente todas las bandadas están infectadas y se utiliza la rotación de productos químicos anti-coccidiostáticos en el alimento para controlar el daño y limitar el desarrollo de cepas resistentes. La coccidiosis causa a los productores de aves de corral \$350 millones en pérdidas anuales y en gastos de drogas antibióticas tal como salinomicina. Ver Suszkiw, *USDA; Agricultural Research Service News*, octubre 28, 1997. Para 1999, se ha estimado que aproximadamente \$114 millones serían gastados anualmente en coccidiostatos en los Estados Unidos de Norteamérica. Ver Frost y Sullivan, *U.S.Pharmaceutical Products for Food Animals.*, Informe 5245-54, 1995.

Existe una clara necesidad de encontrar nuevos y más eficientes métodos para controlar las infecciones en el tracto digestivo de los animales que son criados en

prácticas de manejo de agropecuario intensivos. Esta necesidad está basada en el requisito de obtener mayor eficiencia en la producción para seguir el paso del rápido crecimiento de la población mundial. El control mejorado de Infecciones intestinales garantiza un tasa de crecimiento más rápida y una mejorada eficiencia en alimentación. Hay también necesidad de alternativas a los antibióticos empleados en la producción animal para enfrentar la preocupación por el probable desarrollo de resistencia a antibióticos en patógenos humanos.

No existe el riesgo de estimular la evolución de microorganismos patogénicos resistentes que representen un problema para la salud humana cuando se emplea un tratamiento basado en enzimas que opera de una manera diferente a todos los antibióticos. Ya que las enzimas son proteínas, no existe la posibilidad de que se incorporen residuos químicos peligrosos en los productos cárnicos, como sucede con algunos antibióticos y productos anti-coccidiostáticos. Ver American Feed Control Officials, Inc. *Official Publication*, 1999, "Drugs and Feed Additives., Section 30-0 Enzymes," pp 208-217, ISBN 1-878341-10-3.

RESUMEN DE LA INVENCION

Por ello, uno de los objetivos de la presente invención consiste en proveer un tratamiento enzimático para reducir el impacto de las infecciones del tracto digestivo.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proveer un mecanismo para reducir el impacto de las infecciones del tracto digestivo por interferencia con la unión de los patógenos a las células del tracto digestivo.

Aún otro objetivo de la invención consiste en proveer un enfoque para el aumento en la ganancia de peso y conversión del alimento con respecto a los animales que son infectados por patógenos causantes de infecciones o enteritis necrótica.

Un objetivo adicional de la presente invención consiste en proveer una forma de dosificación adecuada para una administración por vía oral que sea efectiva para mejorar el estado de salud de un sujeto infectado o con riesgo de infección por un patógeno microbiano.

Para lograr estos y otros objetivos también se provee, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, una composición que comprende (i) una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde la enzima es distinta de una endo-1,4-β-D-

mananasa, y (ii) un vehículo fisiológicamente aceptable para la enzima, donde dicha composición se encuentra en una forma adecuada para su administración por vía oral y no contiene otro agente antiinfeccioso que la enzima. En una realización, la enzima en cuestión cliva el enlace responsable de la liberación de una proteína de la superficie celular.

En una realización preferida, la enzima incluida en la composición es una esfingomielinasa o una fosfolipasa, en especial una fosfolipasa de tipo C o de tipo D. En otra realización preferida, la enzima se selecciona del grupo formado por esterasas, cerebrosidasas y carbohidrasas que clivan un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular. En otra realización, la enzima se prepara a partir de una cepa de *Bacillus cereus*, preferentemente ATCC 7004 o ATCC 6464. Como alternativa, la enzima se obtiene por expresión del ADN recombinante que codifica la enzima en *Bacillus megaterium*. En otra realización, la enzima está contenida en una cápsula de gelatina y está presente en la composición a razón de 200 UI/Kg – 4000 UI/Kg alimento.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se provee una composición, que contiene los constituyentes mencionados anteriormente (i) y (ii), donde el vehículo fisiológicamente aceptable es una sustancia alimenticia en la cual se incorpora la enzima. Por consiguiente, la composición puede ser un alimento para animales que no contiene otro agente antiinfeccioso que la enzima. La composición de alimento para animales de la presente invención comprende además granos, tal como maíz, sorgo, trigo, cebada o centeno, una fuente de proteínas, tal como habas o arvejas, y vitaminas, aminoácidos y minerales.

De acuerdo con aún otro de los aspectos, la presente invención provee una composición, descrita anteriormente, que se encuentra en una forma de dosificación sólida o líquida.

Se provee además un método para tratar o aliviar el riesgo de una infección en el tracto digestivo, que comprende la administración por vía oral, a un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer la infección, de una cantidad efectiva de una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde la enzima es distinta de una endo-1,4- β -D-mananasa. Además, el método no incluye la administración de un agente antiinfeccioso distinto de

la propia enzima. La infección puede ser por un protozoo, tal como *Eimeria* y *Cryptosporidium*, una bacteria, tal como *Clostridium*, un hongo o una levadura.

Se provee además una composición que comprende (i) una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular y (ii) un vehículo fisiológicamente aceptable para la enzima, donde la composición se encuentra en una forma adecuada para una administración por vía oral y no contiene otro agente antiinfeccioso que la enzima.

También se provee un método para tratar o aliviar el riesgo de una infección en el tracto digestivo, que comprende la administración por vía oral, a un sujeto que padece o que tiene riesgo de padecer la infección, de una cantidad efectiva de la enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde dicho método no incluye la administración, con la enzima, de una cantidad antimicrobiana efectiva de otro agente antiinfeccioso.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. La descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien son indicativos de las realizaciones preferidas, solamente se ofrecen a modo ilustrativo dado que es posible efectuar diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención que serán evidentes para los especialistas en el arte a partir de dicha descripción detallada. Además, los ejemplos demuestran el principio de la invención y no cabe esperar que ilustren específicamente la aplicación de esta invención a todos los ejemplos de infecciones en las cuales será obvia su utilidad para los especialistas del arte anterior.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

En la Figura 1 se muestra la actividad anticriptosporidia de la enzima PI-PLC recombinante producida por una cepa de *Bacillus megaterium*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha descubierto que enzimas de una clase específica, caracterizadas por su habilidad para clivar un nexo de unión que afecta la liberación de una proteína o carbohidrato de la pared celular, despliegan una significativa actividad antibiótica, cuando son administrados oralmente, que son efectivos, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones del tracto digestivo. Las clases de enzimas incluyen por ejemplo espingomielinasas y fosfolipasas del tipo C y D, y enzimas con similar especificidad de

clivado. Ejemplos de esta clase, por lo tanto, son enzimas que clivan y liberan glicoproteínas o carbohidratos que están fijados a las membranas a través de un nexo de unión a fosfatidilinositol. Por consiguiente, la enzima fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (E.C.3.1.4.10) también conocida por la abreviatura PI-PLC o como 1-fosfatidilinositol fosfodiasterasa, es un miembro de esta clase. Otro ejemplo es fosfolipasa D específica de glicosil-fosfatidilinositol, o GPI.PLD. Low y Prasad, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:980-984, 1988.

Las enzimas GPI-PLD y PI-PLC han sido descritas de fuentes eucarióticas.. Ver Low, "Degradation of glycosil.phosphatidylinositol anchors by specific phospholipases", Chapter 2, pp 35-63 en *Molecular And Cell Biology Of Membrane Proteins,, Glycolipid Anchors Of Cell-Surface Proteins*, A.J. Turner (ed.), Ellis Horwood, New York, 1990, Low y Prasad, *Proc.Natl.Acad. Sci.* 85:980-984, 1988; Essen *et al*, *Nature* 380: 595-602, 1996; y Essen *et al*, *Biochemistry* 36:2753-2762, 1997. PI -PLC ha sido descrita de fuente procariótica, incluyendo producción extracelular por bacterias. Entre las fuentes conocidas de PI-PLC están *Bacillus cereus* (Stein y Logan, *J. Bacteriol.* 85: 369-381, 1963; Stein y Logan, *J.Bacteriol.* 90:69-81, 1965; Ikezawa *et al*, *Biochimica et Biophysica Acta* 450:154-164, 1967; Griffith *et al*, *Methods in Enzymology* 197:493-502, 1991; Volwerk *et al.*, *J. Cell, Biochem.* 39:315-325, 1989; y Kuppe *et al*, *J.Bacteriol.* 171:6077-6083, 1989), *Bacillus thuringiensis* (Ikezawa y Taguchi, *Methods in Enzymology*, (71:731-741, 1981; Documento de Patente Japonesa JP 55034039), *Staphylococcus aureus* (Low y Fincan, *Biochem. J.*162:23335-240, 1977) y *Clostridium novyi* (Taguchi e Ikezawa, *Arch.Biochem. Biophys.* 186:196-201, 1978).

Se han diseñado técnicas mejoradas de ensayo de enzimas para las enzimas PI-PLC en base a sustratos fluorescentes. Ver Hendrickson *et al*, *Biochemistry* 31,12169- 12172, 1992; Hendrickson, *Anal.Biochem.* 219, 1-8, 1994; Hendrickson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 1:619-622, 1991.

Sin adscribir definitivamente a ninguna teoría, los inventores enfatizan que la enzima PI-PLC tiene la habilidad de clivar el enlace de fosfatidilinositol-glicolípidos de las proteínas de las paredes celulares y de otros glicosil fosfatidilinositoles.. Ver Low , *supra*. Low y Saltiel, *Science* 239:268-275, 1988. Por ejemplo, las glicoproteínas y otras proteínas de superficie y carbohidratos de distintos parásitos protozoarios son

estabilizados por lípidos de glicosil fosfatidilinositol (enclajes de GPI) y son sensibles a la digestión y liberación de PI-PLC. Especies ilustrativas pertenecientes al género *Schistosoma*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania* (Los, *supra*), así como *Eimeria*, *Babesia*, *Theileria*, *Giardia*, *Leptomonas*, y *Entamoeba*. Ver McConville y Ferguson, *Biochemical J.* 294: 305-324, 1993; Pearce y Sher, *J.Immunol.* 142:979-984; Sauma *et al*, *Mol.Med.Biochem. Parasit.* 46:73-80, 1991; Hawn y Strand, *Mol. Med. Biochem. Parasitol.* 59:73-82, 1993.

Este mecanismo de anclaje de los componentes de la pared celular parece ser univésal para células eucarióticas que van desde la levadura a mamíferos.. La presencia de anclajes en *Giardia lamblia*, considerada una eucariota muy primitiva, sugiere que este tipo de anclaje se desarrolló primitivamente en los eucariotes. En concordancia con este descubrimiento, en la arqueobacteria, de un nuevo fosfoglicerolípido GlcNa1-6-*ml*o-inosito.P-dialkiglicerol (Nishihara *et al*, *J.Biol. Chem*, 267: 12432-12435, 1992), que es la base para la estructura de anclaje de GPI eucariótica más compleja que ha evolucionado. En los protozoos, el sistema de anclaje de GPI es usado más intensamente que en otros eucariotes, y no hay evidencias que las estructuras de anclaje de GPI sean más importantes para la supervivencia de los parásitos en huéspedes y mamíferos (McConville y Ferguson, *supra*) Por ejemplo, la frecuente pérdida de varias glicoproteínas de superficie puede ser un mecanismo para evitar ataques al sistema inmunológico.

El protozoario *Eimeria tenella* contiene estructuras de anclaje de fosfatidilinositol similares a las glicoproteínas/glicolípidos de *Trypanosoma brucei*. Se piensa que estos son importantes para la unión a membranas y subsiguientes infecciones. Ver Gurnett *et al*, *Mol. Med. Biochem. Parasitol.* 41: 177-186, 1990. Las estructuras de *Eimeria* son clivadas por una lipasa de tripanosoma y por *Bacillus thuringiensis* PI-PLC (Gurnett, *supra*). El tratamiento in-vivo de parásitos con PI-PLC. Si víalmente probado, ayudaría al sistema inmunológico del huésped e interferiría con la adhesión e infección por patógenos en el tracto digestivo. Las especies de *Eimeria* son un problema común y costoso para la industria avícola. Otro parásito protozoario, *Cryptosporidium parvum*, es también común y produce diarreas agudas en humanos y en muchos animales. The sporozoite protein, GP15/45/60, is predicted to be a GPI linked protein based on DNA sequence, and monoclonal antibodies reactive to this sporozoite protein inhibit infection

La proteína esporozoita GPI15/45/60, se cree que es una proteína ligada a GPI basada en una secuencia de ADN, y cuerpos monoclonales reactivos a esta proteína esporozoita inhiben la infección (Strong, W.B. *et al*, *Infection and Immunity* 68: 4117-4134, 2000; Cevallos, A.M. *et al*, *Infection and Immunity* 68: 4108-4116, 2000). Por consiguiente *C. parvum* es otro patógeno potencialmente tratado con PI-PLC.

La bacteria procarliótica no contiene glicoproteínas y carbohidratos estabilizados en la superficie por fosfatidilinositoles (McConville y Ferguson, *supra*), pero la PI-PLC podría reducir las infecciones bacterianas al interferir con el proceso de unión. El patógeno *E. Coli* y un número de patógenos bien conocidos *Enterobacteriaceae* expresan la Adhesin FimH bacteriana, una lectina de 29 kD de unión a manosa presente en la parte distal de las fimbrias. Abraham *et al*, *Nature*, 336: 682-684, 1988. Esta adhesina ha demostrado unirse a CD48 de las células mastocitales, una molécula de anclaje de GPI. Ver Malaviya *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8110-8115, 1999. La digestión *in vitro* con PI-PLC reduce la unión de una toxina de difteria unida a GPI (de *Corynebacterium diphtheria*) receptores de células NIH3T3 de murino. Ver Lanzrein *et al*, *EMBO J.* 15:725-734, 1996. Además, *Clostridium septicum* α toxin y *Aeromonas hydrophila* aerolisina se unen ambas a las paredes de las células por medio de anclajes C terminales de GPI y pueden ser separadas de las paredes de las células por medio de un tratamiento con PI-PLC. Ver Gordon *et al*, *J. Biol. Chem.* 274:27274-27280, 1999.

