



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720678-0 A2



(22) Data de Depósito: 17/12/2007
(43) Data da Publicação: 04/02/2014
(RPI 2248)

(51) Int.Cl.:
C07K 14/32
A61K 35/74
A61P 33/00
A23L 1/30

(54) Título: USO DE PEPTÍDEOS COMO COCCIDIOSTÁTICOS E/OU HITOMONASTÁTICOS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2006 EP 06026709.3, 05/02/2007 EP 07002395.7, 05/02/2007 EP 07002395.7

(73) Titular(es): DSM Ip Assets B.V.

(72) Inventor(es): Gilbert Weber, Jiri Broz

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007011059 de 17/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/077522de 03/07/2008

USO DE PEPTÍDEOS COMO COCCIDIOSTÁTICOS E/OU
HITOMONOSTÁTICOS

Esta invenção está relacionada ao uso de polipeptídeos, como aqui definidos a seguir, em alimentos ou em ração animal como um coccidiostático e/ou histomonostático. Um exemplo de um polipeptídeo da invenção é a denominada proteína L12 de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, que possui a seqüência de aminoácidos dos aminoácidos +1 a +85 do ID. DE SEQ. N°: 2 aqui apresentado (que acompanham os aminoácidos 1-85 do ID. DE SEQ. N°: 2).

Coccídeo é um nome genérico dado aos organismos protozoários de célula única que são parasitas intestinais que infectam tanto vertebrados quanto invertebrados. Os organismos causam coccidiose, e normalmente se alojam no intestino delgado, por exemplo, no cólon. A infecção com coccídeos em animais de criação pode não apenas reduzir seriamente o crescimento, mas pode trazer risco de vida. Os sintomas da infecção por coccídeos incluem perda de células epiteliais, desnudamento da mucosa do intestino e diarreia (freqüentemente com a perda de sangue concomitante). Para alguns animais de criação, por exemplo, aves, a infecção por coccídeos pode ser fatal ou afetar seriamente a saúde do animal.

Aves são particularmente vulneráveis à coccidiose por várias razões: (1) O ciclo parasítico de 6 a 8 dias atinge no estágio crítico entre a 2ª e 4ª semanas, quando o crescimento máximo é normalmente expresso. Na medida em que os parasitas praticamente destroem todo o epitélio intestinal, a absorção de nutrientes é reduzida dramaticamente, o que resulta em uma depressão acentuada do

crescimento. Até o abate em 5 ou 6 semanas, não há tempo suficiente para a recuperação. (2) Há 7 espécies de *Eimeria* que podem infectar aves, mais do que em qualquer outra categoria animal, e pelo menos 4 delas são observadas regularmente em operações comerciais. Dessa forma, quando um ciclo infeccioso é concluído, outro já pode estar em um estágio inicial, de tal modo que a coccidiose se torna crônica. (3) Em aves, são observadas as espécies mais patogênicas (*Eimeria tenella*, *E. necatrix*), que induzem hemorragias graves e, em certos casos, podem causar uma mortalidade de até 50%. Um caso agudo de coccidiose desse tipo poderia facilmente arruinar um criador de aves. (4) A criação intensiva de aves (100.000 pintos ou mais em uma instalação) com grande quantidade de resíduos facilita o acesso de aves aos estágios infecciosos de coccídeos nas fezes por meio de coprofagia e, dessa forma, auxilia a disseminação rápida da doença em um rebanho de aves inteiro. Caso as condições sanitárias não sejam rigorosas, a doença também irá se transferir para outras instalações de aves na mesma fazenda e perdurar no local por anos.

A fim de combater a coccidiose, as rações animais são freqüentemente suplementadas com um coccidiostático. Coccidiostáticos que foram aprovados pela Comunidade Econômica Européia (CEE) para uso com aves (galinhas, perus, frangos e galinhas poedeiras) incluem sulfonimidas, amprólio, decoquinato e ionóforos. No entanto, alguns desses coccidiostáticos são compostos inorgânicos que não são naturais e, dessa forma, devem ser produzidos sinteticamente. Isso significa que são relativamente caros. Há, portanto, a necessidade de coccidiostáticos que sejam

de ocorrência natural.

A histomoníase também é causada por um protozoário. Nesse caso específico, o protozoário infecta o ceco e, posteriormente, o fígado, de perus, galinhas e, 5 ocasionalmente, outros pássaros galiformes. Em perus, a maioria das infecções é fatal; em outros pássaros, a mortalidade é menos comum. O parasita protozoário *Histomonas meleagridis* é transmitido mais freqüentemente em ovos embrionados do nematódeo cecal *Heterakis gallinarum*, e 10 algumas vezes diretamente por contato com pássaros infectados. As epidemias se disseminam rapidamente através dos rebanhos por contato direto. Uma grande percentagem de galinhas abriga esse verme, e histomonas foram localizados em vermes adultos de ambos os sexos. Três espécies de 15 lombrigas podem abrigar larvas de *H. gallinarum* que contêm *H. meleagridis*, que são infecciosas tanto em galinhas quanto em perus. *H. meleagridis* sobrevive por longos períodos dentro de ovos de *Heterakis*, que são resistentes e podem permanecer viáveis no solo por anos. Histomonas são 20 liberados por larvas de *Heterakis* no ceco poucos dias após a entrada do nematódeo e se replicam rapidamente em tecidos do ceco. Os parasitas migram para dentro da submucosa e da camada muscular da mucosa e causam necrose extensiva e severa. Os histomonas alcançam o fígado pelo sistema 25 vascular ou por meio da cavidade peritoneal, e lesões necróticas arredondadas aparecem rapidamente na superfície do fígado. Os histomonas interagem com outros organismos do intestino, por exemplo, bactérias e coccídeos, e dependem destes para uma virulência plena.

30 Tradicionalmente, acreditava-se que a histomoníase

afetasse perus, com poucos danos às galinhas. No entanto, epidemias em galinhas podem causar morbidade elevada, mortalidade moderada e descarte extenso. As lesões hepáticas tendem a ser menos graves em galinhas, mas a morbidade pode ser especialmente elevada em poedeiras jovens ou matrizes pesadas.

A fim de combater a histomoníase, as rações animais são freqüentemente suplementadas com um histomonostático. Histomonostáticos para uso com aves (galinhas, perus) podem incluir, por exemplo, ácido 4-nitrofenilarsônico, um composto que não é natural e, dessa forma, deve ser feito sinteticamente. Além disso, sabe-se que o único histomonostático autorizado restante para perus, Nifursol, foi retirado em 2003 pelas autoridades do Reino Unido. Portanto, também há a necessidade de histomonostáticos novos e adicionais que sejam, por exemplo, de ocorrência natural.

Além das vantagens normais da utilização de compostos naturais, esses têm maior probabilidade de ser mais baratos do que a síntese do composto.

A presente invenção se baseia no achado de que os polipeptídeos definidos a seguir possuem atividade contra coccidiose e histomoníase e, portanto, podem ser usados como coccidiostáticos e/ou histomonostáticos. Embora os referidos polipeptídeos já tenham sido sugeridos como aditivos para ração animal (WO-A-2006/099871), não havia sido percebido, até agora, que esses compostos poderiam ser ativos contra coccídeos ou histomoníase. Na verdade, na WO-A-2006/099871, em vez disso, os polipeptídeos foram adicionados à ração animal a fim de aumentar a utilização

da ração animal por aumento da proporção de conversão de reações (FCR) e/ou modulação da microflora intestinal, e não houve menção de qualquer atividade contra coccidiose e histomoníase.

5 Portanto, esta invenção está relacionada ao uso de um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em:

(a) um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que possui um grau de identidade para os aminoácidos 1-85 do ID. DE SEQ. N°: 2 de pelo menos 33%;

10 (b) um polipeptídeo que é codificado por uma seqüência de ácidos nucléicos que hibridiza sob condições de baixo rigor com os (i) nucleotídeos 124-378 do ID. DE SEQ. N°: 1, (ii) uma subseqüência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, ou (iii) uma fita complementar de (i) ou
15 (ii);

(c) uma variante do polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácidos dos aminoácidos 1-85 do ID. DE SEQ. N°: 2 que compreende uma substituição, eliminação, extensão e/ou inserção de um ou mais aminoácidos;

20 (d) uma variante alélica de (a) ou (b); e

(e) um fragmento de (a), (b), (c) ou (d).

como um coccidiostático e/ou histomonostático.

Com a utilização de um polipeptídeo como definido acima como um coccidiostático, por exemplo, pode-se
25 empregar um composto de ocorrência natural que tenha maior probabilidade de ser aceitável ao ser humano ou animal que está sendo tratado para coccidiose. Além disso, a indústria e os grupos de consumidores são freqüentemente favoráveis à utilização de compostos de ocorrência natural ao invés
30 daqueles sintéticos. Os polipeptídeos são orgânicos e,

portanto, seu fornecimento pode ser mais barato do que compostos inorgânicos sintéticos.

Em modalidades particulares, o polipeptídeo possui, consiste basicamente em ou consiste em uma seqüência de aminoácidos que possui um grau de identidade para os aminoácidos 1-85 do ID. DE SEQ. N°: 2 de pelo menos 33% como, por exemplo, o polipeptídeo dos aminoácidos 1-85 do ID. DE SEQ. N°: 2. Outros exemplos específicos são os polipeptídeos dos aminoácidos 1-85 de qualquer um dos IDS. DE SEQ. N°s: 8, 9 e 10 (identificados como semelhantes a L12 com base no teste de PCR do Exemplo 1 aqui apresentado).

Um polipeptídeo da presente invenção pode ser um polipeptídeo bacteriano ou um polipeptídeo fúngico. Em uma segunda modalidade particular, o polipeptídeo é um polipeptídeo bacteriano Gram-positivo como, por exemplo, um polipeptídeo de *Bacillus* ou uma variante deste, por exemplo, um polipeptídeo de *Bacillus licheniformis*, por exemplo, derivado de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, que é a cepa do tipo de *Bacillus licheniformis* e disponível mediante solicitação pela "American Type Culture Collection", ATCC. Cepas de *Bacillus licheniformis* preferidas são positivas no teste do Exemplo 1 aqui apresentado, tais como as seguintes cepas de *Bacillus licheniformis*: ATCC 14580 (= NCIB 9375), NCIMB 6346 (= DSM 8785), NCTC 1024, NCTC 1025, NCTC 2120, NCTC 7589, NCTC 9932, ATCC 21424, NCIMB 10689 e ATCC 53757.

Um segundo aspecto da presente invenção está relacionado ao uso de polipeptídeos, como aqui definidos anteriormente, na preparação de uma composição

coccidiostática ou histomonostática.

Um aspecto adicional da invenção está relacionado a uma composição de ração animal, por exemplo, adequada a um animal monogástrico ou não ruminante, que compreende um polipeptídeo, como aqui definido anteriormente, que está presente como um coccidiostático e/ou como um histomonostático. O polipeptídeo de acordo com a invenção está presente preferivelmente em uma quantidade na qual possui atividade coccidiostática ou é ativo contra coccídeos.

O termo "animal" inclui todos os animais. Exemplos de outros animais além de aves são animais ruminantes, incluindo, por exemplo, carneiro, cabra e gado, por exemplo, vacas, tais como gado de corte e vacas leiteiras. Em uma modalidade particular, o animal é um animal não ruminante. Animais não ruminantes incluem animais de estimação, por exemplo, gatos ou cães, e animais monogástricos, por exemplo, além de aves, porcos ou suínos (incluindo, sem limitação, leitões, porcos em crescimento e leitoas); peixes (incluindo, sem limitação, salmão, truta, tilápia, bagres e carpas); e crustáceos (incluindo, sem limitação, camarão e pitu).

Um aspecto adicional da invenção está relacionado a uma pré-mistura ou composição aditiva, por exemplo, para ser adicionada a uma ou mais substâncias ou ingredientes de rações comestíveis, por exemplo, para preparar ou suplementar uma ração existente para formar uma composição de ração.

De acordo com a invenção, o polipeptídeo pode ser usado como polipeptídeo puro isolado ou em uma mistura de

polipeptídeos.

Como aqui definido, um polipeptídeo "isolado" ou "puro" é um polipeptídeo que é essencialmente livre de outros polipeptídeos, por exemplo, pelo menos 80% puro, 5 preferivelmente pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89% ou pelo menos 90% puro, mais preferivelmente pelo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95% ou pelo menos 96% puro, como determinado por SDS-PAGE (por exemplo, por coloração coomassie e subsequente varredura por métodos conhecidos na técnica). A 10 pureza também pode ser determinada por HPLC, preferivelmente RP-HPLC (por exemplo, com a utilização de uma coluna Waters μ -Bondapak C18, Fase Móvel A: TFA 0,1%, Fase Móvel B: Acetonitrila + TFA 0,1%, detectando a 280 nm). A pureza por SDS-PAGE, bem como a pureza por HPLC, 15 refere-se à quantidade do polipeptídeo da invenção, em relação à quantidade de proteína total. Em modalidades alternativas, o polipeptídeo pode ser pelo menos 20%, 40%, 60% ou pelo menos 70% puro.

A quantidade de proteína total pode ser determinada 20 por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, o método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, "Official Methods of Analysis" 14^a ed., "Association of Official Analytical Chemists", Washington DC), e a quantidade do polipeptídeo da invenção pode ser determinada por SDS-PAGE e subsequente 25 varredura, também por métodos conhecidos na técnica.