Se ha descrito el mecanismo de PI-PLC para la reducción del efecto de una infección bacteriana relacionado con la liberación del sitio de unión CD48 de los mastocitos del huésped. Además, la unión FimH en los mastocitos dispara una respuesta inflamatoria. Entonces, de acuerdo con la presente invención la reducción de los sitios de unión también debería reducir la inflamación, que se volvería excesiva y nociva para la propia salud del intestino ya que la respuesta inflamatoria comprende la liberación del factor de necrosis tumoral α (Malaviya, *supra*). Por consiguiente, por medio de este mecanismo de disminución de la inflamación y la subyacente secreción del factor de necrosis tumoral, el tratamiento con fosfolipasa, acorde con la presente invención, debería aliviar los síntomas que caracterizan estados tales como colon irritable, colitis y enfermedad de Crohn. Véase van Deventer. S.J., *Ann. Rheum. Dis.* 58(1): 1114-1120 (Noviembre, 1999).

La presente invención también será efectiva contra las infecciones virales, por su ruptura de la unión entre las partículas virales y las células que el virus podría infectar *in vivo*. A la luz del descubrimiento de los presentes inventores sobre la eficacia de la administración oral aquí descrita, es interesante ver que el pre-tratamiento del virus de influenza con fosfolipasa C, que causa una liberación de aproximadamente un 50 % del fosfolípido del virus, resultó en una disminución significativa en la infectividad de los embriones de pollo. Ver Mizutani y colaboradores., *Nature* 204:781-782, 1964. Por el contrario, el tratamiento de fibroblastos de embrión de pollo cultivados con fosfolipasa C, aislada de *Clostridium perfringens*, inhibió en forma marcada la infección subsiguiente de las células de Semliki Forest Virus. Ver Friedman and Pastan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59:1371-1378, 1968.

Mientras que el arte no comprende una significancia terapéutica de estos fenómenos, en retrospectiva, éstos son consistentes con un mecanismo que se piensa subyace en la presente invención, es decir, la ruptura de un ligando patógeno-superficie y/o su receptor afín sobre la membrana de la célula, perturbando la interacción que es necesaria para la infección.

Otro modo donde la presente invención puede ser efectiva en la prevención de las infecciones virales, es por la supresión de la unión de las proteínas virales de anclaje-GPI a las células susceptibles. Un ejemplo de una proteína viral de anclaje-GPI, que es sensible a la digestión PI-PLC es el Virus Dengue NS1 (proteína no estructural 1). Ver Jacobs y colaboradores., *FASEB J* 14:1603-1610, 2000. Existen varios ejemplos de proteínas de anclaje-GPI de célula huésped que se encuentran en los sitios de unión de los virus. Estos ejemplos incluyen al Echovirus humano 6, 7, 12 y 21 y el Enterovirus 70 que liga con la GPI-anclada CD55 (factor acelerante del decaimiento, DAF). Ver Clarkson y colaboradores., *J. Virology* 69: 5497-5501, 1995; Bergelson, y colaboradores., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6245-6248, 1994; y Karnauchow, y colaboradores., *J. Virology* 70: 5143-5152, 1996.

Las infecciones por Parvovirus Canino (CPV) se pueden bloquear *in vitro* por el pre-tratamiento de células de felino con PI-PLC. Ver Barbis and Parrish, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27: 401-407, 1994.

Algunos receptores de superficie celular, de importancia putativa en la iniciación de las infecciones, están unidos a las membranas por mecanismos diferentes de los

anclajes-GPI. Estos incluyen estructuras tales como ésteres de colesterol (Rostand and Esko, *J. Biol. Chem.* 268:24053-24059, 1993), los glicosfingolípidos no fosforilados (Karlsson, *Ann Rev. Biochem* 58: 309-350, 1989) y otros fosfolípidos tales como la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina. Ver Sylvester, *Infect. Immun.* 64:4060-4066, 1996.

Por lo tanto, por las razones establecidas arriba, apuntar a tales estructuras con esterasas, cerebrosidasas, carbohidrasas, y fosfolipasas apropiadas, activas en la liberación de estas estructuras de la superficie de la célula, debe tener efectos benéficos cuando se administra oralmente de acuerdo con la presente invención, para tratar infecciones del tracto digestivo.

Por virtud de la naturaleza universal de las proteínas de superficie ligadas a fosfatidilinositol y los hidratos de carbono en eucariotes, la metodología terapéutica de la presente invención, que implica la administración de enzima en forma aguda o profiláctica para romper una unión de anclaje de tales proteínas de superficie de la célula y/o hidratos de carbono, encontrará una amplia aplicación en el tratamiento de infecciones del tracto digestivo con protozoos, bacterias, hongos, o virales. Hasta aquí, un aspecto clave de la presente invención es la demostración de que una enzima, la cual no solo es activa en la ruptura de los componentes de superficie celular, se puede administrar oralmente como un agente antiinfección siendo efectivo *in vivo*. En forma notable, mientras una enzima representativa apropiada, PI-PLC, ha estado disponible desde 1960, esta aplicación no ha sido sugerida hasta el presente.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de una enzima, como se describió arriba, como un agente antiinfección efectivo en preparaciones de alimentación animal, las cuales tratan o aminoran el riesgo de infecciones del tracto digestivo en animales que consumen dicho alimento. Las preparaciones alimenticias que contienen una endo-1,4- α -D-mananasa son conocidas y algunos informes han propuesto una actividad antifúngica para la mananasa. Ver WO 00/21381 (PCT/EP99/07835) y Kudo y colaboradores., *Experientia* 48:227-281, 1992. En estas circunstancias, la mananasa está combinada con un antibiótico reconocido, aunque la posibilidad de usar la enzima en alimentaciones libres de antibiótico ha sido tratada en forma general. Adams, *Feed Mix (Special 2000)*, páginas 16 – 18.

Por lo tanto, en uno de sus aspectos, la presente invención está relacionada con

composiciones, incluyendo composiciones alimenticias, que contienen una enzima caracterizada por la actividad de partición arriba mencionada, que es diferente de la mananasa, o, en forma más específica, distinta de una endo-1,4- α -D-mananasa, como se distingue, por ejemplo, de una enzima dirigida al manano con una especificidad de ruptura diferente, como se describe en ENZYME NOMENCLATURE 1992 (Academic Press) (ver entradas 3.2.1.77, 3.2.1.78, 3.2.1.101, 3.2.1.106, 3.2.1.130, and 3.2.1.137).

Además, la presente invención contempla una composición que contiene tal enzima, incluyendo una mananasa, pero que no contiene otro agente antiinfección.

Así, de acuerdo con la presente invención, una preparación de enzima extracelular obtenida a partir de *Bacillus cereus* y con un contenido estándar de PI-PLC, se puede usar para obtener una mejora muy significativa en la ganancia de peso y la conversión del alimento en la presencia de una infección. Esto resulta inesperado porque el *B. Cereus* es un patógeno oportunista que causa comúnmente gastroenteritis por alimentos y endoftalmitis por *B. Cereus*.

Los estudios previos informan que la inyección de enzima de *B. anthracis* o *B. cereus* en conejos causa fosfasemia y hasta puede causar la muerte. Por ejemplo, ver Stein and Logan, *J. Bacteriol.* 85:369-381, 1963. Por lo tanto resulta sorprendente que una enzima extracelular de un patógeno que causa gastroenteritis tenga un efecto curativo, de acuerdo a la presente invención, en relación a una enfermedad causada por una infección bacteriana.

El *Bacillus cereus* elabora diferentes enzimas extracelulares activas sobre la membrana, y toxinas citolíticas, incluyendo la PI-PLC y la Cereolisina AB, compuesta de fosfolipasa C y esfingomielinasa. Ver Gilmore, *J. Bacteriol.* 171:744-753, 1989.

En la preparación de enzima anterior, se piensa que el ingrediente activo es una fosfolipasa C extracelular específica para el fosfatidilinositol [E.C. 3.1.4.10], producida el *B. Cereus*. El tratamiento con enzima de la presente invención actuó en forma efectiva como coccidiostático y antibiótico. Por lo tanto, es efectivo y comercialmente viable para el tratamiento de las infecciones del tracto digestivo, particularmente cuando las sustancias usadas en forma corrientes están prohibidas.

Si no están recubiertas, las enzimas son capaces de una desactivación irreversible por los fluidos gástricos del estómago. La Patente de los Estados Unidos No. 4.079.125 describe composiciones que contienen enzimas entéricas recubiertas

para su ingestión por mamíferos con deficiencias de enzimas. En forma sorprendente, la adición de PI-PLC sin recubrimiento a la alimentación animal resulta en un tratamiento efectivo a las infecciones patógenas.

Las composiciones de enzima de acuerdo con la presente invención están preferiblemente formuladas como composiciones orales sólidas secas o líquidas. Tales composiciones incluyen substancialmente estabilizantes, tales como un regulador de pH, un hidrato de carbono, y/o un glicol. Las composiciones de enzima secas, estables en almacenaje, que son apropiadas para el uso en la presente invención, para su incorporación, por ejemplo en tabletas o cápsulas, se pueden preparar por liofilización, secado por spray, o secado en lecho fluidizado, con un portador inerte o de hidrato de carbono, o usando técnicas evaporativas en conjunto con estabilizantes formadores de cristales. Ver Franks y colaboradores., *Biopharm.* 4:38-55, 1991. Otro enfoque involucra la precipitación por medio de una sal, por ejemplo, la precipitación por sulfato de amonio o precipitación por solvente, tal como por acetona, para la formación de un polvo seguido de un secado y la mezcla con un portador.

Ciertos hidratos de carbono, particularmente los monosacáridos, disacáridos, y oligosacáridos menores, son hidratos de carbono formadores de cristal importantes. Los hidratos de carbono ejemplo para usar como portadores son, entre otros, la xilosa, fructosa, glucosa, sorbitol y maltotriosa, como lo describe Frank, *supra*. La elección de un hidrato de carbono como portador se basa en la compatibilidad con la enzima, una baja tendencia higroscópica, y una curva de transición vítrea favorable. La trehalosa es particularmente apropiada como estabilizante para producir compuestos biológicos estables a temperatura ambiente. Ver Patente de los Estados Unidos No. 4,891,319; Roser, *Biopharm.* 4 (8):47-53, 1991; Colaco y colaboradores., *Bio/Technology* 10:1007-1011, 1992; Aldridge, *Genetic Engineering News*, March 15, 1995, pp 10-11.

Las enzimas de la presente invención, se pueden formular como líquidos, por ejemplo como jarabes con sorbitol o glicerol para bajar la actividad del agua y estabilizar la proteína. Tales soluciones son típicamente filtradas para esterilizarlas antes de su uso farmacéutico.

Como se dijo previamente, la presente invención está relacionada, en un aspecto, con la liberación de la enzima como un componente del alimento. Los alimentos están compuestos principalmente por un material granular, una fuente de

proteínas, vitaminas, aminoácidos y minerales. El material granular incluye típicamente maíz, sorgo, trigo, cebada o avena. La fuente de proteínas pueden ser, por ejemplo, alubias o guisantes. Como ejemplo de minerales, aminoácidos y vitaminas se incluyen la B12, A, ácido pantoténico, niacina, riboflavina, K, DL-metionina, L-lisina, cloruro de colina, ácido fólico, fosfato dicálcico, sulfonato de magnesio, sulfato de potasio, carbonato de calcio, cloruro de sodio, selenito de sodio, óxido manganeso, yodato de calcio, óxido de cobre, óxido de cinc, y esteroi animal D-activado.

Para usar en alimentos, una formulación de enzima líquida se puede preparar con agua salada, (e.g., NaCl, 15-18% p/p), o un jarabe, para bajar la actividad del agua y prevenir el crecimiento microbiano en el producto concentrado. También se pueden usar, para prevenir el daño potencial en el producto por el crecimiento microbiano, otros conservantes de uso en alimentos tales como benzoato de sodio, propilparabeno, sorbato de sodio o potasio, y palmitato de ascorbilo, los cuales son ejemplos de preservantes químicos. Ver Association of American Feed Control Officials, Inc., *Official Publication* 2000, Part 18, "Chemical Preservatives" pp 215-217, ISBN 1-878341-11-1. Estos conservantes se pueden aplicar a los alimentos luego del pastillado con una tecnología de rociado por spray con una gran dilución. Ver Fodge y colaboradores., *Feedstuffs*, September 29, 1997. Tales preparaciones líquidas pueden contener hidratos de carbono, estabilizantes tales como sorbitol o glicerol, si fueran compatibles. Los materiales que son componentes deseados de los alimentos, tales como otras enzimas u otras vitaminas que son lábiles al calor, pueden incluirse para mejorar la eficiencia.

En circunstancias donde el alimento se usa en forma de puré no pastillado (es decir sin tratamiento térmico), las enzimas para la presente invención se pueden aportar como un concentrado seco por adición al mezclador del alimento. Tales concentrados de enzima seca se preparan primero concentrando la preparación líquida de la enzima usando un 10Kd.NMWC u otro ultrafiltro apropiado para alcanzar un alto contenido porcentual de enzima, y luego mezclando con un portador muy seco, tal como polvos de maíz o de soja o con un material inerte o una sal insoluble aprobada para usar en alimentos. Ver *Official Publication, American Feed Control Officials, supra*, Part 582, "Substances generally regarded as safe in animal feeds".