Os polipeptídeos codificados por seqüências de ácidos 30 nucléicos da presente invenção também incluem polipeptídeos fundidos ou polipeptídeos cliváveis de fusão nos quais outro polipeptídeo é fundido no terminal N ou no terminal C do polipeptídeo ou fragmento deste. Um polipeptídeo fundido

é produzido por fusão de uma seqüência de ácidos nucleicos (ou uma porção desta) que codifica outro polipeptídeo a uma seqüência de ácidos nucleicos (ou uma porção desta) da presente invenção. As metodologias para a produção de polipeptídeos de fusão são conhecidas na técnica, e incluem a ligação das seqüências codificadoras que codificam os polipeptídeos de tal forma que estejam *in frame* e que a expressão do polipeptídeo fundido esteja sob controle do mesmo promotor e terminador.

Em uma modalidade específica, o polipeptídeo é uma variante com baixa capacidade alergênica, projetada para provocar uma resposta imunológica reduzida quando exposta aos animais, incluindo o homem. O termo "resposta imunológica" deve ser compreendido como qualquer reação pelo sistema imunológico de um animal exposto ao polipeptídeo. Um tipo de resposta imunológica é uma resposta alérgica que leve a níveis aumentados de IgE no animal exposto. Variantes com baixa capacidade alergênica podem ser preparadas com o uso de metodologias conhecidas na técnica. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser conjugado a porções de polímero que protegem porções ou epitopos do polipeptídeo envolvidas em uma resposta imunológica. A conjugação com polímeros pode envolver o acoplamento químico *in vitro* do polímero ao polipeptídeo, por exemplo, como descrito em WO 96/17929, WO 98/30682, WO 98/35026 e/ou WO 99/00489. Além disso, ou alternativamente, a conjugação pode envolver o acoplamento *in vivo* de polímeros ao polipeptídeo. Essa conjugação pode ser obtida por engenharia genética da seqüência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo. Outra forma de fornecer variantes

com baixa capacidade alergênica é a engenharia genética da seqüência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo de forma a fazer com que os polipeptídeos se auto-oligomerizem, fazendo com que monômeros do polipeptídeo possam proteger os epitopos de outros monômeros de polipeptídeo e, dessa forma, reduzir a antigenicidade dos oligômeros. Esses produtos e sua preparação são descritos, por exemplo, em WO 96/16177. Os epitopos envolvidos em uma resposta imunológica podem ser identificados por vários métodos, tais como o método de exibição de fago descrito em WO 00/26230 e WO 01/83559, ou a abordagem aleatória descrita em EP 561907. Após um epitopo ter sido identificado, sua seqüência de aminoácidos pode ser alterada para produzir propriedades imunológicas alteradas do polipeptídeo por técnicas conhecidas de manipulação de genes como, por exemplo, mutagênese sítio-dirigida (veja, por exemplo, WO 00/26230, WO 00/26354 e/ou WO 00/22103), e/ou a conjugação de um polímero pode ser feita em proximidade suficiente com o epitopo para que o polímero proteja o epitopo.

Ainda em um aspecto adicional, a invenção está relacionada ao uso, em ração animal, de uma cepa de *Bacillus*, cujo DNA, quando coletado e usado como um modelo de DNA em uma reação de PCR com os IDS. DE SEQ. N^{os}: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb. Esse teste serve para identificar cepas com um gene *L12-like*; veja o Exemplo 1 aqui apresentado. Essas cepas de *Bacillus* também podem ser usadas na preparação de uma composição para uso em ração animal como coccidiostática.

Em uma primeira modalidade particular, a cepa de *Bacillus* é um microorganismo probiótico. O termo "probiótico" geralmente se refere a uma bactéria não patogênica dada como alimento aos animais, incluindo pássaros, como uma forma de evitar a colonização por microorganismos patogênicos, por exemplo, protozoários. Probióticos também podem ser definidos como microorganismos vivos ou habitáveis que afetam beneficemente o equilíbrio intestinal de seres humanos e animais saudáveis e que funcionam normalmente.

Em uma segunda modalidade particular, a cepa de *Bacillus* é usada na forma de esporos. Esporos podem ser exosporos ou, preferivelmente, endosporos. Um endosporo é qualquer esporo que seja produzido dentro de um organismo (normalmente uma bactéria). Os endosporos podem sobreviver por períodos de estresse ambiental e são, portanto, capazes de sobreviver à passagem pelo ambiente inóspito (ácido) do trato gastrointestinal superior, somente exercendo seu efeito após alcançarem os intestinos, onde serão formadas as células vegetativas normais.

Em modalidades particulares adicionais, a cepa de *Bacillus* é uma cepa de *Bacillus licheniformis*, selecionada preferivelmente das seguintes cepas de *Bacillus licheniformis*: ATCC 14580 (= NCIB 9375), NCIMB 6346 (= DSM 8785), NCTC 1024, NCTC 1025, NCTC 2120, NCTC 7589, NCTC 9932, ATCC 21424, NCIMB 10689 e ATCC 53757. Um subgrupo preferido inclui *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (= NCIB 9375) e *Bacillus licheniformis* NCIMB 6346 (= DSM 8785).

O teste do Exemplo 1 é uma reação de PCR, nesse exemplo realizada com DNA isolado de várias cepas de

Bacillus licheniformis. Em uma modalidade particular desse teste, o DNA usado como modelo para a reação de PCR é DNA cromossômico que pode ser isolado por métodos conhecidos na técnica. O resultado do teste do Exemplo 1 é positivo quando é obtido um fragmento de PCR do tamanho correto. No Exemplo 1, o tamanho correto é indicado como 0,4 kb. Em uma modalidade particular, o tamanho correto está entre 0,35 kb e 0,44 kb (= 350 bp-440 bp). Em modalidades alternativas, o tamanho correto é 330-430 bp, 340-420 bp, 350-410 bp, 360-400 bp, 370-390 bp ou 385-395 bp. O tamanho da seqüência codificadora (CDS) do ID. DE SEQ. N°: 1 é de aproximadamente 380 bp (ou seja, 378 bp).

Seqüências isoladas de ácidos nucléicos que codificam os polipeptídeos como aqui definidos anteriormente, construções de ácido nucléico, vetores e células hospedeiras que compreendem as seqüências de ácidos nucléicos para a expressão e produção de polipeptídeos isolados como aqui definidos anteriormente, além de cepas probióticas como aqui exemplificadas anteriormente, são descritos em WO-A-2006/099871. O conteúdo dessa publicação, em particular variantes de polipeptídeos e cepas de acordo com as invenções e sua produção, é aqui incorporado por referência.

As composições de polipeptídeo podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos na técnica, e podem estar na forma de um líquido ou uma composição seca. Por exemplo, a composição de polipeptídeo pode estar na forma de um granulado ou um microgranulado. O polipeptídeo a ser incluído na composição pode ser estabilizado de acordo com métodos conhecidos na técnica.