Existe un número de técnicas disponibles para generar enzimas suficientemente

estables para tolerar el proceso de formación de pastillas en algunas fábricas de alimentos, reteniendo una actividad suficiente a bajas temperaturas para funcionar en el tracto digestivo. Es bien conocido que modificando la estructura de la proteína, primariamente a partir del cambio de la secuencia del código de ADN, o, en forma secundaria, a través de la modificación química, se pueden obtener enzimas más estables contra la desactivación. Una ilustración al respecto es el uso del entrecruzamiento químico de los cristales de enzima. Ver Collins y colaboradores., *Organic Process Research and Development* 2(6):400-408, 1998. Otro enfoque para aumentar la estabilidad de la enzima para la presente invención es cambiar los aminoácidos por mutagenesis del gen que codifica la enzima de interés, o la obtención de genes o partes de genes por barajado. Ver Cramer y colaboradores., *Nature* 391:288-291, 1998; Arnold, *Nature Biotechnol.* 16:617-618, 1998b; Zhao y colaboradores., *Nature Biotechnol.* 16:258-235, 1998; Zhao and Arnold, *Protein Eng.* 12:47-53, 1999. También es posible la mutación y selección por "evolución dirigida" de enzimas con las propiedades deseadas. Por ejemplo, ver Giver y colaboradores., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95:12809-12813, 1998; Liao y colaboradores., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83:576-580, 1986; Cherry y colaboradores., *Nature Biotechnol.* 17:379-384, 1999.

Ciertas modificaciones de proteínas, incluyendo la glicosilación, PEG-lación, y succinilación, también pueden mejorar la estabilidad y alterar el pH óptimo, características que pueden ser óptimas para la enzima a ser usada en la presente invención. Así, se pueden usar protocolos conocidos en este aspecto para hacer enzimas modificadas, para ensayar de acuerdo a los ejemplos, para medir cuán apropiadas son en la metodología de tratamiento de la invención.

Un método efectivo para la producción de PI-PLC proviene de la clonación del gen de *B. cereus* a *B. megaterium*. El sistema de expresión (Rygus and Hillen, *Appl. Microbiol. Bacteriol.* 35:594-599, 1991) hace uso de elementos del regulon xilosa del *Bacillus megaterium* (Rygus y colaboradores., *Arch. Microbiol.* 155:535-542, 1991), y estuvo disponible comercialmente en BIO101 Corp. (Vista, California). Se realizó una fusión entre la secuencia de codificación del gen conductor y los primeros tres aminoácidos del gen *xylA* de *B. megaterium* en un plásmido estabilizado con resistencia tetraciclina y regulado por un represor de respuesta de xilosa. Las cepas de este tipo, con expresión amplificada, proporcionan medios posibles para producir en forma

comercial cantidades útiles de PI-PLC para incorporar a la alimentación animal de acuerdo con la presente invención.

Algunos aislados de *B. cereus* producen antibióticos tales como la tunicamicina. Ver Kamogashira y colaboradores., *Agric. Biol. Chem.* 52:859-861, 1988. Otro aislado de *Bacillus cereus* (ATCC 53522), está descrito en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,877,738 y 5,049,379 como agente de control biológico para prevenir la podredumbre de la plántula y de la raíz en los vegetales. Se cree que este efecto resulta de la acción de dos antibióticos, denominados "Zwittermicina", un aminopolioil lineal de 396 Dalton, y el "Antibiótico B", un amino glicósido. En los ejemplos descritos en detalle abajo se eliminó la posibilidad de involucrar estos dos antibióticos excluyendo, en la preparación de enzima, a los antibióticos de bajo peso molecular posibles.

En particular, un caldo de fermentación libre de células se concentró por medio de una membrana con un corte de peso molecular de 10 Kd. El concentrado, que contiene proteínas mayores de 10 Kd fue usado para un proceso posterior. Los antibióticos de bajo peso molecular, tales como aquellos descritos por Handelsman, *supra*, pasarían a través de este filtro. Además, se empleó la precipitación con sulfato de amonio para precipitar las proteínas de alto peso molecular dejando en solución los materiales de bajo peso molecular. Luego de redissolver el precipitado con sulfato de amonio, la solución de enzima resultante se dializó contra un buffer, otro tratamiento que separa los antibióticos de bajo peso molecular. Finalmente, la proteína se precipitó una segunda vez, nuevamente con sulfato de amonio, para dejar atrás en la solución cualquier compuesto de bajo peso molecular remanente.

El uso combinado de estos cuatro tratamientos actúa fuertemente contra la posibilidad de que el efecto de antibiótico observado se deba a un antibiótico de bajo peso molecular, producido por ATCC 6464 o ATCC 7004.

El caldo de fermentación también se ensayó con una cepa de *E. Coli* para comprobar la presencia de antibióticos, pero no se detectó actividad de antibiótico.

Además, la presente invención se describe abajo por referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos..

EJEMPLO 1 Preparación de cultivos madre congelados de *Bacillus cereus*, ATCC 6464 y ATCC 7004

Se abrieron e inocularon viales con células liofilizadas de la cepa ATCC en un medio de siembra compuesto por Amberferm 4015 (Red Star) 10 g/l, Amberex 695 (Red Star) 5 g/l y cloruro de sodio 5 g/l, pH 7,0 y se cultivaron a 30 °C. El cultivo inicial se plaquea sobre placas de agar con caldo LB y una sola de las colonias resultantes se volvió a inocular en 20 ml de medio de siembra en un frasco con deflectores de 250 ml (Bellco) y se cultivó bajo agitación a 30° C. Cuando la densidad del cultivo alcanzó una lectura de DO_{600} de 1,5, se agregó glicerol estéril hasta aproximadamente un 10 % v/v y se congelaron los viales que contenían 1,8 ml de cultivo a -80 °C.

EJEMPLO 2 Cultivo de formas aleladas de ATCC 6464 y ATCC 7004 de *Bacillus cereus* para la producción de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol

En dos fermentadores Biostat C, de 30 litros cada uno, se introdujeron lotes de medio con la siguiente composición, en agua de canilla: Caldo Nutritivo N° 2 (Oxoid) 25 g/l, Triptona (Difco) a 10 g/l, extracto de levadura (Difco) 10 g/l, y un agente antiespumante Mazu DP10P Mod11 (BASF) 0,1 ml por litro. El volumen inicial del lote era de 9,5 l y el caldo se esterilizó a 121 °C durante 40 minutos. El pH inicial se ajustó en 7,0 con amoníaco gaseoso después de la esterilización.

Se prepararon cultivos de siembra en 500 ml del mismo medio en frasco con deflectores y agitador de 4 litros equipados con un aspirador (Bellco) y tubos de silicona con conectores para la inoculación. Los frascos se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 50 minutos antes de la inoculación con 1,8 ml del cultivo madre congelado preparado a partir del envío de ATCC (EJEMPLO 1). Los cultivos de los frascos de siembra se cultivaron a 30 °C durante 5,5 horas con agitación a 200 RPM en un incubador con agitación de ambiente controlado (NBS modelo G-25). Antes de la inoculación, el cultivo de ATCC 7004 presentaba una DO_{600} de 1,53 y pH 6,58. El cultivo de ATCC 6464 tenía una DO_{600} de 1,28 y pH 6,79.

Los 500 ml de cultivo de siembra se inocularon en los fermentadores de 30 l y se hicieron funcionar bajo las siguientes condiciones: temperatura 30 °C, mezclado 600 RPM, flujo de aire 10 litros por minuto y presión 0,5 Bar. La DO_{600} del cultivo inicial fue de 0,81. A las seis horas, se detuvo la fermentación con una DO_{600} final de 22,1 (ATCC 7004) y una DO_{600} de 24,2 (ATCC 6464). Las fermentaciones se corrieron sin un control de pH y el pH final era de 8,17 (ATCC 7004) y pH 8,13 (ATCC 6464). Se retiró l caldo de los fermentadores y se enfrió a 8 °C antes de su posterior procesamiento.

Los fermentadores se corrieron una segunda vez utilizando un procedimiento virtualmente idéntico con ambas formas aisladas de ATCC de *Bacillus cereus*. En este caso, los cultivos de siembra se usaron durante seis horas con una DO₆₀₀ de 2,86 (ATCC 7004) y una DO₆₀₀ de 1,98 (ATCC 6464), y un valor de pH de 6,69 (ATCC 7004) y pH 6,65 (ATCC 6464). Las fermentaciones principales se corrieron durante 6,5 horas con una DO₆₀₀ final de 35,9 (ATCC 7004) y una DO₆₀₀ de 33,6 (ATCC 6464). El pH final fue de 8,38 (ATCC 7004) y pH 8,47 (ATCC 6464) en el momento del enfriamiento.

EJEMPLO 3 Separación de células por filtración y concentración de la enzima PI-PLC

Se separaron y lavaron las células de cada uno de los cuatro lotes de fermentación que se describieron en el EJEMPLO 2 usando dos filtros de fibra hueca de 3 mm, con un corte de peso molecular de 500.000 (500 Kd NMWC) A/G Technology (UFP-500-K-6A) unidos en el extremo. El caldo enfriado se bombeó a través de los filtros con una bomba peristáltica a razón de 2 litros por minuto aproximadamente, con reciclaje hacia el reservorio de retención. El permeato que contenía la enzima se recogió en un reservorio enfriado sobre hielo. El volumen del caldo inicial que contenía células de aproximadamente 9 litros se concentró hasta un volumen de aproximadamente 2 litros, en cuyo momento se comenzó una filtración con diálisis con Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. Después de recoger un volumen total de aproximadamente 14 litros de permeato, se terminó el lavado de las células.

El permeato 500 Kd (aproximadamente 14 litros de cada fermentador) se concentró con dos filtros de fibra hueca de 0,5 mm con un corte de peso molecular de 10.000 (10 Kd) A/G Technology (UFP-10-C-4XTCA) unidos en el extremo. Se utilizó el mismo método de bombeo con reciclaje del concentrado, excepto que se descartó el permeato. El concentrado final con un volumen de 500 ml aproximadamente de cada fermentador se guardó para el siguiente paso de procesamiento.

EJEMPLO 4 Purificación y concentración adicional de la enzima PI-PLC

El concentrado ultrafiltrado 10 Kd (EJEMPLO 3) derivado de cada una de las fermentaciones de *Bacillus cereus* se ajustó en un 80% de saturación con sulfato de amoni y se mezcló sobre hielo durante 60 minutos. La solución se centrifugó durante 15 minutos a 6000 RPM en un rotor Sorvall GSA. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en un volumen mínimo de Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,2 mM (pH

7,5) y luego fue sometido a diálisis en frío contra el mismo buffer.

Las proteínas presentes en cada concentrado se midieron usando un ensayo de unión con colorante BioRad y se midió el nivel de PI-PLC (Hendrickson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Letters* 1: 619-622, 1991) usando un método de detección basado en HPLC y un sustrato fluorescente (Molecular Probes, Inc., P-3764, *mio*-inositol-1-fosfato de 1-pirenbutilo, sal de litio). En la siguiente Tabla 1 se resumen los datos del ensayo y se predice la pureza y enzima total aproximada, sobre una base de pureza, obtenida para cada una de las cuatro preparaciones. Las preparaciones de enzima se guardaron congelados a -20°C hasta su procesamiento posterior.

Tabla 1. Resumen del análisis de las preparaciones de enzima cruda PI-PLC

Preparación de enzima	N° cepa ATCC	Proteína Mg/l	Actividad específica U/mg ¹	Proteína total en la preparación, mg	% estimado de pureza ²	PI-PLC total en mg, en base puro
1	7004	1,88	1,75	325	2,92	9,49
2	6484	1,44	0,52	345	0,867	2,99
3	7004	1,35	4,42	208	7,38	15,3
4	6484	2,08	1,72	256	1,95	5,00

¹U = unidad = 1 micromol/minuto.

²Basado en la suposición que la proteína 100% pura tiene una actividad específica de 60 U/mg (Hendrickson, *supra*).

EJEMPLO 5 Agrupación y concentración de preparaciones de enzima antes de incorporarlas al alimento para animales

Las preparaciones de enzima 1, 2, 3 y 4 se agruparon, con un volumen total de 675 ml. Se agregó lentamente sulfato de amonio (492 g) y la solución se mezcló sobre hielo durante varios minutos. La solución se centrifugó para recoger el precipitado. La fracción del pellet se disolvió en una cantidad mínima de buffer fosfato 20 mM (pH 7,0).

El volumen de la solución resultante era de 70,9 ml, con una densidad de 1.057 gramos/cc. La concentración de proteína medida era de aproximadamente 25,5 mg/ml. Se midió la actividad PI-PLC y era de aproximadamente 1,13 U/mg con una pureza estimada de PI-PLC en 1,88%. La solución se congeló a -20°C en su totalidad y se descongeló y utilizó en un tratamiento uniforme con 200 libras de alimento para pollos.

EJEMPLO 6 Clonación y expresión del gen de PI-PLC de *Bacillus cereus* en *Bacillus megaterium*

El gen que codifica la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) ha sido secuenciado. Véase Kuppe *et al.*, *J. Bacteriol.* 171: 6077-6083, 1989. El gen PI-PLC se clonó de ADN cromosómico de *Bacillus cereus* (ATCC 6464) mediante tecnología de PCR. Se empleó un vector de expresión, pMEGA (BIO 101, Vista, CA), para *Bacillus megaterium*. Se diseñaron dos cebadores para PCR, a saber, 5'-GACTAGTAATAAGAAGTTAATTTTG-3' (cebador 1) y 5'-CGGGATCCATATTGTTGGTTATTGG-3' (cebador 2) con un sitio *SpeI* en el cebador 1 y un sitio *BamHI* en el cebador 2.

El gen PI-PLC amplificado por PCR se ligó en el sitio *SpeI*-*BamHI* del pMEGA y se obtuvo el plásmido pCG682. La proteína PI-PLC se fusionó con los primeros tres aminoácidos del producto genético *xyIA* en el sitio *SpeI* en el vector de expresión. La expresión del gen PI-PLC estaba bajo la regulación del promotor *xyIA*. Se utilizó la fermentación del frasco con agitación para evaluar la producción de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol en *Bacillus megaterium*. Se inoculó caldo LB con tetraciclina 10 µg/ml (20 ml) con 0,2 ml de cultivo de siembra y se incubó en un agitador a 37 °C a 250 r.p.m. A una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5, se agregó D-(+)-xilosa 5 g/l para inducir al promotor *xyIA*. Después de tres horas, se cosechó el sobrenadante por centrifugación. La actividad fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol se midió mediante un método con sustrato fluorescente (Hendrickson, *et al.*, *Biochemistry* 31: 12169-12172, 1992; Hendrickson, *Anal. Biochem.* 219: 1-8, 1994), usando el sustrato 1-prenbutil-*mio*-inositol-1-fosfato (Molecular Probes, Eugene, O) y mediante detección con HPLC.

Tabla 2. Medición de la expresión PI-PLC

Material de prueba	Adición de xilosa	Actividad específica (unidad/mg proteína)
Fraciones de lisado celular		
<i>B. megaterium</i> /pCG682	-	0
<i>B. megaterium</i> /pCG682	+	0,436
<i>B. megaterium</i> /pCG682	-	0
<i>B. megaterium</i> /pCG682	+	0,365
Fraciones del caldo de fermentación		
<i>B. megaterium</i> /pCG682	-	0

<i>B. megaterium</i> lpCG682	+	4,087
<i>B. megaterium</i> lpCG682	-	0
<i>B. megaterium</i> lpCG682	+	4,56

Estos datos muestran que la mayor parte de PI-PLC es extracelular y que la expresión solamente tiene lugar después de la adición de D(+)xilosa (Tabla 2). Se estimó que esta cepa recombinante tiene por lo menos 15 veces la productividad (mg/VDO) del promedio de la cepa salvaje, cultivada como en el EJEMPLO 2.

EJEMPLO 7 Fermentación de *B. megaterium* para la producción de PI-PLC

El material *B. megaterium*lpCG682 descrito en el Ejemplo 6 se utilizó para la producción de PI-PLC por fermentación. El medio (PM) para las etapas de siembra y fermentación contenía inicialmente Amberferm 4015 (Universal Flavors Bionutrients, Indianapolis, IN) 20 g/l, extracto de levadura Amberex 695 10 g/l (Universal Flavors Bionutrients, Indianapolis, IN), NZ Case Plus (Quest International, Hoffman Estates, IL) 10 g/l, K₂HPO₄ 2,0 g/l, MgSO₄ 0,1 g/l, ⁷H₂O y glucosa 2,0 g/l y tetraciclina 12,5 mg/l. El pH se ajustó en 7,5.

La etapa de siembra (500 ml en un frasco con deflectores de 2,8 l) se inició por inoculación con un vial de siembra congelado y agitación a 250 RPM a 30 °C. Los viales de siembra se prepararon por adición de una sola colonia cultivada sobre una placa de agar LB en 20 ml de PM en un frasco con agitación de 250 ml. Después de dejarlo crecer hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,0 a 30 °C, se agregaron 5 ml de glicerol estéril 50%, se mezcló y la solución se distribuyó en viales de plástico estériles de 2 ml y se congeló a -60 °C.

Los frascos de 500 ml con la siembra se usaron después del crecimiento hasta una DO₆₀₀ de 1,2 a 1,8 aproximadamente después de 9 horas de agitación. Se usaron dos frascos para sembrar un fermentador de 60 l lleno con 50 l del mismo medio esterilizado por vapor. La tetraciclina se filtró estéril (filtro de 0,2 micrones) como una solución 1% en etanol 40% y se agregó después de esterilización y enfriamiento a 30 °C. En los fermentadores, también se agregó el antiespumante Mazu DF10PMDO11 (BASF, Gurnee, IL) 0,1 ml/L en el lote inicial y se agregó según necesidad para controlar la formación de espuma durante las fermentaciones. Las condiciones de funcionamiento para la primera siembra del fermentador fueron como sigue: presión 0,5 a 2,5 psig; temperatura 30 °C ± 0,5 °C; agitación 200 a 450 RPM; inyección de aire de

25 a 50 SLPM; oxígeno disuelto $\geq 25\%$. El pH se controló en valores de 6,9 a 8,1 usando H_3PO_4 21,25% o NaOH 5N. cuando la DO_{600} alcanzó un valor de 8-10, los contenidos se usaron para sembrar un fermentador de 600 l que contenía 425 l del mismo medio.

Las condiciones de funcionamiento para el fermentador de producción de 600 l fueron como sigue: presión 0,5 a 2,5 psig; temperatura $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$; agitación 100 a 300 RPM; inyección de aire de 250 a 500 SLPM; oxígeno disuelto $\geq 25\%$. El pH se controló en valores de 6,9 a 8,1 usando H_3PO_4 21,25% o NaOH 5N. Cuando se había acabado la glucosa inicial a las 5 horas y con una DO_{600} de 17 aproximadamente, se inició una alimentación de xilosa (pre-esterilizada por autoclave a $121\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos y compuesto de 10 kg de D-(+)-xilosa y 10 litros de agua). La D-xilosa se obtuvo de Varsal Instruments, New Jersey. La alimentación se comenzó inicialmente a razón de 25 ml/minuto y se mantuvo así durante 1,5 horas, luego se incrementó a 43 ml/minuto. La segunda velocidad se mantuvo hasta que los 22,5 litros de la alimentación de xilosa se habían consumido. El oxígeno disuelto se mantuvo incrementando la inyección de aire en incrementos de 50 SLPM hasta 500 SLPM. Cuando el valor del flujo de aire era de 500 SLPM, se incrementaron las RPM. La fermentación terminó una vez transcurridas 20 horas. A las 17 horas, se habían acumulado 7440 U/L (unidades según se definieron en el Ejemplo 4).

El caldo de fermentación se cosechó usando un equipo Pall Filtron C10 y cuatro módulos CellFlo Microgon ($0,2\text{ }\mu\text{m}$ de poro de membrana, fibras de 1 mm de diámetro con $3,3\text{ m}^2$). El permeato de la membrana de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ se concentró usando un equipo LT100 Pall Filtron con una membrana para ultrafiltración 10K, tamaño 85 de AG/Technologies. El concentrado final era de 10 litros en volumen y se congeló a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

EJEMPLO 8 El caldo de fermentación de *Bacillus cereus* no contenía actividad antibiótica

La fermentación con *Bacillus cereus* (ATCC 7004) se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en el EJEMPLO 2, excepto que el volumen inicial se incrementó hasta 20 litros. Se efectuó una prueba para comprobar la presencia de antibióticos con MG1655 de *E. coli* como cepa de prueba, donde el caldo de fermentación final o PI-PLC parcialmente purificado se preparó de acuerdo con el

método descrito en los EJEMPLOS 3-5. La prueba se realizó como un ensayo en placa cilíndrica. Véase Brantner, *Pharmazie* 52(1): 34-40, 1997. No se observó ninguna zona clara indicadora de actividad antibiótica alrededor de los cilindros que contenían las muestras de enzima.

EJEMPLO 9 Prueba de PI-PLC en un ensayo de fluorescencia con placas para microtitulación

Se desarrolló una prueba bioquímica para la PI-PLC mejorada con respecto al método de Hendrickson *et al.* (*supra*) usado en el Ejemplo 4. El sustrato 4-metilumbeliferil-*mio*-inositol-1-fosfato, sal N-metil-morfolina, se obtuvo de Biosynth (Naperville, Illinois). Las reacciones fueron monitoreadas con un lector de fluorescencia de placas para microtitulación Flourescan II obtenido de MTX Lab Systems (Vienna, Virginia). Para los ensayos con el caldo de fermentación o los concentrados de enzima, se emplearon reacciones de 200 μ l en placas para microtitulación de plástico negro compuestas de Tris-Cl, 10 mM 0,16% deoxicolato, 4-metilumbeliferil-*mio*-inositol-1-fosfato 0,8 mM, sal N-metil-morfolina, y enzima diluida a pH 8,0. Si fuera necesario, se pueden efectuar diluciones de la enzima en solución BSA 0,1 % en agua. Se efectuó un seguimiento de la reacción a 37 °C durante 30 minutos, con lecturas a intervalos de 2 minutos para observar la liberación de metilumbeliferona del sustrato con excitación a 350 nm y emisión a 450 nm.

Se utilizó la correlación de unidades de fluorescencia a micromoles de metilumbeliferona para calcular las unidades (micromoles por minuto) formadas por cantidad de solución de enzima agregada. La reacción a pH 8,0 es un compromiso entre el pH óptimo para la enzima y el pH para la fluorescencia máxima de metilumbeliferona (pH 10). Además, a pH 9,0 y mayor, la velocidad de liberación no enzimática de metilumbeliferona se vuelve significativa. Bajo esta condición de ensayo, la actividad específica (unidades/mg) es aproximadamente 39,3 veces mayor que cuando se utiliza el método de Hendrickson *et al.* (*supra*). A los fines de evaluar la eficacia en experimentos con alimento para animales, las unidades medidas usando este ensayo se convirtieron en las unidades Hendrickson equivalentes con el fin de facilitar la comparación con las primeras pruebas efectuadas antes de utilizar este ensayo.

EJEMPLO 10 Ensayo de PI-PLC agregado a dosis efectivas en alimento para

animales

Se diseñó una variación más sensible del ensayo basado en 4-metilumbeliferil-mio-inositol-1-fosfato, sal N-metil-morfolina, de PI-PLC (Ejemplo 9) con el fin de medir la enzima después de su adición a un alimento para animales, comprendiendo un valor de pH para el ensayo y otro valor de pH para medir la fluorescencia. La enzima se extrajo de los materiales de prueba de alimento pesando 4 g de alimento y agregándolo a 20 ml de Tris-Cl 10 mM (pH 7,5) con deoxicolato 0,1 % para elaborar un alimento con 20 g/l. La lechada se agitó en un agitador NBS G-25 (New Brunswick Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente y a 250 RPM. La lechada se centrifugó a 13.000 RPM en una microcentrífuga IEC Micromax con tubos para microcentrífuga de 1,5 ml. Se efectuaron las diluciones apropiadas de los extractos en BSA 0,1% (albúmina de suero bovino). No se diluyeron las muestras de los alimentos con aplicaciones de 10 U/libra.

Primer paso de reacción—Los tubos se dispusieron de la siguiente manera. También se deben incluir estándares con una dilución 1:100 o 1:200 de 0,12 U/ml PI-PLC (unidad definida como en el Ejemplo 4) y un blanco. Las reacciones de prueba se deben cubrir con papel de aluminio con el fin de proteger al sustrato de la luz.

20 µl de Tris-HCl, 0,10 M, pH 6,0

40 µl de deoxicolato (0,8%)

40 µl de sustrato PI-PLC (4 mM)

100 µL de enzima _____

200 µl /tubo Reacción total a 25 °C

Se tomaron muestras en dos momentos (30 min y 60 min) con la separación de 0,10 ml de cada reacción. Las alícuotas se calentaron a 65 °C durante 15 minutos para detener la reacción enzimática y se enfriaron sobre hielo. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12.000 RPM en una microcentrífuga durante 5 minutos.

Lectura del fluorómetro— Se agregaron 120 µl de buffer Tris 0,10 M (pH 8,0). El buffer Tris se agregó a las cavidades de microtitulación de una placa de plástico negro, luego se agregaron 80 µl de muestra de reacción antes de efectuar la lectura como se describió en el Ejemplo 7. Se substrajeron los niveles de control basal. Se calculó la velocidad de producción de unidades de fluorescencia por minuto. Las unidades de fluorescencia se convirtieron en micromoles de producto de reacción y se calcularon las unidades de enzima extraídos por libra original de alimento.

EJEMPLO 11 Pruebas de Alimentación de Pollos con Ataques de Patógenos

I. Prueba I de Alimentación de Pollos Parrilleros

Se llevó a cabo una primera prueba de alimentación comenzando con pollos parrilleros de un día de edad. Se preparó una dieta típica uniforme para pollos de "alimento inicial" diseñada para satisfacer o exceder los Requerimientos de Nutrientes para Aves de Corral del Consejo Nacional de Investigación (9ª edición, 1994), y se la administró en forma de mezcla de granos. Se dividieron los pollos en jaulas (con un espacio de piso de 12 pulgadas x 24 pulgadas) en cuatro grupos de tratamiento, estando cada grupo de tratamiento repetido cuatro veces y con una réplica de seis aves por jaula (TABLA 3). Se proveyeron agua y alimento ad libitum a lo largo del período de prueba de 21 días. Se usó un diseño de bloques al azar para localizar los pollos en las jaulas y las jaulas en los grupos de tratamiento. Todas las jaulas y los suministradores de alimento y de agua se esterilizaron antes del comienzo de la prueba. La iluminación fue constante (24 horas por día) con lámparas incandescentes. Se determinaron los pesos corporales en el día uno y en el día 21. Se midió el consumo de alimento en el día 21.