Exemplos particulares de composições da invenção são os seguintes:

- Um aditivo de ração animal que compreende: (a) um polipeptídeo da invenção; e (b) pelo menos uma vitamina lipossolúvel, (c) pelo menos uma vitamina hidrossolúvel, (d) pelo menos um micromineral e/ou (e) pelo menos um macromineral;

- uma composição de ração animal que possui um teor bruto de proteína de 50 a 800 g/kg e que compreende um polipeptídeo da invenção;

- um aditivo de ração animal que compreende: (a) uma cepa de *Bacillus* como definida na seção intitulada "Cepas bacterianas; Cepas probióticas de *Bacillus*"; e (b) pelo menos uma vitamina lipossolúvel, (c) pelo menos uma vitamina hidrossolúvel, (d) pelo menos um micromineral e/ou (e) pelo menos um macromineral; e

- uma composição de ração animal que possui um teor bruto de proteína de 50 a 800 g/kg e que compreende uma cepa de *Bacillus* como definida na seção intitulada "Cepas bacterianas; Cepas probióticas de *Bacillus*".

As chamadas pré-misturas são exemplos de aditivos de ração animal da invenção. Uma pré-mistura designa uma mistura preferivelmente uniforme de um ou mais micro-ingredientes com diluente e/ou veículo. Pré-misturas são usadas para facilitar a dispersão uniforme de micro-ingredientes em uma mistura maior.

O termo "ração" ou "composição de ração" significa qualquer composto, preparação, mistura ou composição adequada ou destinada à ingestão por um animal.

No uso de acordo com a invenção, o polipeptídeo e/ou a

cepa de *Bacillus* pode ser administrado ao animal antes, depois ou simultaneamente com a dieta. Essa última forma é preferida.

Em uma modalidade particular, o polipeptídeo, na forma em que é adicionado à ração ou quando incluído em um aditivo de ração, é bem definido. O termo "bem definido" significa que a preparação de polipeptídeo é pelo menos 50% pura. Em outras modalidades particulares, a preparação de polipeptídeo bem definido é pelo menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 ou pelo menos 95% pura.

Uma preparação de polipeptídeo bem definido é vantajosa. Por exemplo, é bem mais fácil dosar corretamente na ração um polipeptídeo que seja essencialmente livre de outros polipeptídeos interferentes ou contaminantes. O termo "dosar corretamente" se refere, em particular, ao objetivo de obter resultados consistentes e constantes, e à capacidade de otimizar a dosagem com base no efeito desejado.

Para uso em ração animal, no entanto, o polipeptídeo não precisa ser tão puro; ele pode, por exemplo, incluir outros polipeptídeos como, por exemplo, enzimas de ração animal, quando então poderia ser denominada uma preparação de polipeptídeo.

A preparação de polipeptídeo pode ser: (a) adicionada diretamente à ração (ou usada diretamente em um processo de tratamento de proteínas) ou (b) usada na produção de uma ou mais composições intermediárias como, por exemplo, aditivos ou pré-misturas de ração, que é subsequente adicionada à ração (ou usada em um processo de tratamento). O grau de pureza descrito acima se refere à pureza da preparação de

polipeptídeo original, seja ela usada de acordo com (a) ou com (b) acima.

As preparações de polipeptídeo com purezas dessa ordem de magnitude são passíveis de obtenção, em particular, com o uso de métodos recombinantes de produção, enquanto não são obtidas tão facilmente e também são submetidas a uma variação de lote para lote bem maior quando o polipeptídeo é produzido por métodos tradicionais de fermentação.

O polipeptídeo pode ser adicionado à ração em qualquer forma, esteja ele como um polipeptídeo relativamente puro ou misturado com outros componentes destinados à adição à ração animal, ou seja, na forma de aditivos de ração animal, tais como as denominadas pré-misturas para ração animal.

Além do polipeptídeo e/ou da cepa de *Bacillus* da invenção, os aditivos de ração animal da invenção contêm pelo menos uma vitamina lipossolúvel e/ou pelo menos uma vitamina hidrossolúvel e/ou pelo menos um micromineral e/ou pelo menos um macromineral.

Além disso, ingredientes opcionais de aditivos de ração são agentes corantes, por exemplo, carotenóides, tais como beta-caroteno, astaxantina e luteína; compostos de aroma; estabilizantes; peptídeos antimicrobianos; outros coccidiostáticos; espécies reativas que geram oxigênio; e/ou pelo menos uma enzima selecionada entre fitase (EC 3.1.3.8 ou 3.1.3.26); xilanase (EC 3.2.1.8); galactanase (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidase (EC 3.2.1.22); protease (EC 3.4., fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipase A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipase (EC 3.1.1.5); fosfolipase C (EC 3.1.4.3); fosfolipase D (EC 3.1.4.4); amilase como, por

exemplo, alfa-amilase (EC 3.2.1.1); e/ou beta-glucanase (EC 3.2.1.4 ou EC 3.2.1.6).

Exemplos de peptídeos antimicrobianos (AMP's) são CAP18, Leucocina A, Tritripticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina e Ovispirina como, por exemplo, Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas e Estatinas, incluindo os compostos e polipeptídeos revelados em WO 03/044049 e WO 03/048148, assim como variantes ou fragmentos dos compostos acima que retenham a atividade antimicrobiana.

Exemplos de polipeptídeos antifúngicos (AFP's) são os peptídeos de *Aspergillus giganteus* e *Aspergillus niger*, bem como variantes e fragmentos destes que retenham atividade antifúngica, como revelado em WO 94/01459 e WO 02/090384.

Exemplos de outros coccidiostáticos que também podem ser usados são ionóforos, tais como lasalocida, monensina, salinomocina, maduramicina, senduramicina, e agentes químicos como amprólio, nicarbazina, diclazuril.

Como revelado em WO-A-2003/009700, foram descobertos ácidos graxos poliinsaturados que possuem também atividade coccidiostática. Portanto, em uma modalidade preferida particular da invenção, ingredientes de aditivos de ração adicionais são ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs).

A composição (ração animal) pode compreender de 0,001, 0,01 g ou 1 g, até 0,01 ou 100 g de PUFA por kg de ração, preferivelmente de 0,0001 a 100 g/kg. As quantidades podem ser até mesmo de 0,0001 até 0,1 g de PUFA por kg de ração, por exemplo, de 0,0025 (ou 0,05 ou 0,08) a 0,001 (ou 0,01 g) de PUFA por kg de ração. Tipicamente, a composição compreenderá de 0,002 a 0,01 g de PUFA por kg de ração,

preferivelmente de 0,0004 g a 0,08 g de PUFA por kg de ração.

As quantidades acima se referem ao peso do PUFA e, portanto, caso o PUFA seja adicionado na forma de um óleo (por exemplo, que possua de 30 a 40% do PUFA), então a quantidade de óleo presente (ou adicionada) pode ser calculada de acordo, por exemplo, por multiplicação da quantidade do PUFA por 100/X, em que X é a percentagem do PUFA no óleo. Desse modo, por exemplo, com um teor de PUFA de 30 (ou 35) até 40% (ou 45 ou 50%), a quantidade de óleo que pode ser adicionada pode variar proporcionalmente, por exemplo, de 0,00033 ou 0,00025 g até 330 ou 250 g de óleo por kg de ração.