El día 5, se infectaron todos los pollos con 200000 oocistos por ave de *Eimeria acervulina* mediante suministro oral. El día 7, se infectaron adicionalmente todas las aves con 500000 *Clostridium perfringens* a través del suministro de agua. En el control negativo (T1), no existió tratamiento para la infección. En el control positivo (T2), se agregaron un coccidiostático y un antibiótico al alimento. Este fue un tratamiento anti – coccidiosis Sacox (salinomina a 60 g/tonelada) y con el antibiótico BMD-50 (50 g/tonelada). Para los grupos de tratamiento T3 y T4, se usó el alimento tratado con la enzima PI-PLC tipo salvaje (alrededor de 0,34 gramos de PI-PLC sobre una base pura) al comienzo del día cinco, en el momento del suministro oral de *Eimeria acervulina*. Todo el alimento se preparó en un lote uniforme y luego se lo dividió para el agregado de antibiótico (Grupo de Prueba T2) o de enzima (Grupos de Prueba T3 y T4). Los resultados del análisis de peso de las aves se presentan en la Tabla 4 y se presentan los cálculos de alimento/ganancia en la Tabla 5.

Tabla 3. Tratamiento Experimental de Pollos parrilleros para la Prueba I de Alimentación de Pollos Parrilleros

Grupo de Prueba #	Descripción de la Prueba	Material de Prueba	Réplicas	Pollos por réplica
T1	Control negativo	Ninguno	4	6
T2	Control Positivo	Tratamiento con coccidiostático y salinomicina	4	6
T3	PI-PLC Tipo salvaje	0,34 g de enzima /tonelada (base pura)	4	6
T4	PI-PLC Tipo salvaje	0,34 g enzima/tonelada (base pura)	4	6

Tabla 4. Peso corporal promedio (g) a los 21 Días

Réplica	Tratamiento			
	T1	T2	T3	T4
1	323,00	341,67	377,83	366,67
2	326,67	321,33	383,83	361,17
3	299,33	337,33	378,83	361,33
4	211,67	254,00	374,33	403,40
Media	290,17	313,58	378,71	373,14
STAT	b	b	a	a
SD	46,52	35,22	3,40	17,61
CV	16,03	11,23	0,90	4,72

Tabla 5. Conversión de Alimento Promedio (0-21 días) Corregida por el Peso de la Mortalidad de las Aves

Réplica	Tratamiento			
	T1	T2	T3	T4
1	1,488	1,589	1,407	1,445
2	1,562	1,532	1,423	1,421
3	1,524	1,562	1,432	1,408
4	1,760	1,482	1,438	1,404
Media	1,583	1,531	1,425	1,419
STAT	b	b	a	a
SD	0,11	0,04	0,01	0,02
CV	6,68	2,78	0,82	1,17

En ambas tablas precedentes, las medias en una fila sin una letra en común son significativamente diferentes ($P<0,05$) para la prueba de significación de Duncan.

II. Prueba II de Alimentación de Pollos Parrilleros

Se llevó a cabo una segunda prueba de alimentación comenzando con pollos parrilleros macho de un día de edad. Las dietas de base se diseñaron para exceder los Requerimientos de Nutrientes para Aves de Corral del Consejo Nacional de Investigación (9ª edición, 1994) y se prepararon como mezcla de granos para asegurar su uniformidad. El estudio se hizo en jaulas en batería al azar, sobre una base ciega, para evaluar el efecto de la PI-PLC hecha a partir de la fuente natural, *Bacillus cereus* (PI-PLC tipo salvaje), o de un *Bacillus megaterium* recombinante sobre el desempeño de los pollos parrilleros macho a los 21 días de edad. La fuente natural contiene también otras enzimas extracelulares, pero la PI-PLC preparada a partir de *Bacillus megaterium* está altamente purificada y se la purificó adicionalmente por ultrafiltración usando una membrana 30-Kd NMWC. Las aves se atacaron a los 8 días de edad con coccidios de aves (200000 oocistos de *E*

acervulina por ave vía el agua de la bebida) y a los 10 días de edad con *Clostridium perfringens* (100000 por ave vía el agua de la bebida). Cada uno de los nueve tratamientos (Tabla 6) tuvo 10 réplicas o jaulas. Cada jaula contenía 6 pollos parrilleros Cobb x Cobb macho vacunados (Newcastle-Bronchitis, Mareks) con un espacio de 0,40 pies²/ave. Las aves muertas, al se las hallaba, no se reemplazaban hasta el 8° día. El alimento se administró como mezcla de granos o sobre una base ad libitum a lo largo del período completo de prueba (del día 0 al día 21).

Se administró una dieta basal común y sin tratar, que no contenía antibióticos, a todas las aves en los días 0 a 7. A partir de allí, se administraron nueve dietas tratadas, bajo la forma de mezclas de granos, desde los 8 a los 21 días de edad. El alimento basal fue un alimento inicial típico para pollos parrilleros que contenía 22% de proteína cruda con un ME (contenido de energía metabolizable) de 1400 kcal/lb.

Tabla 6. Tratamiento Experimental para la Prueba II de Alimentación de Pollos Parrilleros

Tratamiento	Artículo de prueba	Ataque infeccioso ¹
T1	NINGUNO	+
T2	Disalclisto de Bacitracin metileno (BMD, 50g/tonelada) y Salinomicina (Sacox, 60 g/tonelada)	+
T3	PI-PLC recombinante (3 U/lb) producida por <i>Bacillus megaterium</i>	+
T4	PI-PLC recombinante (10 U/lb) producida por <i>Bacillus megaterium</i>	+
T5	PI-PLC recombinante (30 U/lb) producida por <i>Bacillus megaterium</i>	+
T6	PI-PLC recombinante (90 U/lb) producida por <i>Bacillus megaterium</i>	+
T7	PI-PLC (10 U/lb) y otras enzimas extracelulares de <i>Bacillus cereus</i>	+
T8	NINGUNO	NINGUNO
T9	PI-PLC recombinante (90 U/lb) producida por <i>Bacillus megaterium</i>	NINGUNO

1200000 oocistos de *E. acervulina*, los cuales fueron administrados vía el agua de la bebida a los 7 días y a los 10 días de edad con 100000 bacterias de *Clostridium perfringens* por ave vía el agua de la bebida.

Tabla 7. Prueba II de Alimentación de Pollos Parrileros

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
-------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Infección	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Medicación	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Tipo de PI-PLC			Rac ¹	Rac ¹	Rac ¹	Rac ¹	Wt ²		Rac ¹
U/lb Destino	-	-	3	10	30	90	10	-	90
Ave Medida									
U/lb	0,36	0,32	0,32 ³	0,71	1,74	5,96	2,46	0,12	5,94
Ganancia de peso a los 8-21 Días	309,7	333,83	323,24	324,78	320,64	328,29	298,98	326,12	338,8
	cd	ab	bc	ab	bc	ab	D	Ab	a
Conversión de Alimento a los 8-21 Días (Corregida)									
	1,858	1,642	1,702	1,732	1,699	1,739	1,876	1,651	1,650
	c	a	ab	b	ab	b	C	A	a
Puntaje Promedio de Lesión Intestinal	1,447	0,833	1,120	1,133	0,842	0,808	1,267	0,983	0,847
	d	A	bc	bc	a	a	Cd	ab	a

¹PI-PLC recombinante producida por *Bacillus megaterium*.

²PI-PLC tipo salvaje de *Bacillus cereus*.

³El nivel de agregado de PI-PLC fue demasiado bajo como para ser extraída en forma efectiva y mediada en este experimento, apareciendo como nivel basal.

s En la primera prueba, cuando se administró la infección bacteriana a través del agua de la bebida, (Ejemplo 11-I), de acuerdo con todos los criterios, la PI-PLC

tipo salvaje producida por *Bacillus cereus* funcionó tan bien o mejor que el tratamiento con Salinomicina + BMD (Tablas 4-5). En una prueba posterior indicada previamente, con una PI-PLC recombinante (Ejemplo 11-II, Tabla 7), la PI-PLC agregada a concentraciones variables mostró un efecto dependiente de la dosis de disminuir la puntuación de la lesión intestinal y la conversión de alimento (T3-T8), y de aumentar la ganancia de peso. Además, el tratamiento con PI-PLC recombinante, a 90 U/lb, en ausencia de tratamiento con Salinomicina + BMD, disminuyó la puntuación de la lesión intestinal y tuvo un efecto positivo sobre la conversión de alimento y la ganancia de peso. La PI-PLC tipo salvaje de *Bacillus cereus* no funcionó tan efectivamente como su contraparte recombinante a la misma concentración (10U/lb) en esta prueba.

III. Prueba III de Alimentación de Pollos Parrilleros con las enzimas PI-PLC y endo -1,4- β - D - mananasa

Se llevó a cabo un estudio en jaulas en batería Petersime al azar para evaluar el efecto de la PI-PLC y la endo -1,4- β - D - mananasa (Patente de los EEUU N° 5429828) sobre el desempeño de los pollos parrilleros macho criados hasta los 21 días de edad. Las aves se atacaron a los 8 días de edad con coccidios de aves (75000 oocistos de *E acervulina* y 1250 oocistos de *E maxima* por ave mediante administración oral) y a los 11, 12 y 13 días de edad con *Clostridium perfringens* (administración oral cada día con 1 mL de líquido de un cultivo fresco que contenía 10^8 cfu/mL). Cada tratamiento (Tabla 8) consistió en 8 réplicas de jaulas y cada jaula albergó 14 pollos parrilleros macho Cobb x Cobb vacunados con Mareks (reducidos a 10 el Día 14, ya que se retiraron 4 aves de cada jaula y se evaluaron en ellas las lesiones) con un espacio de 0,38 pies²/ave. Se retiraron las aves muertas de las jaulas cuando se las detectó, y no se las reemplazó. El alimento se suministró bajo la forma de una mezcla de granos sobre una base ad libitum a lo largo del período de prueba completo (día 0 al día 21).

Las dietas se suministraron como mezcla de granos en los días 0-21 de edad. El alimento basal fue un alimento inicial típico para pollos parrilleros que contenía 22% de proteínas crudas, con una ME de 1400 kcal/lb.

Tabla 8. Tratamientos Experimentales en la Prueba II de Alimentación de Pollos Parrileros

Tratamiento	Medicación	Ataque de infección	PI-PLC	Mananasa²
1	+	-	-	-
2	+	-	-	100 MU/T
3	-	+	-	-
4	-	+	-	100 MU/T
5	-	+	PI-PLC tipo salvaje (10 U/b) producida por <i>Bacillus cereus</i>	-
6	-	+	PI-PLC recombinante (30 U/b) producida por <i>Bacillus megaterium</i>	-
7	-	+	PI-PLC recombinante (10 U/b) producida por <i>Bacillus megaterium</i>	100 MU/T
8	-	+	PI-PLC recombinante (30 U/b) producida por <i>Bacillus megaterium</i>	100 MU/T
9	+	+	-	-

38
A

10	+	+	PI-PLC recombinante (30 U/b) producida por <i>Bacillus</i> <i>megaterium</i>	-
----	---	---	--	---

¹La dieta contenía disaliclato de bacitracin metileno (BMD, 50 g/tonelada) y Salinomicina (Secox, 60 g/tonelada).

²100 MU/T es igual a 100 x 10⁶ unidades de actividad por tonelada de alimento.

³Las aves fueron atacadas a los 8 con 75000 oocistos de *E acervulina* y con 1,250
5 oocistos de *E maxima* por ave, mediante administración oral, a los 11, 12 y 13 días de edad con *Clostridium perfringens* por suministro oral cada día con un líquido de cultivo fresco que contenía 10⁸ cfu/ml.

Las conversiones de alimento se ajustaron por las diferencias en los pesos promedio de las aves con el propósito de comparar los tratamientos. La infección empeoró el AF/G (peso ajustado por conversión de alimento) en alrededor de un
10 23%. (0,147 unidades de AF/G). El uso de Salinomicina y BMD restauró por completo el AF/G a niveles normales, pero estos dos agentes químicos no fueron mejores que la combinación de β - mananasa y PI-PLC para reducir las lesiones intestinales causadas por la infección. Cien millones (100 MU) de unidades de β -
15 mananasa por tonelada, ya sea solas o en combinación con PI-PLC, superaron parcialmente las consecuencias perjudiciales de la infección, tal como lo evidencia la mejora del 65% al 70% en la reducción de AF/G presente en el control infectado (véase T3 versus T1). La β - mananasa pareció disminuir la puntuación de la lesión intestinal causada por *E acervulina* más que la de *E maxima*. Se logró la
20 restauración parcial del AF/G en las aves infectadas tratadas con PI-PLC en el alimento, pero solamente se superó entre un 33 y un 41% del empeoramiento. Sin embargo, ambas clases de PI-PLC disminuyeron la puntuación de la lesión intestinal causada por cualquiera de las especies de *Eimeria*. En el caso de *E maxima*, la

reducción en la lesión fue estadísticamente significativa. Los resultados se indican en la Tabla 9.