O PUFA pode ser um PUFA simples ou dois ou mais PUFAs diferentes. Cada PUFA pode ser da família n-3 ou n-6. De preferência, ele é um PUFA C18, C20 ou C22. Ele pode ter pelo menos 18 átomos de carbono e 3 ligações duplas. O PUFA pode ser fornecido na forma de um ácido graxo livre, um sal, como um éster de ácido graxo (por exemplo, éster metílico ou etílico), como fosfolipídeos e/ou na forma de um mono-, di- ou triglicerídeo.

PUFAs (n-3 e n-6) adequados incluem:

- ácido docosahexaenóico (DHA, 22: 6Q3), adequadamente de algas ou fungos como, por exemplo, *Cryptocodinium* (dinoflagelado) ou *Thraustochytrium* (fungo);
- ácido γ -linolênico (GLA, 18: Ω 6);
- ácido α -linolênico (ALA, 18: Ω 3);
- ácido linoléico conjugado (ácido octadecadienóico, CLA);
- ácido di-homo- γ -linolênico (DGLA, 20: Ω 6);

- ácido araquidônico (ARA, 20: Ω 6); e
- ácido eicosapentaenóico (EPA, 20: 5 Ω 3).

PUFAs preferidos incluem ácido araquidônico (ARA), ácido docosohexaenóico (DHA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e/ou ácido γ -linoléico (GLA). Em particular, ARA é preferido.

O PUFA pode ser de uma fonte natural (por exemplo, vegetal ou marinha) ou pode ser derivado de uma fonte de célula única ou microbiana. Em particular, o PUFA pode ser produzido por uma bactéria, alga, fungo ou levedura. Os fungos são preferidos, preferivelmente da ordem *Mucorales*, por exemplo, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Aspergillus*, *Thraustochytrium*, *Pythium* ou *Entomophthora*. A fonte preferida de ARA é de *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora*, *Aspergillus terreus* ou *Pythium insidiosum*. As algas podem ser dinoflageladas e/ou incluem *Porphyridium*, *Nitzschia* ou *Crypthecodinium* (por exemplo, *Crypthecodinium cohnii*). As leveduras incluem aquelas do gênero *Pichia* ou *Saccharomyces* como, por exemplo, *Pichia ciferii*. As bactérias podem ser do gênero *Propionibacterium*.

O PUFA pode estar presente ou ser adicionado à composição como um óleo (por exemplo, comestível). O óleo pode ser um líquido (em temperatura ambiente). O óleo pode ser um óleo microbiano (por exemplo, célula única), marinho (por exemplo, de atum) ou um óleo vegetal. Um óleo adequado que inclui ARA é disponível por DSM N.V., Alexander Fleminglaan 1 ou Wateringseweg 1, Caixa Postal 1.2600 MA Delft, Holanda, sob o nome comercial VEVODAR. Outro óleo disponível comercialmente (ARA) é ARASCO de Martek Corporation, 6480 Dobbin Road, Columbia, MD 21045, Estados

Unidos. Outros PUFAs são disponíveis, por exemplo, DHA como um óleo de DHA (DHASCO de Martek Corporation ou DHA de Pronova, Noruega, sob o nome comercial PAX).

Diversos documentos descrevem a produção de óleos brutos de PUFA. Óleos microbianos que contêm ARA são revelados em WO-A-92/13086 (Martek), EPA em WO-A-91/14427 (Martek) e DHA em WO-A-91/11918 (Martek). Vários métodos para a extração de óleos de PUFA de fontes microbianas podem ser encontrados em WO-A-97/36996 e WO-A-97/37032 (ambos para Gist-brocades). A preparação de óleos que contêm ARA, DHA e EPA também é revelada em WO-A-92/12711 (Martek).

Prefere-se que a maior parte do PUFA esteja na forma de triglicerídeos. Dessa forma, preferivelmente pelo menos 50%, por exemplo, pelo menos 60% ou, otimamente, pelo menos 70% do PUFA está na forma de triglicerídeo. No entanto, a quantidade de triglicerídeos pode ser maior como, por exemplo, pelo menos 85%, preferivelmente pelo menos 90%, otimamente pelo menos 95% ou 98% do óleo.

De preferência, o aditivo ou a pré-mistura compreende de 10 a 1.000, por exemplo, de 25 ou 50 a 750, preferivelmente de 75 ou 100 a 250 ou 500 vezes do PUFA (ou de outros componentes, por exemplo, enzimas) como ração. Isso ocorre porque a pré-mistura pode ser "diluída" por um fator de 10 a 1.000 (de tal modo que a pré-mistura constitua de 10% a 0,1% da ração final) quando se produz a ração animal. Dessa forma, qualquer um desses números pode ser usado para multiplicar os valores (máximos e/ou mínimos) das quantidades do PUFA definidos na seção seguinte para se obter concentrações do PUFA na pré-

mistura. Como uma faixa ampla, no entanto, a concentração pode ser de 1 a 100 g/kg. A pré-mistura pode estar na forma de grânulos ou péletes.

Exemplos de espécies reativas que geram oxigênio são substâncias químicas como, por exemplo, perborato, persulfato ou percarbonato; e enzimas como, por exemplo, uma oxidase, uma oxigenase ou uma sintetase.

Normalmente, vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis, além de microminerais, formam parte de uma denominada pré-mistura destinada à adição à ração, enquanto macrominerais são normalmente adicionados separadamente à ração. Qualquer um desses tipos de composição, quando enriquecidos com um polipeptídeo ou uma cepa de *Bacillus* da invenção, é um aditivo de ração animal da invenção.

A seguir, serão apresentadas listas não exclusivas de exemplos desses componentes:

- Exemplos de vitaminas lipossolúveis são vitamina A, vitamina D3, vitamina E e vitamina K, por exemplo, vitamina K3.

- Exemplos de vitaminas hidrossolúveis são vitamina B12, biotina e colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico e pantotenato, por exemplo, Ca-D-pantotenato.

- Exemplos de microminerais são manganês, zinco, ferro, cobre, iodo, selênio e cobalto.

- Exemplos de macrominerais são cálcio, fósforo e sódio.

As necessidades nutricionais desses componentes (exemplificadas com aves e leitões/porcos) estão listadas na Tabela A de WO 01/58275. Necessidade nutricional

significa que esses componentes devem ser fornecidos na dieta nas concentrações indicadas.

Composições de ração animal ou dietas possuem um teor relativamente elevado de proteína. As dietas de aves e de porcos podem ser caracterizadas como indicado na Tabela B de WO 01/58275, colunas 2-3. As dietas de peixes podem ser caracterizadas como indicado na coluna 4 dessa Tabela B. Além disso, essas dietas de peixes normalmente possuem um teor de gordura bruto de 200-310 g/kg.

WO 01/58275 corresponde à U.S. 09/779334, que é aqui incorporada por referência.