40
49

Tabla 9. Prueba III de Alimentación de Pollos Parrilleros con PI-PLC y Endo - 1,4- β - D - Mananasa Suministrada a los Pollos Infectados con *E acervulina*, *E maxima*, y *C perfringens*

Descripción del Tratamiento					Consumo de alimento		Conversión de alimento		Ganancia de peso		Peso vivo	Valores de lesión		
I ¹	I ²	β	PI-PLC	Mananasa	Día 0-21	Día 8-21	Día 0-21	Día 8-21	Día 0-21	Día 8-21	Día 21	E. acer.	E. max.	Peso AF/G ³ versus Tratamiento 1
1	No	Si	No	No	11,17 ^{8^{ab}}	8,86 ^{6^a}	1,43 ^{3^{ab}}	1,44 ^{6^d}	0,65 ^{9^a}	0,54 ^{0^a}	0,70 ^{1^a}	0,00 ^a	0,00 ^a	1,433
2	No	Si	100 MU/ton	No	11,23 ^{0^a}	8,84 ^{1^a}	1,40 ^{2^c}	1,42 ^{4^d}	0,67 ^{8^a}	0,54 ^{8^a}	0,72 ^{0^a}	0,00 ^a	0,00 ^a	1,416
3	Si	No	No	No	10,49 ^{7^{bcd}}	8,15 ^{5^{bc}}	1,66 ^{9^a}	1,70 ^{4^a}	0,53 ^{8^d}	0,42 ^{9^c}	0,57 ^{9^d}	1,38 ^a	1,56 ^a	1,579
4	Si	No	100 MU/tonelada	No	10,78 ^{7^{abc}}	8,43 ^{5^{abc}}	1,50 ^{1^{cd}}	1,53 ^{6^c}	0,61 ^{1^{bc}}	0,49 ^{0^b}	0,65 ^{2^{bc}}	1,16 ^a	1,44 ^a	1,465
5	Si	No	No	1X Rec 10 U/lb	10,45 ^{6^{cd}}	8,22 ^{8^{abc}}	1,56 ^{0^{bc}}	1,59 ^{1^{bc}}	0,59 ^{4^c}	0,47 ^{7^b}	0,63 ^{5^c}	1,34 ^a	1,19 ^b	1,512

22/4/

6	SI	No	No	3X Rec 30 U/lb	10,26 6 ^d	7,98 2 ^c	1,57 2 ^b	1,62 1 ^{ab}	0,59 7 ^c	0,48 3 ^b	0,63 8 ^c	1,16 ^a b	1,13 ^c d	1,526
7	SI	No	100 MU/to n	1X Rec 10 U/lb	10,53 3 ^{abc}	8,22 7 ^{abc}	1,51 4 ^{bc}	1,53 6 ^c	0,59 8 ^c	0,48 2 ^b	0,63 9 ^c	1,09 ^b	1,25 ^b c	1,469
8	SI	No	100 MU/to nelad a	3X Rec 30 U/lb	10,49 6 ^{bcd}	8,15 6 ^{bc}	1,51 6 ^{bc}	1,56 2 ^{bc}	0,60 1 ^c	0,47 8 ^b	0,64 3 ^c	1,25 ^a b	1,36 ^a bc	1,474
9	SI	SI	No	No	11,06 0 ^{abc}	8,65 8 ^{ab}	1,42 3 ^c	1,44 7 ^d	0,65 0 ^a	0,52 2 ^a	0,69 2 ^a	1,03 ^b	0,88 ^d	1,416
10	SI	SI	No	3X Rec 30 U/lb	10,66 8 ^{abc}	8,35 9 ^{abc}	1,43 0 ^a	1,44 4 ^d	0,64 7 ^{ab}	0,52 6 ^a	0,68 8 ^{ab}	1,03 ^b	1,13 ^c d	1,420

¹I=Infección.

²M=Medicación (Salinomicina (60 g/tonelada) y BMD (50 g/tonelada)).

³AF/G= peso ajustado por conversión de alimento (Tratamiento 1 lbs_{dia 21}-Tratamiento X lbs_{dia 21}/3) + (alimento consumido/ganancia de peso (dia 0-21)).

Las unidades de PI-PLC son unidades basadas en el Ejemplo 4.

Hemicell MU = millón de unidades de ChemGen.

IV. Prueba IV de Alimentación de Pollos Parrilleros

El estudio fue hecho en jaulas en batería Petersime al azar para evaluar los efectos de las enzimas PI-PLC, mananasa (Patente de los EEUU N° 5429828) y mananasa fúngica sobre el desempeño de pollos parrilleros macho criados hasta los

42
45

21 días de edad. Las aves fueron atacadas a los 8 días de edad con coccidios (75000 oocistos de *E acervulina* y 1250 oocistos de *E maxima* por ave, mediante suministro oral, y a los 11, 12 y 13 días de edad con *Clostridium perfringens* (suministro oral cada día con un líquido de cultivo fresco que tenía 10⁸ cfu/ml). Cada uno de los tratamientos tuvo 8 réplicas o jaulas. Cada jaula albergó 14 pollos parrilleros macho Cobb x Cobb vacunados con Mareks (reducidos a 10 el Día 14, ya que se retiraron 4 aves de cada jaula y se evaluaron en ellas las lesiones) con un espacio de 0,36 pies²/ave. No se repusieron las aves. El alimento y el agua se suministraron ad libitum a lo largo del período de prueba completo (día 0 al día 21).

Las dietas se administraron como mezclas de granos en los días 0-21 de edad. El alimento basal para los tratamientos 1 a 16 fue un alimento inicial típico para pollos parrilleros de maíz/soja que contenía un 22% de proteínas crudas, con una ME de 1400 kcal/lb.

Los resultados que se resumen en la Tabla 10 a continuación demuestran el beneficio reproducible de agregar PI-PLC o mananasa en los alimentos de pollos parrilleros infectados con dos especies de coccidios de aves y con *Clostridium perfringens*, causando mejoras en la ganancia de peso y en la conversión de alimento. Se destaca que este estudio muestra que cuando se combina PI-PLC o mananasa con Salinomicina, pero sin el antibiótico BMD (Pruebas 8 y 5), se restaura el desempeño hasta básicamente el nivel de las pruebas no infectadas (Nº 1 y 2). Esto brinda evidencia de una función antibacteriana. En este caso, la PI-PLC/Salinomicina se desempeñó algo mejor que la mananasa, y superó el desempeño aún actualmente en práctica en los EEUU de agregar una combinación de BMD y Salinomicina para las aves infectadas (Prueba 4).

Tabla 10. Prueba IV de Alimentación de Pollos Parrilleros

Prue ba	1	E ¹	M ²	Puntuación de la lesión		Conversión de Alimento	Ganancia de Peso	Peso vivo
				E. acer.	E. max.			

				Superior	Medio	Días 0-21	Días 2-21	Días 0-21	Días 2-21	Día 21
1	-	-	-	0,00	0,00	1,852	1,894	0,527	0,427	0,565
2	-	-	B/S	0,00	0,00	1,812	1,858	0,546	0,437	0,583
3	+	-	-	2,44	2,31	1,813	1,909	0,394	0,288	0,432
10	+	-	B	2,25	1,94	1,707	1,770	0,453	0,352	0,490
7	+	-	S	1,00	1,09	1,709	1,719	0,458	0,368	0,496
4	+	-	B/S	0,59	1,63	1,585	1,671	0,509	0,397	0,547
16	+	PI- PLC	-	2,25	1,50	1,701	1,778	0,451	0,347	0,486
9	+	PI- PLC	B	2,03	1,34	1,760	1,844	0,445	0,342	0,482
8	+	PI- PLC	S	1,06	1,28	1,584	1,613	0,528	0,419	0,564
12	+	Man.	-	1,94	1,34	1,803	1,849	0,433	0,338	0,483
13	+	Man. 5x	-	2,13	2,00	1,740	1,813	0,437	0,339	0,471
8	+	Man.	B	2,09	1,34	1,707	1,772	0,448	0,348	0,486
5	+	Man.	S	0,97	1,09	1,652	1,688	0,500	0,397	0,538
11	+	Man.	B/S	0,78	1,16	1,622	1,666	0,502	0,390	0,540

¹I=Infección: atacados a los 8 días de edad con 75000 oocistos de *E. acervulina* y 1250 oocistos de *E. maxima* por ave, mediante suministro oral, y a los 11, 12 y 13 días de edad con *Clostridium perfringens* mediante administración oral con 1 mL de un líquido fresco de cultivo que tenía 10^8 cfu/ml.

4244

² E = Enzimas: PI-PLC = PI-PLC recombinante producida por *B. megaterium* agregada a 30 U/lb, unidades definidas como en el Ejemplo 4; Man = endo -1,4- β - D - mananasa de *B. lentus* (Patente de los EEUU N° 5429828) agregada a 121 MU/tonelada (millones de unidades ChemGen/tonelada), o 5x a 506 MU/ton.

5 ³M=Medicación (B=BMD a 50g/tonelada); S= Salinomidina (a 60 g/tonelada).

EJEMPLO 12 Determinación del efecto de las enzimas sobre la viabilidad y la invasión celular por esporozoitos de *Eimeria acervulina* y de *Eimeria tenella* in vitro

Las células de los esporozoitos de *Eimeria acervulina* o de *Eimeria tenella*, y del riñón cultivado de cachorro de hámster (BHK) se prepararon mediante métodos publicados. Véase Augustine, Avian and Poultry Biology Reviews 11: 113-122, 2000. Para el pretratamiento de las células, se sobrecargaron cultivos celulares con diluciones de enzimas como las que se describen en la Tabla 11 y se los examinó en busca de cambios morfológicos 5 a 45 minutos después de la sobrecarga. Después de 45 minutos, se lavaron dos veces los cultivos en monocapa y luego se los inoculó con esporozoitos de *E. acervulina* o de *E. tenella* sin tratar. Para la aplicación durante la infección, se suspendieron los esporozoitos en la dilución apropiada de la enzima y se los inoculó de inmediato en los cultivos celulares. Después de una incubación de 45 minutos, se fijaron los cultivos, se los tñó y se cuantificó la invasión.

Se hicieron observaciones buscando cambios en la morfología gruesa de los esporozoitos o de las células debidas al tratamiento con enzimas. A los niveles de enzimas utilizados en estos experimentos, no se notó cambio morfológico alguno. La invasión de esporozoitos en las células cultivadas se midió después de dos métodos de tratamiento con enzimas, así como sin tratamiento con enzimas, mediante tinciones histológicas y procedimientos de microscopía. Véase Augustine, supra.

Los datos en la Tabla 11 muestran reducciones significativas en la invasión de esporozoitos con invasiones de esporozoitos de *E. acervulina* o de *E. tenella*.

45
20

Tanto la preparación de enzimas PI-PLC de líquido extracelular de *B cereus* como la PI-PLC recombinante altamente pura producida en el cultivo de *B megaterium* recombinante resultó en una reducción estadísticamente significativa de la invasión en la mayor parte de los experimentos. Aún a dosis de aproximadamente la mitad de la preparación de PI-PLC tipo salvaje de *B cereus*, la preparación de PI-PLC recombinante fue aún activa. Así, el pretratamiento de las células con la enzima y el lavado de la enzima fue tan efectivo como el agregado concurrente de la enzima durante la infección. Sin embargo, sobre la base de la experiencia con la extracción de la enzima del alimento, probablemente los dos pasos de lavado no hayan retirado toda la enzima.

Una preparación enzimática con endo -1,4- β - D - mananasa causó también una reducción estadísticamente significativa de la invasión en los dos experimentos en los que las células fueron pretratadas con la enzima antes de la infección. Estos resultados positivos incluyeron un experimento con cada tipo de patógeno. Entonces, la mananasa también se desempeñó tan bien como la preparación de PI-PLC de *B cereus* para reducir la invasión de esporozoítos in vitro.

Tabla 11. Invasión in vitro de células BHK por esporozoitos de *Elmeria acervulina* de *Elmeria tenella* con y sin tratamientos con enzimas.

Enzimas y concentraciones	Pretratamiento de células con enzima seguido por lavado		Aplicación de la enzima durante la infección	
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 1	Prueba 2
Esporozoitos de <i>E. acervulina</i>				
Control	22 ± 1 ^a	33 ± 4 ^a	50 ± 4 ^a	35 ± 7 ^a
PI-PLC de <i>B cereus</i>¹ 0,0403 U/mL	15 ± 1 ^b	26 ± 1 ^{ab}	33 ± 3 ^b	25 ± 2 ^{ab}
PI-PLC de <i>B Megaterium</i> recombinante² 0,261 U/mL	14 ± 1 ^b	22 ± 1 ^b	16 ± 2 ^c	18 ± 1 ^{bc}
PI-PLC de <i>B Megaterium</i> recombinante² 0,0261 U/mL	18 ± 1 ^{ab}	26 ± 1 ^{ab}	36 ± 3 ^b	9 ± 2 ^c
Endo -1,4- β - D - mananasa³ 5100 U/mL	16 ± 1 ^b	29 ± 2 ^{ab}	ND ⁴	ND
Esporozoitos de <i>E. tenella</i>				
Control	44 ± 2 ^a	26 ± 4 ^a	63 ± 5 ^a	42 ± 4 ^a
PI-PLC de <i>B cereus</i>¹ 0,0403 U/mL	38 ± 2 ^b	21 ± 2 ^a	52 ± 13 ^{ab}	37 ± 2 ^{ab}
PI-PLC de <i>B Megaterium</i> recombinante²	30 ± 1 ^c	15 ± 0 ^a	28 ± 2 ^b	39 ± 4 ^{ab}

0,261 U/mL				
PI-PLC de <i>B Megaterium</i> recombinante ²	ND	17 ± 1 ^a	18 ± 1 ^o	29 ± 1 ^b
0,0261 U/mL				
Endo -1,4- β - D - mananasa ³	35 ± 1 ^b	19 ± 5 ^a	46 ± 6 ^{ab}	ND
5100 U/mL				

Los conteos de invasión se indican como media ± error estándar de la media medido a partir de 1-3 cubreobjetos/aberración (las células BHK se cultivaron en cubreobjetos insertados en placas de cultivo). Las medias dentro de los grupos de prueba con distintos superíndices difieren significativamente ($P < 0,05$).