Uma composição de ração animal de acordo com a invenção possui um teor bruto de proteína de 50-800 g/kg e, além disso, compreende pelo menos um polipeptídeo e/ou pelo menos uma cepa de *Bacillus*, como aqui descrito e/ou reivindicado.

Em uma modalidade particular, a composição de ração animal da invenção contém pelo menos uma proteína vegetal ou fonte de proteína vegetal. Ela também pode conter proteína animal, por exemplo, farelo de carne e farelo de osso e/ou farelo de peixe, tipicamente em uma quantidade de 0-25%. O termo "proteínas vegetais", como aqui usado, refere-se a qualquer composto, composição, preparação ou mistura que inclua pelo menos uma proteína derivada ou originária de um vegetal, incluindo proteínas modificadas e derivados de proteína. Em modalidades particulares, o teor de proteína das proteínas vegetais é de pelo menos 10, 20, 30, 40, 50 ou 60% (p/p).

Proteínas vegetais podem ser derivadas de fontes de proteína vegetal, tais como legumes e cereais, por exemplo,

materiais de plantas das famílias *Fabaceae* (leguminosas), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* e *Poaceae*, tais como farelo de soja, farelo de tremoço e farelo de canola. Em uma modalidade particular, a fonte de proteína vegetal é material de uma ou mais plantas da família *Fabaceae*, por exemplo, soja, tremoço, ervilha ou feijão. Em outra modalidade particular, a fonte de proteína vegetal é material de uma ou mais plantas da família *Chenopodiaceae*, por exemplo, beterraba, cana de açúcar, espinafre ou quinoa.

Dietas animais podem ser fabricadas, por exemplo, como ração em purê (não peletizada) ou ração peletizada. Tipicamente, os produtos de ração moída são misturados e são adicionadas quantidades suficientes de vitaminas e minerais essenciais, de acordo com as especificações para a espécie em questão. O(s) polipeptídeo(s) e/ou a cepa de *Bacillus* podem ser adicionados como formulações sólidas ou líquidas. Por exemplo, uma formulação de polipeptídeo sólida é adicionada tipicamente antes ou durante a etapa de mistura; e uma preparação de polipeptídeo líquida é adicionada tipicamente após a etapa de peletização. O polipeptídeo também pode ser incorporado em um aditivo ou pré-mistura de ração.

A concentração final de polipeptídeo na dieta está dentro da faixa de 0,01-200 mg de proteína por kg de dieta, por exemplo, na faixa de 0,1-20 mg de proteína por kg de dieta animal.

O polipeptídeo e/ou a cepa de *Bacillus* devem, evidentemente, ser aplicados em uma quantidade eficaz, ou seja, em uma quantidade adequada para melhorar a conversão

de ração.

Atualmente, contempla-se que o polipeptídeo seja administrado em uma ou mais das seguintes quantidades (faixas de dosagem): 0,01-200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,05-50; 1-10; ou 0,10-10; todas essas faixas estando em mg de proteína de polipeptídeo por kg de ração (ppm). Em uma modalidade particular, a faixa de dosagem é de 1-9, 1-8, 2-7, 2-6 ou 2-5 ppm. Exemplos de faixas de dosagem particularmente preferidas são 0,5-15,0, 1,0-12,5, 1,5-10,0 e 2,5-7,5 ppm.

Atualmente, contempla-se que a cepa de *Bacillus* é administrada em uma ou mais das seguintes quantidades (faixas de dosagem): 10 E2-14, 10 E4-12, 10 E6-10, 10 E7-9, preferivelmente 10 E8 CFU/g de ração (a designação "E" significando expoente, ou seja, por exemplo, 10 E2-14 significa 10^2 - 10^{14}).

Para a determinação de mg de proteína de polipeptídeo por kg de ração, o polipeptídeo é purificado da composição de ração, e a dosagem em mg de proteína de polipeptídeo por kg de ração é calculada, por exemplo, como descrito no Exemplo 10 de WO-A-2006/099871. Os mesmos princípios se aplicam para a determinação de mg de proteína de polipeptídeo em aditivos de ração.

A invenção aqui descrita e reivindicada não deve ter seu escopo limitado pelas modalidades específicas aqui reveladas, já que essas modalidades se destinam a ilustrar vários aspectos da invenção. Quaisquer modalidades equivalentes devem ser consideradas como incluídas dentro do escopo desta invenção. Na verdade, várias modificações da invenção, além daquelas aqui mostradas e descritas,

ficarão evidentes para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição apresentada anteriormente. Essas modificações também devem ser consideradas como incluídas dentro do escopo das reivindicações em anexo. No caso de conflito, a presente revelação, incluindo suas definições, deve prevalecer.

Exemplo 1: Cepas de *Bacillus* com genes L12-like, como identificadas por PCR

Genes similares ao gene que codifica a proteína L12 (ID. DE SEQ. N°: 1) foram identificados em várias outras cepas de *Bacillus licheniformis* por PCR. O DNA para uso como modelo para a reação de PCR foi isolado de onze cepas diferentes de *Bacillus licheniformis* desenvolvidas de um dia para o outro a 37°C em placas de ágar TY. Tubos de inoculação com células de cada cepa foram suspensos em 0,1 ml de H₂O e fervidos por 10 min, centrifugados, e 5 microlitros de sobrenadante de cada foram usados como modelo de DNA em reações de PCR, como descrito abaixo.

As reações de PCR foram executadas em glóbulos "Pure Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads" de Amersham Biosciences: 5 microlitros de modelo de DNA + 2 x 1 microlitro de iniciadores Pep481 (ID. DE SEQ. N°: 6) e Pep482 (ID. DE SEQ. N°: 7) + 18 microlitros de H₂O.

Programa de PCR: 1) 95°C por 3 min; 2) 95°C por 10 seg; 3) 65°C por 30 seg -1°C pr. ciclo; 4) 72°C por 1 min; 5) Ir para (2) 9 vezes; 6) 95°C por 10 seg; 7) 55°C por 30 seg; 8) 72°C por 1 min; 9) Ir para (6) 19 vezes; 10) 72°C por 5 min; 11) 4°C sempre, o que significa que de acordo com a etapa 10) a temperatura é reduzida para 4°C.

30 Iniciadores:

Pep481 AATTACGCGTGTGGTGGCGATAGTAGTAACG-3' (ID. DE SEQ. N°: 6)

Pep482 TTAAGAATTCGAATGAAAGAGGAGGAATG-3' (ID. DE SEQ. N°: 7)

5 O fragmento de PCR de 0,4 kb resultante de cinco cepas positivas ("positivo" significando que gera banda de DNA do tamanho correto) foi purificado e usado em um experimento de seqüenciamento de DNA, usando novamente como iniciadores de seqüência os iniciadores Pep481 (ID. DE SEQ. N°: 6) e
10 Pep482 (ID. DE SEQ. N°: 7).