5 ¹Enzima extracelular de *B cereus* dializada en solución salina con buffer fosfato, unidades estandarizadas con el método del Ejemplo 4.

² Enzima extracelular de *B megaterium* dializada en solución salina con buffer fosfato, unidades estandarizadas con el método del Ejemplo 4.

³Mananasa obtenida de *Bacillus lentus* como se describe en la Patente de los EEUU N° 5429828 y dializada en solución salina con buffer fosfato, unidades definidas como en el ensayo de reducción de azúcares de ChemGen Corp.

⁴ND= no determinado.

EJEMPLO 13 Evaluación in vitro de la PI-PLC para infección con *Cryptosporidium*

Se evaluó la enzima PI-PLC por su actividad anti - criptosporidial y su toxicidad a concentraciones que fueron de 0,001-30 U/ml usando células de riñón canino de 4 días de edad Madin-Darby (MDCK). Las unidades enzimáticas se definieron como en el método del Ejemplo 4 pero se midieron como en el Ejemplo 9. La preparación de la enzima usada fue a partir de *Bacillus megaterium* recombinante. El tratamiento se inició 3 horas después de la infección y continuó por 48 horas.

20 **Inmunoensayo de quimioluminiscencia.** Antes de la infección, se lavaron oocistos y se los resuspendió en base DMEM con 0,75% de taurocolato de sodio, y se

los incubó por 10 minutos a 37°C (You et al, FEMS Microbiol Letters 136: 251-256, 1996; You et al, J Antimicrobial Chemother 41: 293-298, 1998). La mezcla de separación se diluyó con medio Ultraculture dispersado rápidamente en las placas que contenían las células MDCK, con una confluencia de 100%, y se la mantuvo en el medio Ultraculture por 4 días. Se incubó el inóculo con las células por 3 horas antes de lavar con PBS y reemplazar con medio Ultraculture fresco con o sin enzima de prueba. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire por 48 horas. Los cultivos se lavaron con PBS y se los fijó con solución de Bouin.

Se lavaron las placas fijadas con buffer TBST (Tris – HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 0,05% de Tween-20) y se las bloqueó con 1% de BSA – TBST (un buffer TBST que contenía 1% de albúmina de suero bovino) por 30 minutos a 25°C con una agitación suave. Se aplicó suero de conejo anti – *Cryptosporidium parvum* (dilución de 1: 200) a las placas y se las incubó por 1 hora. Después de lavar con TBST, se incubó secuencialmente las muestras con IgG de cabra anti – conejo marcada con biotina y con estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (dilución de operación, 1: 1000, KPL Inc, Gaithersburg, MD). Se usó Luminol mejorado (4- Iodofenol y peróxido de hidrógeno, Aldrich Chemical Co Inc, Milwaukee, WI) como sustrato. Se leyeron las placas con un ML3000 Luminometer (Dynatech Lab, Chantilly, VA) y se determinaron las unidades relativas de luz (RLU). Las medias de RLU se calcularon a partir de 4 cavidades replicadas y se repitieron al menos dos veces todos los experimentos.

Ensayo de toxicidad. Se evaluó la enzima usando un ensayo comercial de reducción de colorante de tetrazolio (CellTiter 96; Promega Corp, Madison, WI, EEUU). Brevemente, cada concentración de enzima indicada a continuación se introdujo en placas de 96 cavidades que contenían monocapas confluentes de células MDCK. Se evaluó cada dilución por triplicado. La enzima se incubó en monocapas a 37°C y con un 5% de CO₂. A las 48 horas, se revelaron las placas por 1 hora y se las leyó en el lector de placas de ELISA a 490 nm. Los resultados se registraron y analizaron. Se calculó el porcentaje de toxicidad sustrayendo la OD media control del medio sin la enzima y luego dividiendo por la OD del medio con la

5249

enzima y multiplicando por 100. Se asignaron los valores de citotoxicidad como se indica en la siguiente tabla.

<u>% de Toxicidad</u>	<u>Valor</u>
0-5%	0
6-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Se observó una toxicidad significativa con una concentración de 3U/mL o mayor de la enzima. No se observó una toxicidad significativa con esta enzima en el rango de 0,1-1 U/mL (Tabla 12). Entonces, se realizó una serie de experimentos en este rango de concentración (1,0 U/mL o menor) para determinar la actividad de la enzima y la especificidad de la enzima. En el primer experimento, se infectaron células MDCK con los esporozoítos separados. Después de un período de incubación de 3 horas, se lavó la monocapa de células y se agregó la enzima a varias concentraciones por un período de 48 horas. Como se muestra en la Tabla 13, la enzima demostró actividad anti -criptosporidial en el rango de 0,01-1 U/mL in vitro. Se logró una inhibición de aproximadamente el 50% a una concentración de 0,1 U/mL (Figura 1).

Tabla 12. Toxicidad de PI-PLC recombinante preparada en *B. Megaterium* para cultivos en monocapa de células MDCK

Concentración	% de Toxicidad (LC de 95%)	Valor de toxicidad
10 U/ mL	83	4
3	57	3
1	13	1
0,3	11	1
0,1	10	1

80
43

Tabla 13. Actividad de la enzima PI-PLC recombinante con cultivos de células MDCK Infectados por *C parvum*

Tratamiento	Unidad/ mL	Porcentaje de Inhibición	Cantidad Media de <i>Cryptosporidium</i> por cavidad de placa de microtitulación	LC de 95%
Post Infección por 3 h	1	77,36	285,28	0,01
	0,3	77,26	286,5	0,04
	0,1	52,74	595,53	0,18
	0,03	27,62	912,15	0,22
	0,01	7,33	1167,78	0,09
Infectado	-	0	1260,18	0,09
No Infectado	-	100	0	0,02

Se realizó un segundo conjunto de experimentos para evaluar la especificidad de la enzima. Se trataron los esporozoitos con la enzima a varias concentraciones por 45 minutos y se los lavó brevemente. Los esporozoitos tratados infectaron células hospedadoras sin tratar, se desarrollaron y se reprodujeron por 48 horas. En un experimento separado, se incubaron las células hospedadoras con la enzima a varias concentraciones, se las lavó y se las infectó con esporozoitos sin tratar. Como se muestra a continuación (Tabla 14), el tratamiento de los esporozoitos o de las células hospedadoras con la enzima resulta en una inhibición parcial. No se observó una inhibición dependiente de la dosis en este rango de concentración. Esto puede deberse al breve período de incubación de la enzima con las células hospedadoras o parásitas (45 minutos), o a una separación parcial o incompleta de los receptores hospedador/parásito. Adicionalmente, es probable que

otros receptores hospedador/parásito estén involucrados en la infección y den cuenta del crecimiento observado en las células hospedadoras.

252

Tabla 14. Tratamiento pre – Infección de esporozoitos o de células MDCK y efecto sobre la infectividad de *C parvum*.

Tratamiento	PI-PLC Unidad/ ml	Porcentaje de Inhibición	Cantidad media de <i>Cryptosporidium</i> por cavidad de placa de microtitulación	LC de 95%
Esporozoito tratado antes de la infección	1	67,27	412,40	0,02
	0,3	65,64	433,04	0,06
	0,1	57,40	536,80	0,03
	0,03	58,13	527,59	0,03
	0,01	58,98	542,15	0,01
Células hospedadoras tratadas antes de la infección	1	68,76	393,64	0,12
	0,3	50,07	629,24	0,26
	0,1	63,82	455,88	0,19
	0,03	58,53	522,66	0,12
	0,01	56,84	543,85	0,10

SSS

infectado	0	1260,18	0,09
No Infectado	100	0	0,02

EJEMPLO 14 Evaluación in vivo de la PI-PLC por Infección de *Cryptosporidium*

Se evaluó la eficacia de la enzima como agente anti –criptosporidial usando un modelo de ratón inmunodeficiente SCID. Brevemente, se prepararon inóculos de oocistos lavando oocistos purificados (almacenados por menos de 6 meses) con 0,1% de BSA, PBS (pH 7,2) para retirar el dicromato de potasio. Se infectaron ratones SCID (4-5 semanas de edad) con 10⁶ oocistos (cepa IOWA) y se los trató como se indica a continuación. Se colectaron muestras fecales de los ratones, se las purificó a través de sacarosa discontinua y se evaluó su carga de parásitos por citometría de flujo como se describió previamente. Véase Arrowwood et al, J Parasitol 81: 404-409, 1995.

Tabla 15. Régimen de Tratamiento para Experimentos Terapéuticos

Grupo de ratones	A	B	C
Cantidad de ratones	10	10	10
Dosis de inóculo	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
Compuesto	PI-PLC	PI-PLC	Placebo
Dosis (mg/Kg)	90 U/ml	30 U/ml	PBS
Ruta	Brindada con el alimento	Brindada con el alimento	Brindada con el alimento
Frecuencia	Ad lib	Ad lib	Ad lib

Se cubrió la comida granulada para ratones con 30 ó 90 U/lb de PI-PLC en PBS o PBS. Todos los ratones se alimentaron ad libitum. Los ratones recibieron su alimento inmediatamente después de la infección. Se colectaron

52 SA

muestras fecales y se registraron los pesos dos veces por semana. Se midió el consumo de alimento diariamente. Se sacrificaron los ratones inyectando a cada uno de ellos 0,2 cc de Ketamina 100 mg/ml, Xylazina 100 mg/ml y 0,9% de NaCl.

El alimento promedio consumido por día por ratón y los peso promedio pro ratón se indican en la Tabla 16. No se observaron diferencias significativas en el consumo de alimento o en el peso para el período de 3 semanas.

Tabla 16. Consumo de alimento y ganancia de peso por ratón.

	Grupos de Tratamiento	Alimento consumido/ratón/día (g)	Peso (g)
Día 3		PROM	PROM
	A (90U/lb)	7,56	16,67
	B(30U/lb)	6,13	17,055
	C(PBS control)	5,46	16,88
Día 7		PROM	PROM
	A	8,31	16,95
	B	8,51	16,91
	C	7,27	16,89
Día 10		PROM	PROM
	A	8,55	17,29
	B	7,93	17,08
	C	7,11	16,97
Día 14		PROM	PROM
	A	7,78	17,43
	B	8,06	17,62

SS
DB

	C	7,55	17,38
Día 17		PROM	PROM
	A	8,52	17,64
	B	8,53	17,84
	C	7,79	17,59
Día 21		PROM	PROM
	A	7,89	18,25
	B	8,22	18,62
	C	8,51	18,14
Día 24		PROM	PROM
	A	9,79	18,2
	B	8,3	18,63
	C	8,22	18,33

Eficacia 3 semanas después de la infección. Se colectaron muestras de las hecas 3, 4 y 4,5 semanas después de la infección, y se midió la cantidad de *Cryptosporidium* en muestras de 100 microlitros de ratones SCID divididos en grupos tratados y control, como se indica en la Tabla 17. Como se muestra, los ratones tratados con la enzima demostraron una reducción en su carga de parásitos. Se observaron las cargas de parásitos (34-54%) en los grupos tratados. Algunas de estas reducciones fueron estadísticamente significativas cuando se las evaluó usando un análisis estadístico de ANOVA (Indicado a continuación y marcado con un símbolo). La enzima demuestra potencial como agente terapéutico anti – criptosporidial. Las dosis mayores de la enzima o una mejor administración de la enzima al sitio de la infección podrían aumentar su eficacia y pueden ser analizadas por futuros experimentos.

56

Tabla 17. Eficacia de la PI-PLC in vivo para reducir *Cryptosporidium* en las heces

Grupo de Tratamiento	Dosis de Enzima (U/lb) 0µl	Carga de Parásitos (oocistos/100µl) (SD) Día 21	Porcentaje de Inhibición	Carga de Parásitos (oocistos/100µl) (SD) Día 28	Porcentaje de Inhibición	Carga de Parásitos (oocistos/100µl) (SD) Día 31	Porcentaje de Inhibición
PI-PLC	90	22,7(11,4)	44,0	28,3 (14) [*]	48,9	87,5(52,9)	34,0
PI-PLC	30	16,2 (4,7)	52,0	23,4 (11) [*]	54,6	74,3(89,7) ⁺	40,0
PBS (control)	-	33,5 (16,2)	-	50,4 (29)	-	132,1(89.)	-

*los valores de P fueron significativos a 0,05 o menos.

+el valor de P fue de 0,08 o menos.

EJEMPLO 15 Verificación de la enzima en alimentos usados en pruebas de crecimiento

Se llevó a cabo una evaluación de la PI-PLC extraída de las semillas usadas en las pruebas anteriores en animales como se describe en el Ejemplo 10. Los resultados se resumen en las Tablas 18-19.

Tabla 18. Estudio de *Cryptosporidium*, alimento para ratón

Tratamiento	Control	30 U/lb	90 U/lb
U/lb Destino	0	30	90
Tipo de PI-PLC		Recombinante de <i>B megaterium</i>	Recombinante de <i>B megaterium</i>

54
60

PI-PLC Lote- N°		45-46 SF	45-46 SF
U/lb extraídas por ensayo		22,8	88,1
% de destino- extraído		76,0	73,4

La eficiencia de la extracción del alimento varió significativamente con el tipo de semilla. La extracción de alimento para ratones mostró una eficiencia del 73,4 al 76 (Tabla 18). Se cargaron tres preparaciones diferentes de alimento para pollos hechas en tres sitios diferentes cuidadosamente con 45 ó 180 U/lb de PI-PLC recombinante, luego se las extrajo inmediatamente y se las evaluó usando el procedimiento de ensayo del Ejemplo 9, ya que el nivel de carga está en el rango del método de ensayo continuo del Ejemplo 9 (Tabla 19).