Três das cinco cepas positivas geraram a mesma seqüência de DNA: *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus licheniformis* NCIMB 6346 (= DSM 8785) e *Bacillus licheniformis* cepa 712, resultando na seqüência de
15 aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 2. Em *Bacillus licheniformis* cepa 470, mudanças de DNA resultaram em duas mudanças de aminoácidos (ID. DE SEQ. N°: 9); no entanto, nenhuma no peptídeo maduro. Em *Bacillus licheniformis* cepa 009, as
20 mudanças de DNA resultaram em quinze mudanças de aminoácidos (ID. DE SEQ. N°: 8), das quais oito no peptídeo maduro. Além disso, uma seqüência de consenso (ID. DE SEQ. N°: 10) foi derivada dos IDS. DE SEQ. N°s: 2, 8 e 9.

Observe que, neste experimento, os nucleotídeos que codificam os sete aminoácidos do terminal C do ID. DE SEQ.
25 N°: 2 estão incluídos no iniciador Pep481 (ID. DE SEQ. N°: 6), e os sete resíduos de aminoácido do terminal C do ID. DE SEQ. N°s: 8-9 podem, portanto, não ser corretos. No entanto, a exatidão dos IDS. DE SEQ. N°s: 8-9 foi confirmada posteriormente.

30 Uma cepa de *Bacillus licheniformis* que foi isolada do

produto probiótico de ração designado BioPlus™2B (oferecido por Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Allé, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca) foi incluída entre as onze cepas testadas, mas foi negativa.

5 Além disso, 44 outras cepas de *Bacillus licheniformis* foram testadas da forma descrita acima. Uma resposta de PCR positiva foi encontrada em 27 dessas cepas. Exemplos de cepas de *Bacillus licheniformis* adicionais disponíveis publicamente que foram constatadas positivas para L12
10 possuem os seguintes números de depósito: NCTC 1024, NCTC 1025, NCTC 2120, NCTC 7589, NCTC 9932, ATCC 21424, NCIMB 10689, ATCC 53757. NCTC é a "National Collection of Type Cultures". ATCC é a "American Type Culture Collection". NCIMB é a "National Collection of Industrial, Marine and
15 Food Bacteria".

Exemplo 2: Ração animal e aditivo

Aditivo de ração animal

Um aditivo de ração animal é preparado por adição de 25 g de um granulado T revestido que compreende a proteína
20 L12 purificada em uma quantidade de 20 g/kg (preparada como descrito no Exemplo 3 de EP 569468 B1; no entanto, com um revestimento de aproximadamente 7% de óleo hidrogenado de palma e aproximadamente 13% de CaCO₃) à seguinte pré-mistura (por quilo de pré-mistura):

| | | |
|----|--------------|------------------|
| 25 | 1.100.000 IE | Vitamina A |
| | 300.000 IE | Vitamina D3 |
| | 4.000 IE | Vitamina E |
| | 250 mg | Vitamina B1 |
| | 800 mg | Vitamina B2 |
| 30 | 1.200 mg | Ca-D-Pantotenato |

| | | |
|----|-----------|----------------------------|
| | 500 mg | Vitamina B6 |
| | 2,5 mg | Vitamina B12 |
| | 5.000 mg | Niacina |
| | 10.000 mg | Vitamina C |
| 5 | 300 mg | Vitamina K3 |
| | 15 mg | Biotina |
| | 150 mg | Ácido fólico |
| | 50.004 mg | Cloreto de colina |
| | 6.000 mg | Fe |
| 10 | 3.000 mg | Cu |
| | 5.400 mg | Zn |
| | 8.000 mg | Mn |
| | 124 mg | I |
| | 60 mg | Co |
| 15 | 29,7 mg | Se |
| | 9.000 mg | Lasalocida sódica (Avatec) |
| | 17,3% | Ca |
| | 0,8% | Mg |
| | 11,7% | Na |

20 *Ração animal*

Uma dieta para crescimento de frangos que possui a composição (% p/p) apresentada a seguir é preparada por mistura dos ingredientes. Trigo, centeio e SBM 48 são disponíveis por Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, França. Após mistura, a ração é peletizada em uma temperatura desejada, por exemplo, cerca de 70°C (3 x 25 mm).

| | | |
|----|-------------------------|-------|
| | Trigo | 46,00 |
| | Centeio | 15,00 |
| 30 | Farelo de soja (SBM 48) | 30,73 |

| | | |
|---|---------------------------------|------|
| | Óleo de soja | 4,90 |
| | DL-Metionina | 0,04 |
| | DCP (fosfato dicálcico) | 1,65 |
| | Calcário | 0,43 |
| 5 | Sal | 0,15 |
| | TiO ₂ | 0,10 |
| | Aditivo de ração animal (acima) | 1,00 |

A ração animal resultante compreende 5,0 mg de proteína L12 purificada por kg (5 ppm).

10 Composições adicionais de ração animal e de aditivo de ração são preparadas da mesma forma; no entanto, substituindo 25 g de granulado L12 CT revestido por kg da pré-mistura com 10^{13} unidades formadoras de colônia (CFU), preferivelmente na forma de endosporos, de *Bacillus*
15 *licheniformis* ATCC 14580, o que resulta em uma ração animal com aproximadamente 10^8 CFU por g da composição de ração.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.
 5 <120> USO DE PEPTÍDEOS COMO COCCIDIOSTÁTICOS E/OU HITOMONOSTÁTICOS
 <130> 25856WO
 <140> PCT/EP2007/011059
 10 <141> 17-12-2007
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.3
 15 <210> 1
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Bacillus licheniformis ATCC 14580
 20
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(378)
 25 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (124)..(378)
 30 <400> 1
 atg aaa aat cat ttg tat gag aaa aaa aag agg aaa cct ttg act cgg 48
 Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
 -40 -35 -30
 35 aca att aaa gcg acg ctc gcc gtg ttg aca atg tcc atc gct ttg gtg 96
 Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
 -25 -20 -15 -10
 40 gga ggc gct acg gtg cct tca ttt gca tgg gtg aat ccg ggt tat cac 144
 Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
 -5 -1 1 5
 45 tac cag tac cca tcg gaa ggt ggt aca tgg agg tat gga ttc gta aac 192
 Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
 10 15 20
 50 gcc ggg ctc cgt tca gag tac aac cac ccg aca aag gtc cac ggc tcg 240
 Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
 25 30 35
 55 aca gtg caa aag ctc atc gat gga aaa gtg gat aaa acg aat aga agt 288
 Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
 40 45 50 55
 60 att gat acg gct gcg ggc cgc tac tct aat gcc tat gtc gga gcc ata 336
 Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
 60 65 70
 60 aac tca cct ggt ctt aag ggt cgt tac tac tat cgc acc aac taa 381
 Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
 75 80 85

| | | |
|----|--|------|
| | ggtcactaac cgaatgcagt aaaggacact gtggtgcttg ccagccatta gggatttgag | 360 |
| 5 | gaggtgatca aaatgctagg tgacagtatt tcgtcgaagt ggacaagtcg tgaccaaagt | 420 |
| | acctcggatc gagggttggt catggaggaa aaaattgatg tctggtgaca aagaggagtc | 480 |
| | atgatcatgg caccgccaac gagggaaaaa actcttcccg catcgacacg gtatgtgggc | 540 |
| 10 | ggtgacaaac taacttatag agtaaattta ttagtcgaat gaaagaggag gaatgaaata | 600 |
| | atg aaa aat cat ttg tat gag aaa aaa aag agg aaa cct ttg act cgg | 648 |
| 15 | Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg | |
| | 1 5 10 15 | |
| | aca att aaa gcg acg ctc gcc gtg ttg aca atg tcc atc gct ttg gtg | 696 |
| | Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val | |
| | 20 25 30 | |
| 20 | gga ggc gct acg gtg cct tca ttt gca tgg gtg aat ccg ggt tat cac | 744 |
| | Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His | |
| | 35 40 45 | |
| 25 | tac cag tac cca tcg gaa ggt ggt aca tgg agg tat gga ttc gta aac | 792 |
| | Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn | |
| | 50 55 60 | |
| | gcc ggg ctc cgt tca gag tac aac cac ccg aca aag gtc cac ggc tcg | 840 |
| 30 | Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser | |
| | 65 70 75 80 | |
| | aca gtg caa aag ctc atc gat gga aaa gtg gat aaa acg aat aga agt | 888 |
| 35 | Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser | |
| | 85 90 95 | |
| | att gat acg gct gcg ggc cgc tac tct aat gcc tat gtc gga gcc ata | 936 |
| | Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile | |
| | 100 105 110 | |
| 40 | aac tca cct ggt ctt aag ggt cgt tac tac tat cgc acc aac | 978 |
| | Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn | |
| | 115 120 125 | |
| 45 | taatcaaagg gaaaacgggt gctgtcaacg gggctagcat ggcaagacc agaaaagttc | 1038 |
| | tgggagatcc cgctttgcat aagcgtatta tagtggatga cgcgggcttt gttgtttaca | 1098 |
| | cttcttgac ctgctgacgg caatcatccc tatctatgaa atcgagattt cagcaggccg | 1158 |
| 50 | ttattttcga gagagttaa tctatattca ttgtttttat tttggtaagg acataccgga | 1218 |
| | ttttaggttt ggattaccgg tcgagttagc ttgtcttttc gccactacc gtgtcgatgc | 1278 |
| 55 | gggagcaatt taccagaagc acttaccgat tgatagtttt ttattccggt gattgcaaag | 1338 |
| | tttcataaac tctgagaatt caataggggt aataccccgc tttgaggggc gcggcatttt | 1398 |
| | atgcgccccg agtattttatt cttaaaattt ttaaattaat gtatctatat aaaaaggaga | 1458 |
| 60 | tgctttcggg gtactgccaa agcatctcca caaagatag tgcatatctg caggaaaaaa | 1518 |

cataaaatgc aactaacatt tttttggaaa gcaatagggtt tatttaattt tgtagtttta 1578

tct 1581

5

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

10

<400> 4

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

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

40

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

45

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

50

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

55

<400> 5

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

60

<210> 6

```

<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
  <223> Iniciador Pep 481

<220>
10 <221> misc_feature
  <223> Iniciador

<400> 6
15 aattacgcgt gttggtgcca tagtagtaac g 31

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
20 <213> Artificial

<220>
  <223> Iniciador Pep 482

25 <220>
  <221> misc_feature
  <223> Iniciador

30 <400> 7
  ttaagaattc gaatgaaaga ggaggaatg 29

<210> 8
35 <211> 125
  <212> PRT
  <213> Cepa de Bacillus licheniformis 009

40 <220>
  <221> mat_peptide
  <222> (41)..(125)

<400> 8
45 Met Lys Asn Leu Leu Asn Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg Thr
  -40 -35 -30 -25

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

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

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

```

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

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

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

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

<210> 9
 <211> 126
 <212> PRT
 20 <213> Cepa de Bacillus licheniformis 470

<220>
 <221> mat_peptide
 25 <222> (42)..(126)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

60 <210> 10

```

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

5  <220>
   <223> Consensus sequence

   <220>
10 <221> mat_peptide
   <222> (42)..(126)

   <400> 10

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

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

   Gly Gly Ala Thr Val Pro Ala Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
25 -5 -1 1 5

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

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

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

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

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

```

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um polipeptídeo isolado caracterizado por ser selecionado do grupo que consiste em:

(a) um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que possui um grau de identidade para os aminoácidos 1-85 do ID. DE SEQ. N°: 2 de pelo menos 33%;

(b) um polipeptídeo que é codificado por uma seqüência de ácidos nucléicos que hibridiza sob condições de baixo rigor com:

10 (i) nucleotídeos 124-378 do ID. DE SEQ. N°: 1,

(ii) uma subseqüência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, ou

(iii) uma fita complementar de (i) ou (ii);

(c) uma variante do polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácidos dos aminoácidos 1-85 do ID. DE SEQ. N°: 2 que compreende uma substituição, eliminação, extensão e/ou inserção de um ou mais aminoácidos;

(d) uma variante alélica de (a) ou (b); e

(e) um fragmento de (a), (b), (c) ou (d);

20 como ou para a preparação de um coccidiostático e/ou histomonostático.

2. Uso em ração animal de uma cepa de *Bacillus*, caracterizado pelo fato de que o DNA da referida cepa, quando coletado e usado como modelo de DNA em uma reação de PCR com os IDS. DE SEQ. N°s: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb, como um coccidiostático e/ou histomonostático.

3. Uso de coccidiostático e/ou histomonostático, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por ser em

30

uma ração animal.

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo isolado é combinado com pelo menos um ácido graxo poliinsaturado (PUFA), que possui atividade coccidiostática e/ou é ativo contra coccídeos.

5. Uso de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, ou de uma cepa de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por ser na fabricação de uma ração animal ou um aditivo de ração para o tratamento ou profilaxia de coccidiose e/ou histomoníase.

6. Composição de ração animal ou uma composição de aditivo ou pré-mistura desta, caracterizada por compreender um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou uma cepa de *Bacillus* de acordo com a reivindicação 2 como um coccidiostático e/ou histomonostático.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por ainda compreender pelo menos um ácido graxo poliinsaturado (PUFA).

8. Composição de aditivo ou pré-mistura para uma composição de ração animal, caracterizada por compreender um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou uma cepa de *Bacillus* de acordo com a reivindicação 2 como um coccidiostático.

RESUMO**USO DE PEPTÍDEOS COMO COCCIDIOSTÁTICOS E/OU
HITOMONOSTÁTICOS**

A presente invenção está relacionada ao uso de
5 polipeptídeos isolados como um coccidiostático e/ou como um
histomonostático. Um exemplo de um polipeptídeo da invenção
é a denominada proteína L12 de *Bacillus licheniformis* ATCC
14580. A invenção ainda está relacionada ao uso probiótico
de cepas de *Bacillus*, que produzem proteínas relacionadas à
10 L12.