Tabla 19
Evaluación de la Eficiencia de la Extracción de Distintas Fuentes de Alimentos para Animales y de Alimento de Maíz

Fuente de Alimento para pollo								
	Fuente 1		Fuente 2		Fuente 3		Alimento de maíz	
Nivel de carga Unidades/Lb	180	45	180	45	180	45	180	45

6758

Unidades/lb Extraídas	128	9,3	53,2	3,66	82,7	8,46	134,4	33
% de unidades agregadas extraídas	71,1	20,7	29,6	8,1	45,9	18,8	74,7	73,3

Puede verse que la eficiencia de la extracción del alimento de maíz es similar que la de la extracción del alimento para ratones. Sin embargo, la extracción de algunas muestras de alimento para pollos fue pobre en este experimento, al igual que en otros.

En la prueba que se muestra en la Tabla 20, la enzima extraída fue aproximadamente un 30 a un 45% de la PI-PLC teórica, mientras que la β - mananasa fue fácilmente extraíble y el rendimiento fue de aproximadamente 100%. Alrededor de 45% de la extracción fue el mejor nivel de extracción observado con este alimento con la prueba de extracción indicada anteriormente. Así, los resultados del ensayo de U/lb extraídas de los alimentos de la Tabla 20 están en el rango esperado, excepto por la carga usada.

Tabla 20. Verificación de la Carga de Enzima en la Prueba III de Alimentación de Pollos Parrilleros

Tratamiento N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Infección	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Medicación	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Unidad/lb	0	0	0	0	10	30	10	30	0	30

6289

destino										
Tipo de PI-PLC	-	-	-	-	WT	Rec	Rec	Rec	-	Rec
Ensayos de Unidad/lb de PI-PLC										
Unidad/lb promedio	0,94	0,76	0,79	0,7	3,0 8	11,4 8	4,56	10,1 8		9,49
Porcentaje de destino	-	-	-	-	30, 75	38,2 7	45,5 7	33,9 3		31,6 4
MU/tonelada destino	-	100	-	100	-	-	100	100	-	-
Mananasa Hemiceli	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Ensayos de MU/tonelada de Mananasa										
MU/tonelada	-	124, 9	-	135,5	-	-	153, 5	172, 0	-	-
Porcentaje de destino	-	124, 9	-	135,5	-	-	153, 5	172, 0	-	-

Si bien se han mostrado algunas realizaciones y detalles representativos con el propósito de ilustrar la invención, resultará evidente para aquellos entrenados en la técnica que pueden hacerse varios cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES:

1. Una composición, CARACTERIZADA PORQUE comprende (i) una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde dicha enzima es distinta de una endo-1,4- β -D-mananasa, y (ii) un vehículo fisiológicamente aceptable para dicha enzima, donde dicha composición se encuentra en una forma adecuada para la administración por vía oral.
2. La composición acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima cliva un enlace responsable de la liberación de una proteína de la superficie celular.
3. La composición acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición no contiene otro agente antiinfeccioso distinto de dicha enzima.
4. La composición acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición es un alimento.
5. La composición acorde con la cláusula 4, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición de alimento no contiene otro agente antiinfeccioso que dicha enzima.
6. La composición acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima se selecciona del grupo formado por esfingomielinasas y fosfolipasas.
7. La composición acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima es una fosfolipasa de tipo C o de tipo D.
8. La composición acorde con la cláusula 7, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima es fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol.

9. La composición acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima se selecciona del grupo formado por esterasas, cerebrosidasas, y carbohidrasas que clivan un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular.
10. La composición acorde con cualquiera de las cláusulas 1-9, CARACTERIZADA PORQUE dicho vehículo es una sustancia alimenticia en la cual se incorpora dicha enzima.
11. La composición acorde con la cláusula 10, CARACTERIZADA PORQUE dicha sustancia alimenticia es un alimento para animales compuesta de granos, una fuente de proteína, vitaminas, aminoácidos y minerales.
12. La composición acorde con la cláusula 11, CARACTERIZADA PORQUE dichos granos son maíz, sorgo, trigo, cebada o centeno.
13. La composición acorde con la cláusula 11, CARACTERIZADA PORQUE la fuente de proteínas es habas o arvejas.
14. La composición acorde con cualquiera de las cláusulas 1-9, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición es una formulación sólida o líquida.
15. La composición acorde con cualquiera de las cláusulas 1-9, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima está contenida en una cubierta de cápsula de gelatina.
16. La composición acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima se prepara a partir de una cepa de *Bacillus cereus*.
17. La composición acorde con la cláusula 16, CARACTERIZADA PORQUE dicha cepa de *Bacillus cereus* es ATCC 7004 o ATCC 6464.
18. La composición acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE

dicha enzima se obtiene por expresión de un ADN recombinante en un organismo huésped.

19. La composición acorde con la cláusula 18, CARACTERIZADA PORQUE dicho organismo huésped es de una cepa de *Bacillus megaterium*.

20. La composición acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima está presente a razón de 200 UI/Kg – 4000 UI/Kg de alimento.

21. Un método para tratar o aliviar el riesgo de una infección del tracto digestivo, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración por vía oral, a un sujeto que padece o que tiene riesgo de padecer dicha infección, una cantidad efectiva de enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde dicha enzima es distinta de una endo-1,4-β-D-mananasa.

22. El método acorde con la cláusula 21, CARACTERIZADO PORQUE dicha enzima cliva un enlace responsable de la liberación de una proteína de la superficie celular.

23. El método acorde con la cláusula 21, CARACTERIZADO PORQUE dicho método no incluye la administración de un agente antiinfeccioso distinto de dicha enzima.

24. El método acorde con la cláusula 21, CARACTERIZADO PORQUE dicha infección es causada por un patógeno que puede ser un protozoo, una bacteria, una levadura o un hongo.

25. El método acorde con la cláusula 24, CARACTERIZADO PORQUE dicha infección es causada por un protozoo del género *Eimeria*.

26. El método acorde con la cláusula 24, CARACTERIZADO PORQUE dicha infección es causada por un protozoo del género *Cryptosporidium*.

27. El método acorde con la cláusula 24, CARACTERIZADO PORQUE dicha infección es causada por una bacteria del género *Clostridium*.
28. El método acorde con la cláusula 21, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración por vía oral, a dicho sujeto, de una preparación de enzima extracelular de una cepa de *Bacillus cereus*.
29. El método acorde con la cláusula 28, CARACTERIZADO PORQUE dicha cepa de *Bacillus cereus* es ATCC 7004 o ATCC 6484.
30. El método acorde con la cláusula 21, CARACTERIZADO PORQUE dicha enzima se obtiene por expresión de un ADN recombinante en un organismo huésped.
31. El método acorde con la cláusula 30, CARACTERIZADO PORQUE dicho organismo huésped es de una cepa de *Bacillus megaterium*.
32. Una composición, CARACTERIZADA PORQUE comprende (i) una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular y (ii) un vehículo fisiológicamente aceptable para dicha enzima, donde dicha composición se encuentra en una forma adecuada para la administración por vía oral y no contiene un agente antiinfeccioso distinto de dicha enzima.
33. La composición acorde con la cláusula 32, CARACTERIZADA PORQUE dicho vehículo es una sustancia alimenticia en la cual se incorpora dicha enzima.
34. La composición acorde con la cláusula 33, CARACTERIZADA PORQUE dicha sustancia alimenticia es un alimento para animales compuesto de granos, una fuente de proteínas, vitaminas, aminoácidos y minerales.
35. La composición acorde con la cláusula 34, CARACTERIZADA PORQUE

dichos granos son de maíz, sorgo, trigo, cebada o centeno.

36. La composición acorde con la cláusula 34, CARACTERIZADA PORQUE la fuente de proteínas es habas o arvejas.

37. La composición acorde con la cláusula 32, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición es una formulación sólida o líquida.

38. La composición acorde con la cláusula 32, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima está contenida en una cápsula de gelatina.

39. La composición acorde con la cláusula 32, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima es una hemicelulasa.

40. La composición acorde con la cláusula 39, CARACTERIZADA PORQUE dicha hemicelulasa es una mananasa.

41. La composición acorde con la cláusula 40, CARACTERIZADA PORQUE dicha mananasa es la endo-1,4- β -D-mananasa producida por la cepa de *Bacillus lentus* denominada ATCC 55045.

42. La composición acorde con la cláusula 32, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima se selecciona del grupo formado por esfingomielinasas y fosfolipasas.

43. La composición acorde con la cláusula 42, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima es una fosfolipasa de tipo C o de tipo D.

44. La composición acorde con la cláusula 43, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima es fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol.

45. La composición acorde con la cláusula 32, CARACTERIZADA PORQUE dicha enzima se selecciona del grupo formado por esterasas, cerebrosidasas, y carbohidrasas que clivan un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular.

46. Un método para tratar o aliviar el riesgo de una infección en el tracto digestivo, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración por vía oral, a un sujeto que padece o que tiene el riesgo de padecer dicha infección, de una cantidad efectiva de enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde dicho método no incluye la administración, con dicha enzima, de una cantidad antimicrobiana efectiva de otro agente antiinfeccioso.
47. El método acorde con la cláusula 46, CARACTERIZADO PORQUE dicha infección es causada por un patógeno que es un protozoo, una bacteria, una levadura o un hongo.
48. El método acorde con la cláusula 47, CARACTERIZADO PORQUE dicha infección es causada por un protozoo del género *Eimeria*.
49. El método acorde con la cláusula 47, CARACTERIZADO PORQUE dicha infección es causada por un protozoo del género *Cryptosporidium*.
50. El método acorde con la cláusula 47, CARACTERIZADO PORQUE dicha infección es causada por una bacteria del género *Clostridium*.
51. El método acorde con la cláusula 46, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración por vía oral, a dicho sujeto, de una preparación de enzima extracelular de una cepa de *Bacillus cereus*.
52. El método acorde con la cláusula 51, CARACTERIZADO PORQUE dicha cepa de *Bacillus cereus* es ATCC 7004 o ATCC 6484.
53. El método acorde con la cláusula 46, CARACTERIZADO PORQUE dicha enzima se obtiene mediante la expresión de un ADN recombinante en un organismo huésped.
54. El método acorde con la cláusula 53, CARACTERIZADO PORQUE

dicho organismo huésped es de una cepa de *Bacillus megaterium*.

55. El método acorde con la cláusula 46, CARACTERIZADO PORQUE dicha enzima es una hemicelulasa.

56. El método acorde con la cláusula 55, CARACTERIZADO PORQUE dicha hemicelulasa es una mananasa.

57. El método acorde con la cláusula 56, CARACTERIZADO PORQUE dicha mananasa es la endo-1,4-β-D-mananasa producida por la cepa de *Bacillus lentus* denominada ATCC 55045.

58. El uso de una forma de dosificación oral de una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde dicha enzima es distinta de una endo-1,4-β-D-mananasa, CARACTERIZADO PORQUE es para tratar o aliviar el riesgo de una infección en el tracto digestivo.

59. El uso de una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde dicha enzima es distinta de una endo-1,4-β-D-mananasa, CARACTERIZADO PORQUE es para aliviar una forma de dosificación oral de un medicamento, para tratar o aliviar el riesgo de una infección en el tracto digestivo.

60. El uso de una forma de dosificación oral de una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde dicha enzima no se administra con una cantidad antimicrobiana efectiva de otro agente antiinfeccioso, CARACTERIZADO PORQUE es para tratar o aliviar el riesgo de una infección en el tracto digestivo.

61. El uso de una enzima capaz de clivar un enlace responsable de la

liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, donde dicha enzima no se administra con una cantidad antimicrobiana efectiva de otro agente antinfecioso, CARACTERIZADO PORQUE es para elaborar una forma de dosificación oral de un medicamento para tratar o aliviar el riesgo de una infección en el tracto digestivo.

TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

RESUMEN

Enzimas de una clase particular, caracterizada por su capacidad para clivar un enlace responsable de la liberación de una proteína o un carbohidrato de la superficie celular, que no contiene un agente antiinfeccioso, que presentan una actividad antiinfecciosa significativa. Cuando se administran por vía oral, estas enzimas son efectivas, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones del tracto digestivo en seres humanos y en animales. En este último caso, hay ventajas de una mayor tasa de crecimiento, eficacia alimentaria y estado de salud general.

Expediente No		No de unidades	No de Folia
Item			
1	CD		✓
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	2	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones:

Este Final


REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PATENTE DE INVENCION ☒
MODELO DE UTILIDAD []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- Descripción de la invención ☒
- Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

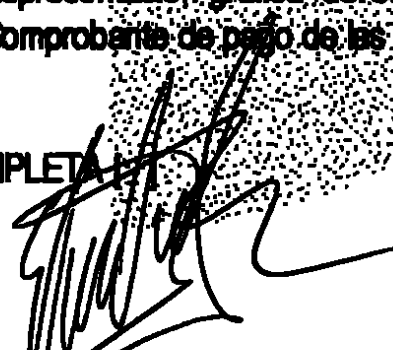
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica del esquema de trazado []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable
Fecha:

7174



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá, D.C.

Doctora
DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
Apoderada

REFERENCIA:	Radicación No.	00-93684
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	0538
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el certificado de existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).
- Debe indicarse el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art. 27-c, D 486/00).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 MAR 2021.

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de éste plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia