

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



PCT



(43) Fecha de publicación internacional
19 de Julio de 2007 (19.07.2007)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/080203 AI

(51) **Clasificación Internacional de Patentes:**
C12N 15/85 (2006.01) **A61P 31/00** (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(21) **Número de la solicitud internacional:**
PCT/ES2007/000006

(22) **Fecha de presentación internacional:**
10 de Enero de 2007 (10.01.2007)

(25) **Idioma de presentación:** español

(26) **Idioma de publicación:** español

(30) **Datos relativos a la prioridad:**
P200600053 11 de Enero de 2006 (11.01.2006) ES

(71) **Solicitante** (para todos los Estados designados salvo US):
**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)**
[ES/ES]; Ctra. de la Corana, km, 7,5, E-28040 MADRID
(ES).

(72) **Inventor; e**

(75) **Inventor/Solicitante** (para US solamente): **COLL
MORALES, Julio** [ES/ES]; Ctra.de la Corana, Km, 7,5,
E-28040 Madrid (ES).

(74) **Mandatario:** **GONZÁLEZ PALMERO, Fe;** Sagasta, 4,
E-28004 Madrid (ES).

(81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW

(84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) **Title:** GENE CONSTRUCT, VECTOR AND DNA VACCINE FOR THE VACCINATION OF AQUATIC ANIMALS

(54) **Título:** CONSTRUCCIÓN GENICA, VECTOR Y VACUNA DE ADN PARA LA VACUNACIÓN DE ANIMALES ACUÁTICOS

(57) **Abstract:** Improvements made to the subject matter of patent application No. P200402093, which relates to the immunization of aquatic animals against infection caused by viral, bacterial or parasitic pathogens, by means of the use of DNA-expression systems (vectors) that comprise a potentiating 5' sequence, a promoter and a nucleic acid sequence that codes for an immunogenic peptide of a pathogen of an aquatic animal. Optionally, the DNA-expression system contains elements of a transposon, which, unlike the vector used in said patent application, increases not only the intensity of expression but also its duration.

(57) **Resumen:** Mejoras introducidas en el objeto de la solicitud de patente N° P200402093 relativa a la inmunización de animales acuáticos frente a la infección causada por patógenos virales, bacterianos o parásitos mediante el empleo de sistemas de expresión de ADN (vectores) que comprenden una secuencia 5' potenciadora, un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático. Opcionalmente el sistema de expresión de ADN contiene elementos de un transposón, que a diferencia del vector utilizado en dicha solicitud de patente aumenta tanto la intensidad de la expresión como su duración.



WO 2007/080203 AI

"CONSTRUCCIÓN GÉNICA, VECTOR Y VACUNA DE ADN PARA LA VACUNACIÓN DE ANIMALES ACUÁTICOS"

DESCRIPCIÓN

5

Mejoras introducidas en el objeto de la solicitud de patente española n° P200402093 por "Construcción génica, vector y vacuna de ADN para la vacunación de animales acuáticos"

10 **Campo de la invención**

Mejoras introducidas en el objeto de la solicitud de patente N° P200402093 relativa a la inmunización de animales acuáticos frente a la infección causada por patógenos virales, bacterianos o parásitos mediante el empleo de sistemas de expresión de ADN (vectores) que comprenden una secuencia 5' potenciadora, un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático. Opcionalmente el sistema de expresión de ADN es una modificación de la secuencia 5¹ potenciadora por la inclusión de secuencias exógenas tales como las provenientes de transposones y otros elementos, que a diferencia del vector utilizado en dicha solicitud de patente aumentan tanto la intensidad de la expresión como su duración.

Antecedentes de la invención

25 La solicitud de patente española P200402093 describe el empleo de sistemas de expresión de ADN que comprenden una secuencia 5' potenciadora, un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático. La invención además describe la administración de dichos sistemas de expresión de ADN a dichos animales acuáticos.

30

El presente certificado de adición propone unas mejoras sobre el objeto de la patente principal P200402093. Dichas mejoras se refieren a la utilización de secuencias 5' potenciadoras por la inclusión de secuencias exógenas tales como las provenientes de transposones y otros elementos para su utilización como vectores para la vacunación
5 DNA en peces.

Los transposones son secuencias de DNA que se encuentran en los genomas de muchas especies vivas que tienen la capacidad de excindirse del genoma, saltar e integrarse en una nueva localización (Tafalla et al., 2005a, Tafalla et al., 2005b).
10 Poseen elementos potenciadores que pueden utilizarse como compoentes de la región 5' poyenciadora.

Los transposones activos son secuencias DNA de miles de bases que contienen una enzima o transposasa para su movilización y dos pequeñas secuencias repetidas de
15 cientos de bases que flanquean la transposasa (inverted terminal repeats, ITR o long terminal repeats, LTR). En la figura 1 se esquematizan varios tipos de transposones (retroposones, TcI-like, Tol2, y retrovirus) que se han descrito en peces. A su vez las ITR (-200 bp) y LTR (~ 600 bp) contienen numerosos elementos de 8-12 bp agrupados en repeticiones de 18-22bp. En la Figura 2 se esquematizan algunos de los
20 elementos que forman el promotor de CMV largo. Dichos elementos son secuencias que ligan proteínas que potencian la actividad del promotor o factores de transcripción. Todos estas secuencias pueden utilizarse como elementos 5' potenciadores del promotor.

25 Encontrar transposasas e ITR/LTR completos entre los miles de copias que existen en el genoma de vertebrados (incluidos peces) es muy difícil debido al fondo que existe de copias incompletas o defectivas que se encuentran en mayoría entre ellas. Aunque la mayoría de los transposones descritos en peces también están inactivados, existen copias completas hipotéticamente activas en transposones TcI-like en peces
30 planos (Tppl, Pleuronectes platessa) (Leaver, 2001) y en truchas del genero Salvelinus (Tsnl, Salvelinus namaycush) (Reed, 1999). Incluso se ha demostrado transposición activa en el pez cebra (TcI-like TE: Tzfl, zebrafish) (Lam et al, 1996)

y en medaka (hAT-like TE: Tol2, *Oryzias latipes*) (Koga et al, 1996) (Tablal). Entre los retrovirus se han descrito algunos activos tales como el Walleye dermal sarcoma virus WDSV (Zhang et al, 1999), pero parece que la mayoría están inactivos tales como el zebrafish endogenous retrovirus ZFREV (Shen, et al, 2004).

5

Tabla 1. Principales transposones de peces

Tipo	Nomb.	Grupo de peces	tam, * bp	tr, *bp	Nº copias por genoma haploide	activo	GenBank number	referencia
Retro	Smal	<i>Oncorhynchus</i> <i>sp</i>	200	7 DTR	10000- 100000	?	D90289-D90300	(Kido et al., 1994)
	FokI	<i>Salvelinus</i> <i>sp</i>	200	7 DTR	10000- 100000	?	D90289-D90300	(Kido et al., 1994)
	HpaI	<i>Salmonidae</i>	200	7 DTR	10000- 100000	?	D32145-D32164	(Kido et al., 1994)
	AFC	<i>Cichlids</i>	300	-	2000-10000	?	AB009699- AB009714	(TakaHashi et al., 1998)
	RomI	<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>	600	20 DTR	4000	?	-----	(Winkfein et al., 1988)
Td	Tip1	<i>[ctalurus</i> <i>Qunctatus</i>	1135	85 ITR	?	?	X52617	(Henikoff, 1992)
	Tes1	<i>Eptatretis</i> <i>touti</i>	1499	66 ITR	?	?	M93037- M93040	(Heierhorst et al., 1992)
	Ssali SALT	<i>Salmo</i> <i>salar</i>	1535	35 ITR	15000	no	L22865	(Goodier & Davidson, 1994)
	TeH	<i>Esoxjucius</i>	1009	223 ITR	?	no	L41 172	(Ivics et al., 1996a)
	Tdr1	<i>Danto</i> <i>erio</i>	1205	208 ITR	1000	no	L12210 L33472.L33469	(Radice et al., 1994) (Izsvak et al., 1995)
	Tdr2	<i>Danto</i> <i>erio</i>	1100	100 ITR	1000	no	AJ242983 L48874	(Gottgens et al., 1999) (Ivics et al., 1996a)
	Tcd	<i>Cyprinus</i> <i>carpto</i>	866	209 ITR	?	no	L48683	(Ivics et al., 1996a)
	Tcchi	<i>Chtonodraco</i> <i>hamatus</i>	802	80	?	no	AF305833 AY008266	(Capriglione et al., 2002)
	Tom1	<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>	1689	221 ITR	?	no	L12209	(Radice et al., 1994)
	Tss1 Tss2	<i>Salmo</i> <i>salar</i>	1619	226 ITR	?	no	L12206-L12208 L22865	(Radice et al., 1994) (Ivics et al., 1996a)
	Tpp1 PPTN	<i>Pleuronectes</i> <i>glatessa</i>	1627	200 ITR	150	yes?	AJ249083, AJ249085, etc	(Leaver, 2001)
	Tsn1	<i>Salvelinus</i> <i>namaycush</i>	1643	225 ITR	many	yes?	AF01 7232-34	(Reed, 1999)
	SB10	<i>Salmo salar</i> + <i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>	1639	225 ITR	synthetic	yes	-----	(Ivics et al., 1997)
	Tzf1	<i>ZebraFish</i> <i>Danio rerio</i>	1600	200 ITR	700	yes	U51226-U51230	(Lam et al., 1996)
hAT	Tol2	<i>Oryzias</i> <i>latipes</i>	4700	12 ITR	10-30	yes	D84375	(Koga et al., 1996)
retro virus	WDSV	<i>Stizostedion</i> <i>vitreum</i>	12000	590 LTR	1	yes	AF033822	(Zhang et al, 1999)
	ZFER V	<i>ZebraFish</i> <i>Danto rerio</i>	12000	694 LTR	1	?	AF503912	(Shen, et al, 2004).

.T, TE. TR, terminal repeats. ITR, inverted tr. DTR, direct TR. LTR, long terminal repeats.

. * bp, tamaños en pares de bases aproximados
. subrayados, las iniciales tomadas para la nomenclatura de los transposones
. en negritas, los transposones de peces activos

5

La mayor utilización de transposasas activas se ha estudiado en células de mamífero: humanas, de ratón y en peces modelo tales como el pez cebra y el medaka.

10 Dos transposones activos de peces se han estudiado en detalle: el SB que se "resucitó" por ingeniería genética (Ivics et al., 1997) y el Tol2 que se aisló de un gen insertado por el transposón activo (Iida et al., 2004, Kawakami et al., 2004, Kawakami & Shima, 1999). Dos retrovirus se han descrito en peces: el WDSV [Zhang, 1999 #3394] y el ZFREV [Shen, 2004 #2813].

15 El transposón activo de salmón "Sleeping Beauty, SB" o "Bella durmiente" se reconstruyó mediante mutagénesis dirigida (unas 40 mutaciones para la primera versión del SBLO).

20 El transposón SB es funcional en células de peces (Izsvak et al., 2000), en células de ratones y humanos (Dupuy et al., 2002) y es capaz de expresión a largo plazo (Yant et al., 2000) en animales transgénicos como ratones (Dupuy et al., 2002, Horie et al., 2003, Masuda et al., 2004, Yusa et al., 2004), medaka (Grabher et al., 2003) y pez cebra (Davidson et al., 2003). En condiciones controladas puede haber una sola inserción por molécula diana pero pueden ocurrir más de 1000 por genoma (Ivics et al.,
25 1997, Izsvak et al., 1997).

La transposición SB requiere, 2 sitios de ligamiento de 25-30 pb dentro de las ITR (Izsvak et al., 2000, Izsvak et al., 2002) y factores celulares (Zayed et al., 2003), para cortar las secuencias DNA entre las ITR y pegarla en el genoma entre 2 sitios TA
30 (Plasterk et al., 1999). La Figura 3 muestra un esquema de la utilización mas generalizada del transposon SB. Para ello se ha dividido en 2 plasmidos independientes: el Donor que lleva las ITR y el Helper que lleva la transposasa. La cotransfección de

ambos plásmidos permite que las secuencias que se encuentran entre las ITR en el plásmido Donor se incorporen al genoma de la célula huésped.

En la transposasa SB existen señales de localización nuclear (NLS) en los aa 105-120 y regiones PAI-RED de α hélices (leucine-zipper) en los aa 1-110 para ligar DNA (Ivics et al., 1996b, Yant et al., 2004). Un tercer dominio es el catalítico o motivo DDE (aa 146-290) (Plasterk et al., 1999). No parece que el aumento de expresión de SB inhiba la transposición (Izsvak et al., 2000).

El límite de tamaño de la secuencia entre las ITR no parece ser tan crítico como en los LYR de retrovirus. Sin embargo, con cada Kbp de aumento de tamaño del inserto en el transposón SB (entre 2.2 a 10.3 Kb), se obtiene una disminución del 30% en la eficiencia de transposición (Izsvak et al., 2000), lo que podría ser ventajoso para su estabilidad.

15

Entre 2002-2004 se han publicado nuevas mutaciones en la SB10 que aumentan la eficiencia de transposición en células humanas: la SB11 (T136R,M243Q,V253R,A255R) (Geurts et al., 2003), la SB12 (R115H,D260K)(Zayed et al., 2004) y la HSB3 (K13A,K33A,T83A) (Mikkelsen et al., 2003, Yant et al., 2004).

También se han publicado varias versiones de las ITR: la T1 (Izsvak et al., 2000), la T2 (Cui et al, 2002) y la T3 (Mikkelsen et al., 2003, Yant et al., 2004). Por otra parte, se han diseñado vectores que incluyen en un único plásmido las pT y la SB (Harris et al., 2002). Ninguna de estas nuevas versiones se ha ensayado en células de pez.

La secuencia de la transposasa original se mutó en 32 posiciones resultando en la primera transposasa activa SB10 (Ivics et al., 1997).

Los vectores "tradicionales" descritos en la solicitud de patente española P200402093, son capaces de una vez atravesada la membrana celular con la ayuda de la sonicación, y expresar el antígeno vacunal en el citoplasma celular aumentando la respuesta inmunológica a ese antígeno, sin embargo la expresión de dicho antígeno es temporal dándose solamente durante el tiempo que dura su expresión. Por lo que

30

existe una necesidad de vectores que tengan una mayor eficacia para su aplicación en vacunas DNA contra la rabdovirosis de peces.

La mejora que presenta dicho certificado de adición es la utilización de transposones o sus ITR/IIR/LTR como vectores o parte de vectores para vacunación DNA ya que se integran en el genoma de la célula, con lo que la expresión del antígeno vacunal es permanente mientras dure la vida del animal así inmunizado. Además otras mejoras de la región 5' potenciadora se han conseguido mediante la inclusión de elementos provenientes de las ITR/IIR/LTR de los transposones así como de la delección de un intron.

Compendio de la invención

La solicitud de patente española P200402093, proporciona, en general, métodos y composiciones para inmunizar animales acuáticos frente a la infección causada por patógenos virales, bacterianos o parásitos. Básicamente, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático es introducida en dicho animal con lo que se expresa dicho péptido inmunogénico en las células del animal induciendo de ese modo una respuesta inmune que confiere protección frente a la infección causada por dicho patógeno.

Por tanto, en un aspecto, la solicitud de patente P200402093, se relaciona con una construcción génica, en adelante construcción génica de la solicitud de patente P200402093, que comprende una secuencia de control de expresión capaz de dirigir la expresión de un péptido inmunogénico en un animal acuático, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático. En donde dicha secuencia de control de expresión está compuesta a su vez por 2 secuencias: una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia A y una secuencia B, en donde dicha secuencia A comprende una secuencia potenciadora de la expresión, y dicha secuencia B comprende la secuencia de un promotor, y en donde el extremo 3' de dicha secuencia A está unido al extremo 5' de dicha secuencia B.

La secuencia de control de expresión presente en la construcción génica de la solicitud de patente P200402093 que comprende dichas secuencias A y B se denomina en esta descripción, en ocasiones, "promotor largo de CMV", para
5 distinguirla de otras secuencias de control que comprenden el promotor de CMV pero que carecen de dicha secuencia potenciadora de la expresión (secuencia A) en 5' respecto al promotor de CMV. A esta secuencia de control de expresión que comprende únicamente el promotor de CMV, que cae fuera del alcance de la invención, se la denomina, en ocasiones, "promotor corto de CMV", en esta
10 descripción.

La secuencia A comprende una secuencia potenciadora de la expresión. La longitud de dicha secuencia A puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 100 y 1.000 bases, aunque en una realización particular dicha secuencia A tiene una
15 longitud de 218 bases. Prácticamente cualquier secuencia capaz de potenciar la expresión de un péptido en un animal acuático podría ser utilizada en la construcción génica de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha secuencia A comprende, o está constituida por, la secuencia de 218 bases comprendida desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 218 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la
20 SEQ ID NO: 1.

La secuencia B comprende, o está constituida por, la secuencia del promotor corto de CMV. Dicha secuencia es conocida y se encuentra presente en plásmidos comerciales, por ejemplo, en el plásmido pcDNA1 Amp (Invitrogen).

25

En una realización práctica, la secuencia de control de expresión presente en la construcción génica de la solicitud de patente P200402093, está formada por dichas secuencias A y B y comprende, o está constituida por, la secuencia de 798 nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

30

La construcción génica de la solicitud de patente P200402093 comprende, operativamente unida a dicha secuencia de control de expresión capaz de dirigir la

expresión de un péptido inmunogénico en un animal acuático, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión "operativamente unida" significa que el péptido inmunogénico es expresado en el marco de lectura
5 correcto bajo el control de dicha secuencia de control de expresión.

"Animal acuático", tal como aquí se utiliza incluye a cualquier organismo multicelular que vive en el agua, típicamente a los peces. Preferentemente, dicho animal acuático es un animal perteneciente a una especie de pez cultivada mediante
10 acuicultura. Ejemplos ilustrativos de dichos animales acuáticos incluyen los peces teleósteos, tales como peces vertebrados, por ejemplo, salmónidos (e.g., truchas, salmones, etc.), carpas, rodaballos, doradas, lubinas, etc.

El término "péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático" tal como
15 aquí se utiliza se refiere a proteínas completas y fragmentos de las mismas, así como a péptidos que son epítomos (por ejemplo, epítomos CTL), asociados con virus, bacterias o parásitos que provocan enfermedades en animales acuáticos. Por tanto, la secuencia de ácido nucleico codificante de un péptido inmunogénico presente en la construcción génica de la solicitud de patente P200402093 codifica un péptido
20 inmunogénico derivado de un patógeno viral, bacteriano o de un parásito, de un animal acuático.

Cuando se desee obtener inmunidad humoral, la secuencia de ácido nucleico codificante del péptido inmunogénico será, ventajosamente, una secuencia de ácido
25 nucleico que codifica la proteína antigénica completa, o un fragmento relativamente grande de la misma, en lugar de secuencias de ácido nucleico codificantes de fragmentos pequeños. Sin embargo, cuando se desee obtener inmunidad celular, o cuando la inmunidad humoral pueda ser nociva para el animal acuático, la secuencia de ácido nucleico codificante del péptido inmunogénico será, ventajosamente, una
30 secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento relativamente pequeño de la correspondiente proteína antigénica (epítomos CTL).

En una realización particular, la construcción génica de la solicitud de patente P200402093 comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno viral, tal como un novirabdovirus, de un animal acuático. A modo ilustrativo, dicho péptido puede ser la proteína G (pG) o la
5 nucleoproteína (N) del virus de la septicemia hemorrágica de la trucha (VHSV); la pG o la pN del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV); las proteínas VP1, VP2, VP3 o la pN estructural del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV); la pG de la viremia primaveral de la carpa (SVC); etc.

10 En otra realización particular, la construcción génica de la solicitud de patente P200402093 comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno bacteriano de un animal acuático, tal como algunas proteínas de *Renibacterium*, por ejemplo, la proteína p57 de *R. salmoninarum*. Ejemplos adicionales ilustrativos de dichos péptidos inmunogénicos de patógenos
15 bacterianos se citan en US 5.780.448.

Asimismo, en otra realización particular, la construcción génica de la solicitud de patente P200402093 comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un parásito patógeno de un animal acuático, tal como los
20 antígenos de superficie de *Ichthyophthirius* (US 5.780.448).

La construcción génica de la solicitud de patente P200402093 puede contener dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos o más péptidos inmunogénicos de uno o más patógenos de animales acuáticos. En este caso, la secuencia de control
25 de expresión presente en la construcción génica de la solicitud de patente P200402093 puede dirigir la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico codificantes de dichos péptidos inmunogénicos siempre y cuando éstas estén unidas en marco de lectura para expresar una proteína de fusión. Esta situación puede ocurrir, por ejemplo, para expresar las proteínas VP2 y VP3 de IPNV como una
30 proteína de fusión.

La construcción génica de la solicitud de patente P200402093 puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.*, 1989).

- 5 La construcción génica de la solicitud de patente P200402093 puede encontrarse, ventajosamente, en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, en adelante vector de la invención, que comprende, al menos, una construcción génica de la invención. Dicho vector puede ser un vector viral o un vector no viral. En general, la elección del vector dependerá de la célula
- 10 huésped en la que se va a introducir posteriormente. El vector de la invención puede ser obtenido mediante métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook *et al.*, 1989).

- El presente certificado de adición proporciona los mismos aspectos y realizaciones
- 15 particulares que la solicitud de patente P200402093, y proporciona los siguientes aspectos mejorados sobre el aspecto de la patente principal P200402093.

- Un aspecto general del presente certificado de adición se refiere a un vector que comprende una construcción génica descrita en la solicitud de patente principal
- 20 P200402093, donde preferentemente dicho vector contiene elementos de un transposón de pez. Dicho transposón puede ser utilizado en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales acuáticos frente a patógenos de animales acuáticos, lo que constituye un aspecto adicional de esta invención.

- Un aspecto particular del presente certificado de adición se refiere a una alteración de
- 25 la secuencia de control descrita en la solicitud de patente principal P200402093, a la que se le ha deleccionado el intrón del promotor de citomegalovirus. Dicho vector puede ser utilizado en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales acuáticos frente a patógenos de animales acuáticos, mediante un proceso que comprende la inmersión de dichos animales acuáticos en un baño que contiene
- 30 dicha vacuna y la sonicación de dicho baño conteniendo dichos animales acuáticos y dicha vacuna.

Un aspecto particular del presente certificado de adición se refiere a una vacuna que comprende una alteración de la secuencia de control descrita en la solicitud de patente principal P200402093, a la que se le ha deleccionado el intrón del vector y opcionalmente comprende uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Más particularmente, dicha vacuna es una vacuna de ADN. Dicha vacuna es útil para proteger animales acuáticos de infecciones virales, bacterianas o causadas por parásitos.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "vacuna" se refiere a un material capaz de producir una respuesta inmune. Por tanto, la vacuna del presente certificado de adición es capaz de inmunizar animales acuáticos frente a enfermedades causadas por patógenos de tales animales acuáticos. Asimismo, como es conocido, la activación de la actividad CTL (linfocitos T citotóxicos) resultante de la síntesis *in vivo* del péptido inmunogénico podría producir inmunidad frente a dichas enfermedades no solo desde un punto de vista profiláctico sino también terapéutico, en particular, tras el desarrollo de la enfermedad en animales acuáticos instalaciones de acuicultura.

La vacuna del presente certificado de adición es útil para proteger animales acuáticos susceptibles de ser infectados por patógenos de animales acuáticos. En una realización particular, dichos patógenos son patógenos de animales acuáticos que se crían en instalaciones de acuicultura. Ejemplos no limitativos de dichos patógenos incluyen VHSV, VHSV, IPNV, el virus causante de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), *Aeromonis salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia*, *Pasteurella* (incluyendo *piscicida*), *Vibrosis* (incluyendo *anguillarum* y *ordalii*), *Edwardsiella* (incluyendo *ictaluri* y *tarda*), *Streptococci*, *Ichthyophthirius*, etc.

La vacuna del presente certificado de adición puede prepararse en forma de una solución o suspensión acuosa, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad efectiva para el tratamiento y prevención de las enfermedades causadas por patógenos de animales acuáticos.

- 5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse para formular la vacuna del presente certificado de adición, tienen que ser estériles y fisiológicamente compatibles tales como, por ejemplo, agua estéril, solución salina, tampones acuosos tales como PBS, alcoholes, polioles y similares. Además, dicha vacuna puede contener otros aditivos, tales como adyuvantes, estabilizadores, antioxidantes, conservantes y similares. Los adyuvantes disponibles incluyen pero no se limitan a
- 10 sales o geles de aluminio, carbómeros, copolímeros en bloque no iónicos, tocoferoles, dipéptido muramil, emulsiones aceitosas, citoquinas, etc. La cantidad de adyuvante a añadir depende de la naturaleza propia del adyuvante. Los estabilizadores disponibles para su uso en vacunas son, por ejemplo, carbohidratos,
- 15 incluyendo sorbitol, manitol, destrina, glucosa y proteínas tales como albúmina y caseína, y tampones como fosfatos alcalinos. Los conservantes disponibles incluyen, entre otros, timerosal, mertiolato y gentamicina.

- La vacuna del presente certificado de adición puede ser administrada por cualquier
- 20 vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente al patógeno en cuestión, para lo cual dicha vacuna se formulará en la forma adecuada a la vía de administración elegida. Aunque la vacuna del presente certificado de adición puede administrarse por vía oral, intramuscular, mediante bombardeo de partículas o mediante pulverización, mediante métodos
- 25 convencionales (US 5.780.448), para la inmunización simultánea de un gran número de animales acuáticos resulta preferido sumergir dichos animales acuáticos en una solución que comprende la vacuna de la invención. Para ello, la vacuna del presente certificado de adición puede prepararse en forma de una solución o suspensión acuosa, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina,
- 30 solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

La vacuna del presente certificado de adición puede ser preparada empleando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular, dicha vacuna es preparada mediante la mezcla, en su caso, del transposón de la invención con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que se obtienen muy buenos resultados cuando los animales acuáticos a inmunizar se someten a un proceso de inmersión en un baño que comprende una vacuna del presente certificado de adición y la aplicación de ultrasonidos a dicho baño que contiene dicha vacuna y dichos animales acuáticos. La aplicación de ultrasonidos puede realizarse de forma simultánea o posterior a la inmersión de los animales acuáticos en dicho baño. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que la aplicación de ultrasonidos (sonicación) abre intersticios y/o poros entre las células y tejidos y/o en las membranas celulares de los epitelios de los animales acuáticos permitiendo de este modo que la vacuna del presente certificado de adición penetre en el animal acuático de una manera no traumática y poco estresante para el animal acuático.

20 Descripción de las figuras

Figura 1: muestra un esquema de las principales familias de transposones de peces. Los tipos más estudiados de los transposones de peces pertenecen a los grupos de retroposones, Tc1-like, Tol2 y retrovirus. Rectángulos negros, transcriptasa reversa en los retroposones, exones de la(s) transposasas y proteínas de los retrovirus. Los ITR, HR y LTR contienen elementos potenciadores.

Figura 2: muestra algunos de los elementos de 8-12 bp agrupados en 18-22 bp que componen el promotor largo de CMV. La adición, eliminación o sustitución de algunos de estos elementos puede potenciar la actividad del promotor.

Figura 3. muestra un ejemplo del sistema de plásmidos doble SB/ITR

Para inducir transposición las células se transfectan con: i) el plásmido donante o construcción ITR y ii) el plásmido helper que contiene la transposasa específica para el plásmido donante. Para ensayar la transposición, las células transfectadas se ponen en presencia del antibiótico cuyo gen de resistencia se ha colocado en la construcción ITR
5 (en este ejemplo el G418) (Izsvak et al., 2000). Rectángulos negros, ITR y transposasas SB. Flechas, genes de resistencia a antibióticos. CMV y promotSV40, promotores. pA, señal de terminación de la transcripción del virus SV40.

Figura 4. muestra la alta actividad de la β galactosidasa en células EPC de carpa cuando se transfecta dicho gen entre las dos señales ITR del transposón SB comparadas con la
10 baja actividad cuando se transfecta el mismo gen sin las señales ITR. Inyectando alevines de trucha se ha demostrado un aumento de 2 veces en niveles de interferón IFN2 y Mx cuando se inyecta el gen G de VHSV entre 2 ITR comparado con el mismo gen sin ITR (Tabla 4).

15

Figura 5. muestra la resistencia de células EPC a la puromicina después de la transformación de dichas células con vectores deleccionados en distintos fragmentos de la secuencia 5' potenciadora y de control. Al deleccionar el intron correspondiente se produce un 5-20 % de incremento de la actividad. Al deleccionar otras secuencias
20 potenciadoras no se obtiene una mayor actividad.

Descripción detallada de la invención

El presente certificado de adición tiene como objeto principal la utilización de
25 transposones o algunos de sus elementos (ITR, IIR, LTR) como vectores o como parte de los vectores para la vacunación ADN en peces.

La metodología objeto de la invención se basa en primer lugar en la adaptación del transposón SB como vector en células de pez. Para la utilización práctica del transposón
30 SB como vector, se separó en dos plásmidos complementarios, uno llevaba la transposasa y otro las señales ITR (Figura 3).

Por otro lado, si bien en la solicitud de patente P200402093 se utilizaba una construcción que comprendía una secuencia de ácido nucleico que codificaba un péptido inmunogénico de un patógeno acuático y una secuencia de control de la expresión en la que dicha secuencia comprendía una secuencia potenciadora de la expresión y una secuencia del promotor de citomegalovirus, en el presente certificado de adición, la construcción anteriormente descrita se modificó.

Las modificaciones introducidas en dicha construcción denominada pMCV1.4-G, se basaron en la delección del intrón del promotor de citomegalovirus. Además esta nueva construcción se introdujo entre las dos señales ITR obteniendo de esta manera un nuevo vector denominado pT2pMCV1.4-G. Debido a que los peces poseen transposasas endógenas, no hizo falta hacer intervenir el plásmido que contenía la transposasa exógena.

Tanto la transcripción del gen G (Tabla 2) como la expresión de proteínas marcadoras como la β galactosidasa (Tabla 3) aumentaron significativamente al usar el nuevo vector in vitro en célula transfectadas. Los experimentos de transformación celular realizados con esta nueva construcción demostraron un aumento de 10 veces al utilizar la construcción pT2pMCV1.4-pac respecto a la del pMCV1.4-pac (Figura 4) y un 10-20% de aumento de la eficacia de transformación al deleccionar el intron (Figura 5).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar pero no limitar la presente invención.

Ejemplo 1: Adaptación del transposón SB como vector en células de pez

Plásmidos y construcciones de los que se parte

Se parte de las construcciones pT2/HB (Material Transfer agreement Univ Minnesota) (Cui et al., 2002, Geurts et al., 2003) descrita en la Figura 3

A la secuencia original de los ITR (izquierdo y derecho) del pT/HB, se adicionaron secuencias TA que aumentaban la frecuencia de transposición resultando en el pT2 (Cui et al., 2002).

- 5 Como plásmido de partida se ha usado principalmente el pMVC1.4 (2.8 Kpb) (Ready Vector, Madrid, Spain). Contiene un MCS bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (CMV) y un pequeño intrón híbrido del primer intrón de β globina humana e inmunoglobulina murina. Ahora bien mientras que la mayoría de los plásmidos comerciales contienen el promotor mínimo (<100 pb) y ~ 400 pb de
- 10 secuencias "enhancer", el pMVC1.4 contiene además ~ 200 pb de secuencias "enhancer" adicionales y un intrón (promotor de CMV largo, -737+61+intron). Con esta construcción se ha demostrado de 3-4 veces mayor eficiencia de transfección en EPC (Rocha et al., 2004). La delección del intrón además aumenta un 10-20% la eficacia de este promotor en células EPC (Figura 5).

15

Construcciones con el gen de resistencia a puromicina (pac).

- Se ha comprobado que las células de EPC y los embriones de pez cebra son diez veces mas sensibles a la puromicina (Sanchez-Puig & Blasco, 2000) que al G418 (resultados
- 20 no publicados). La EPC filé resistente tanto a la hygromicina como a la zeocina (resultados no publicados). Es por ello que aunque los primeros experimentos se realizaron con G418 (añadiendo 1000 μ g/mL de G418 a los medios y utilizando las construcciones pTSVNeo y pT2SVNeo), una vez se consiguió pasar a los vectores el gen de resistencia a la puromicina (20-50 μ g/mL) se utilizó estas construcciones para
- 25 selección de transformantes.

- Procedimientos similares al descrito aquí en detalle se utilizaron para subclonar los genes de la puromicina y los promotores largos de CMV o imitantes de la pG a aquellos plásmidos que ha sido necesario (Fernandez-Alonso et al., 1999, Fernandez-Alonso et
- 30 al., 2001). Se obtuvieron los genes mediante una digestión preparativa a partir de 2 μ g de la construcción de partida con las endonucleasas de restricción adecuadas (GibcoBRL, Postfach, Germany), durante 2 h a 37°C. Se trataron en las mismas

condiciones 2 µg del plásmido diana. El producto de la digestión se separó en un gel de agarosa al 1% (Sambrook et al., 1989), recuperando y purificando las bandas obtenidas, utilizando el kit comercial SNAP (InVitroGen, USA). Se recuperaron al menos 50 ng/µl de DNA por cada banda. Se realizó la ligación del plásmido y el inserto con extremos cohesivos (razón plásmido:inserto 2:3, 1:3 y 1:6), a temperatura ambiente durante 2 h utilizando la T4 DNA ligasa (GibcoBRL) sobre un volumen final de 10-20 µl por mezcla de ligación. Se incluyeron controles sin inserto (Estepa et al., 2001, Estepa et al., 1994). Después se transformaron por electroporación bacterias competentes *E. coli* Top 10 y/o DH5α comerciales (Electrocompetent Cells, Clontech).

Para la electroporación, 10 µl de bacterias competentes mezcladas con 2 µl de mezcla de ligación y 20µl de agua preenfriadas en hielo, se electroporaron en cubetas de 0,1 cm (Eppendorf). Las condiciones de electroporación fueron de 1,8 Kv ~ 0,5 ms. En ambos casos después de la transformación se añadieron 0.3 ml de medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de ClNa por litro, pH 7,5) y se incubaron las bacterias a 37°C durante 40 min. Después se sembraron 5-50 µl en placas de TB-antibiótico de selección (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

La extracción del DNA plasmídico en minipreps se realizó a partir de 10 colonias transformadas y de una colonia del control de ligación. Para ello, se incubaron cultivos de 3 ml de medio TB-Ampicilina/kanamicina (100 µg/ml) con las colonias en tubos de 13 ml (Starstedt, Inc., Newton, USA) a 37°C con agitación durante 20 h. Se recuperó el precipitado bacteriano por centrifugación a 12.000 rpm durante 2 min y se sometió a lisis con solución STET (50 mM Tris-CIH pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 8% sacarosa, 0.1% TritonX100) y lisozima (1 mg/ml) durante 2 min a temperatura ambiente y durante 2 min en un bloque térmico a 100°C. Se centrifugó después a 12.000 rpm durante 8 min y se recuperó el sobrenadante, que se trató con RNasa (50 µg/ml) durante 30 min a 37°C. Se trató el DNA durante 5 min a temperatura ambiente con una solución al 5% de CTAB (Sigma) (0.2% final), previamente solubilizado y se centrifugó a 12.000 rpm 10 min. El precipitado recuperado se disoció del CTAB ClNa 5 M y se precipitó el DNA con etanol a -70°C durante 20 min y se lavó con etanol 70%

frío (Estepa et al., 2001, Estepa et al., 1994). Se resuspendió el precipitado en H₂O destilada estéril (Sigma).

Para detectar la presencia del inserto se digirió el DNA extraído de los distintos clones.

- 5 La digestión se realizó durante 2 h a 37°C. Se separaron los productos de la digestión en un gel de agarosa al 1% y se seleccionó uno de los clones que contenía el inserto subclonado en la dirección adecuada (Fernandez-Alonso et al., 1999, Fernandez-Alonso et al., 2001).

10 Ensayos **de transposición.**

Se han empleado métodos descritos anteriormente para células de mamífero (Cui et al., 2002, Ivics et al., 1997) adaptados en nuestro laboratorio a células EPC (López et al., 2001, Rocha et al., 2004). Brevemente se transforman monocapas de EPC a 0.5×10^6
15 células /mL en placas de 96 pocillos con $<0.1 \mu\text{g}$ de vector transposon (pT) y $<0.1 \mu\text{g}$ de vector transposasa (SB) en 0.6 mL de Eugene (Rocha et al., 2004). Tres días después, se les añade medio de cultivo con 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 o 20-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina. Después de 2-3 días se les cambia el medio para quitar la gran mayoría de células muertas y 2-3 días después, se cuentan las células o 2-3 semanas después los clones
20 supervivientes después de fijarlos en 1% de glutaraldehído y teñirlos con Giemsa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Ensayos **de transcripción.**

25

La obtención de RNA se realizó utilizando Trizol. Después se sintetizaron los cDNA mediante transcriptasa reversa y se amplificaron con PCR (RT-PCR) según se describe en detalle en Tafalla et al (Tafalla et al, 2005). Los primers para la amplificación de la proteína G por PCR se describieron con anterioridad (Estepa et al, 1995). Los
30 resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Ensayos **in vivo**

Truchas de 20 cm se inyectaron intramuscularmente con 1 µg de plasmido por trucha. Catorce días después se aislaron sus hígados y los niveles de mRNA correspondientes a IFN2, Mx y MHCII se estimaron mediante la utilización de primers específicos mediante RT-PCR según se describió recientemente (Tafalla et al, 2005). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Resultados

- Las modificaciones introducidas son la introducción entre dos ITR de pT2 (Figura 3) de las secuencias MCV1.4-gen y la delección del intron presente en las construcciones anteriores. Entre los genes que se utilizaron están: la βgalactosidasa, el gen de resistencia a puromicina (pac) y el gen de la proteína G de VHSV.
- Tanto la transcripción del gen G (Tabla 2) como la expresión de proteínas marcadoras como la βgalactosidasa (Tabla 3) aumentaron significativamente al usar el nuevo vector in vitro en célula transfectadas. Los experimentos de transformación celular realizados con esta nueva construcción demostraron un aumento de 10 veces al utilizar la construcción pT2pMCV1.4-pac respecto a la del pMCV1.4-pac (Figura 4) y un 10-20% de aumento de la eficacia de transformación al deleccionar el intron (Figura 5). Inyectando alevines de trucha se ha demostrado un aumento de 2 veces en los niveles de interferón IFN2 y Mx cuando se inyecta el gen G de VHSV entre 2 ITR comparado con el mismo gen sin ITR (Tabla 4),

- Tabla 2
Niveles relativos de mRNA codificante de la G en células RTG 6 días después de ser transfectadas con 0.8 µg de plásmidos por pocilio (24 pocillos por placa)

Plasmido	Unidades relativas
pMCV1.4 G	22.000 ±15000
pT2 pMCV1.4 G	350.000 ±40000

Se representan medias ± desviaciones estándar de 3 pocillos

Tabla 3

Numero de células RTG 6 días después de ser transfectadas con 100 ng de plasmidos por pocilio (96 pocillos por placa)

plasmidos	Numero de células teñidas con Xgal
pMCV1.4 βgal	45 ± 1
pT2 MCV1.4 βgal	160 ± 8

Se representan medias ± desviaciones estandard de 3 pocillos

5

Tabla 4

Expresión relativa a GADPH de interleukinas en hígado de trucha, 14 días después de ser inyectadas con 1μg de plasmido por trucha

Plasmido	IFN2	Mx	MHCII
Ctrl	0.28 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.40 ± 0.1
pMCV1.4 G	0.60 ± 0.1	0.16 ± 0.1	0.65 ± 0.1
pT2 pMCV1.4 G	0.95 ± 0.15	0.32 ± 0.15	0.70 ± 0.2

Se representan medias ± desviaciones estandard de 4 truchas

10 REFERENCIAS

Capriglione, T., Odierna, G., Caputo, V., Canapa, A. & Olmo, E. (2002). Characterization of a Tc1-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. *Gene* 295, 193-198.

15

Coll, J. M. (2001). El transposon SB de salmónidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Investigaciones Agrarias* 16, 237-244.

20

Cui, Z., Geurts, A. M., Liu, G., Kaufinan, D. & Hackett, P. B. (2002). Structure-Function analysis of the inverted terminal repeats of the sleeping beauty transposon. *Journal Molecular Biology* 318, 1221-1235.

25

Davidson, A. E., Balciunas, D., Mohn, D., Shaffer, J., Hermanson, S., Sivasubbu, S., Cliff, M. P., Hackett, P. B. & Ekker, C. (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the sleeping beauty transposon. *Developmental Biology* 263, 191-202.

Dupuy, A. J., Clark, K., Carlson, C. M., Fritz, S., Davidson, A. E., Markley, K. M., Finley, K., Fletcher, C. F., Ekker, S. C. & Hackett, P. B., Hom, S. & Largaespada, D. A. (2002). Mammalian germline transgenesis by transposition. *Proceedings National Academy Sciences USA* 99, 4495-4499.

5

Estepa, A., DeBlas, C., Ponz, F. & Coll, J. M. 1995. Diagnosis of trout haemorrhagic septicemia rhabdovirus by capture with monoclonal antibodies and amplification with PCR. *Veterinary Research* 26: 530-532.

10 Estepa, A., Rocha, A., Pérez, L., Encinar, J. A., Nuñez, E., Fernandez, A., González Ros, J. M., Gavilanes, F. & Coll, J. M. (2001). A protein fragment from the salmonid VHS rhabdovirus induces cell-to-cell fusion and membrane phosphatidylserine translocation at low pH. *Journal Biological Chemistry* 276, 46268-46275.

15 Estepa, A., Thiry, M. & Coll, J. M. (1994). Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *Journal General Virology* 75, 1329-1338.

20 Fernandez-Alonso, M., Alvarez, F., Estepa, A., Blasco, R. & Coll, J. M. (1999). A model to study fish DNA immersion-vaccination by using the green fluorescent protein. *Journal Fish Diseases* 22, 237-241.

25 Fernandez-Alonso, M., Rocha, A. & Coll, J. M. (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine* 19, 3067-3075.

Geurts, A. M., Yang, Y., Clark, K. J., Liu, G., Cui, Z., Dupuy, A. J., Bell, J. B., Largaespada, D. A. & Hackett, P. B. (2003). Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Molecular Therapy* 8, 108-117.

30

Goodier, J. L. & Davidson, S. D. (1994). TcI transposon-like sequences are widely distributed in salmonids. *Journal Molecular Biology* 241, 26-34.

Gottgens, B., Barton, L. M., Grafham, D., Vaudin, M. & Green, A. R. (1999). Tdr2, a new zebrafish transposon of the TcI family. *Gene* 239, 373-379.

- 5 Grabher, C., Henrich, T., Sasado, T., Arenz, A., Wittbrodt, J. & Furutani-Seiki, M. (2003). Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene* 322, 57-66.

Harris, J. W., Strong, D. D., Amoui, M., Baylink, D. J. & Lau, K. H. W. (2002). Construction of a TcI-like transposon Sleeping beauty-based gene transfer plasmid
10 vector for generation of stable transgenic mammalian cell clones. *Analytical Biochemistry* 310, 15-26.

Heierhorst, J., Lederis, K. & Richter, D. (1992). Presence of a member of the TcI-like transposon family from nematodes and *Drosophila* within the vasotocin gene of a
15 primitive vertebrate, the Pacific hagfish *Eptatretus stouti*. *Proceedings National Academy Sciences USA* 89, 6798-6802.

Henikoff, J. (1992). Detection of *Caenorhabditis* transposon homologs in diverse organisms. *New Biologist* 4, 382-388.
20

Horie, K., Yusa, K., Yae, K., Odajima, J., Fisher, S. E., Keng, V. W., Hayakawa, T., Mizuno, A., Kondoh, G., Ijiri, T., Matsuda, Y., Plasterk, R. H. & Takeda, J. (2003). Characterization of sleeping beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Molecular Cell Biology* 23, 9189-9207.

25 Iida, A., Tachibana, A., Hamada, S., Hori, H. & Koga, A. (2004). Low transposition frequency of the medaka fish Tol2 element may be due to extranuclear localization of its transposase. *Genes Genetic Syst* 79, 119-124.

30 Ivics, Z. & Izsvak, Z. (2002). Transposable elements for transgenesis and insertional mutagenesis in vertebrates. A contemporary review of experimental strategies. *Methods in Molecular Biology* 260, 255-276.

Ivics, Z., Izsvak, Z. & Hackett, P. B. (1997). Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon system from fish and its transposition in human cells. *Cell* 91, 501-510.

5

Ivics, Z., Izsvak, Z., Minter, A. & Hackett, P. (1996a). Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proceedings National Academy Sciences USA* 93, 5008-5013.

- 10 Ivics, Z., Izsvak, Z., Minter, A. & Hackett, P. B. (1996b). Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proceedings National Academy Sciences USA* 93, 5008-5013.

- 15 Izsvak, Z. & Ivics, Z. (2003). Sleeping beauty transposition: Biology and applications for molecular therapy. *Molecular Therapy* 9, 147-156.

Izsvak, Z., Ivics, Z. & Hackett, P. B. (1995). Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular General Genetics* 247, 312-322.

- 20 Izsvak, Z., Ivics, Z. & Hackett, P. B. (1997). Repetitive elements and their genetic applications in zebrafish. *Biochemical Cell Biology* 75, 507-523.

- 25 Izsvak, Z., Ivics, Z. & Plasterk, R. H. (2000). Sleeping beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *Journal Molecular Biology* 302, 93-102.

- 30 Izsvak, Z., Khare, D., Behlke, J., Heinemann, U., Plasterk, R. H. & Ivics, Z. (2002). Involvement of a bifunctional, paired like DNA-binding domain and a transpositional enhancer in sleeping beauty transposition. *Journal Biological Chemistry* 277, 34581-34588.

Kawakami, K., Imanaka, K., Itoh, M. & Taira, M. (2004). Excisión of the Tol2 trans'posable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropiclis*. *Gene* 338, 93-98.

- 5 Kawakami, K. & Shima, A. (1999). Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excisión of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 240, 239-244.

- 10 Kido, Y., Himberg, M., Takasaki, N. & Okada, N. (1994). Amplification of distinct subfamilies of short interdispersed elements during evolution of the salmonidae. *Journal Molecular Biology* 241, 633-644.

Koga, A., Suzuki, M., Inagaki, H., Bessho, Y. & Hori, H. (1996). Transposable element in fish. *Nature* 383, 30.

15

Lam, W. L., Lee, T. S. & Gilbert, W. (1996). Active transposition in zebrafish. *Proceedings National Academy Sciences USA* 93, 10870-10875.

- 20 Lampe, D. J., Churchill, M. E. A. & Robertson, H. M. (1996). A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. *EMBO Journal* 15, 5470-5479.

Leaver, M. J. (2001). A family of Tc1-like transposons from the genomes of fishes and frogs: evidence for horizontal transmission. *Gene* 271, 203-214.

- 25 López, A., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A., Estepa, A. & Coll, J. M. (2001). Transfection of epithelioma cyprini (EPC) carp cells. *Biotechnology Letters* 23, 481-487.

- 30 Masuda, K., Yamamoto, S., Endoh, M. & Kaneda, Y. (2004). Transposon-independent increase of transcription by the sleeping beauty transposase. *Biochemical Biophysical Research Communications* 317, 796-800.

Mikkelsen, J. G., Yant, S. R., Meuse, L., Huang, Z., Xu, H. & Kay, M. A. (2003). Helper-independent sleeping beauty transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Molecular Therapy* 8, 654-665.

5

Plasterk, R. H. A., Izsvak, Z. & Ivics, Z. (1999). Resident Aliens. The Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *TIG* 15, 326-332.

Radice, A. D., Bugaj, B., Fitch, D. H. A. & Emmons, S. W. (1994). Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish. *Molecular General Genetics* 244, 606-612.

10

Reed, K. M. (1999). Tc1-like transposable elements in the genome of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Marine Biotechnology* 1, 60-67.

15

Rocha, A., Ruiz, S. & Coll, J. M. (2004). Improvement of transfection efficiency of epithelioma papulosum cyprini carp cells by modification of their cell cycle and using an optimal promoter. *Marine Biotechnology* in press.

Rubinsky, I. & Ruvkun, G. (2003). Functional test of enhancer conservation between distantly related species. *Developmental Biology* 130, 5133-5142.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

25

Sanchez-Puig, J. M. & Blasco, R. (2000). Puromycin resistance (pac) gene as a selectable marker in vaccinia virus. *Gene* 257, 57-65.

Shen, C. H. & Steiner, L. A. 2004. Genome structure and thymic expression of an endogenous retrovirus in zebrafish. *Journal Virology* 78: 899-911.

30

Tafalla, C , Estepa, A. & Coll, J. M. (2005a). Development and possible applications to aquaculture of sleeping beauty, the first active vertebrate transposon obtained from fish. Aquaculture submitted.

- 5 Tafalla, C , Estepa, A. & Coll, J. M. (2005b). Potential use of fish transposons in Aquaculture. Journal Biotechnology (accepted).

Tafalla, C , Coll, J. & Secombes, C. J. 2005. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic
10 septicemia virus (VHSV) infection. Developmental and Comparative Immunology 29: 615-626.

Takahashi, K., Terai, Y., Nishida, M. & Okada, N. (1998). A novel family of short interspersed repetitive elements (SINEs) from cichlids: the patterns of insertion of
15 SINEs at orthologous loci support the proposed monophyly of four major groups of cichlid fishes in lake Tanganyika. Molecular Biological Evolution 15, 391-407.

Winkfein, R. J., Moir, R. D., Krawets, J., Blanco, J., States, C. & Dixon, G. H. (1988). A new family of repetitive retroposon-like sequences in the genomes of the rainbow
20 trout. European Journal Biochemistry 176, 255-264.

Yant, S. R., Meuse, L., Chiu, W., Ivics, Z., Izsvak, Z. & Kay, M. A. (2000). Somatic integration and longterm transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. Nature Genetics 25, 35-41.

25

Yant, S. R., Park, J., Huang, Y., Mikkelsen, J. G. & Kay, M. A. (2004). Mutational analysis of the N-terminal DNA-binding domain of sleeping beauty transposase: critical residues for DNA binding and hyperactivity in mammalian cells. Molecular Cell Biology 24, 9239-9247.

30

Yusa, K., Takeda, J. & Horie, K. (2004). Enhancement of sleeping beauty transposition by CpG methylation: possible role of heterochromatin formation. *Molecular Cell Biology* 24, 4004-4018.

- 5 Zayed, H., Izsvak, Z., Khare, D., Heinemann, U. & Ivics, Z. (2003). The DNA-bending protein HMGB1 is a cellular cofactor of sleeping beauty transposition. *Nucleic Acids Research* 31, 2313-2322.

- 10 Zayed, H., Izsvak, Z., Walisko, O. & Ivics, Z. (2004). Development of hyperactive sleeping beauty transposon vectors by mutational analysis. *Molecular Therapy* 9, 292-304.

Zhang, G., Hiraiwa, H., Yasue, H., Wu, H., Ross, C. R., Troyer, D. & Blecha, F. 1999. Cloning and characterization of the gene for a new epithelial β -defensin.

- 15 *Journal Biological Chemistry* 274: 24031-24037.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica que comprende una secuencia de control de expresión capaz de dirigir la expresión de un péptido inmunogénico en un animal acuático, y
5 una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático, en donde dicha secuencia de control de expresión es una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia A y una secuencia B, en donde dicha secuencia A comprende una secuencia potenciadora de la expresión, y dicha secuencia B comprende la secuencia del promotor de citomegalovirus (CMV),
10 y en donde el extremo 3' de dicha secuencia A está unido al extremo 5' de dicha secuencia B.
2. Construcción según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia A está constituida por la secuencia de 218 bases comprendida desde el nucleótido 1 hasta el
15 nucleótido 218 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
3. Construcción según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia B está constituida por la secuencia del promotor de CMV.
- 20 4. Construcción según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de control de expresión comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
5. Construcción según la reivindicación 1, en la que dicho péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático se selecciona entre proteínas completas y
25 fragmentos de las mismas, y epítomos peptídicos asociados con virus, bacterias o parásitos que provocan enfermedades en animales acuáticos.
6. Construcción según la reivindicación 5, en la que dicho péptido inmunogénico de un patógeno de un animal acuático se selecciona entre la proteína G (pG) del virus de
30 la septicemia hemorrágica de la trucha (VHSV); la pG del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV); las proteínas VP1, VP2, VP3 o la proteína N estructural del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV); la pG de la viremia

primaveral de la carpa (SVC); la proteína p57 de *Renibacterium salmoninarum*; y antígenos de superficie de *Ichthyophthirius*.

5 7. Construcción según la reivindicación I₅ que comprende dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos o más péptidos inmunogénicos de uno o más patógenos de animales acuáticos.

8. Un vector que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

10

9. Vector según la reivindicación 8, donde dicho vector es un transposón.

10. Transposón que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde a dicha construcción se ha deleccionado el intrón del
15 promotor de citomegalovirus.

11. Uso de un transposón según la reivindicación 10 para la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales acuáticos frente a patógenos de animales acuáticos.

20

12. Uso de un transposón según la reivindicación 10, en la elaboración de una vacuna para su administración a animales acuáticos mediante un proceso que comprende la inmersión de dichos animales acuáticos en un baño que contiene dicha vacuna y la sonicación de dicho baño conteniendo dichos animales acuáticos y dicha vacuna.

25

13. Vacuna que comprende un transposón según la reivindicación 10, y opcionalmente uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

14. Vacuna según la reivindicación 13, donde dicha vacuna es una vacuna de ADN.

30

15. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, para proteger animales acuáticos susceptibles de ser infectados por patógenos de animales acuáticos

- seleccionados entre el virus de la hemorragia septicémica de la trucha (VHSV), el virus de la necrosis hematopoyética (IHNV), el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el virus causante de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), *Aeromonis salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia*, *Pasteurella*, *Vibrios*,
5 *Edwardsiella*, *Streptococci*, e *Ichthyophthirius*.

1/5

FIGURA 1

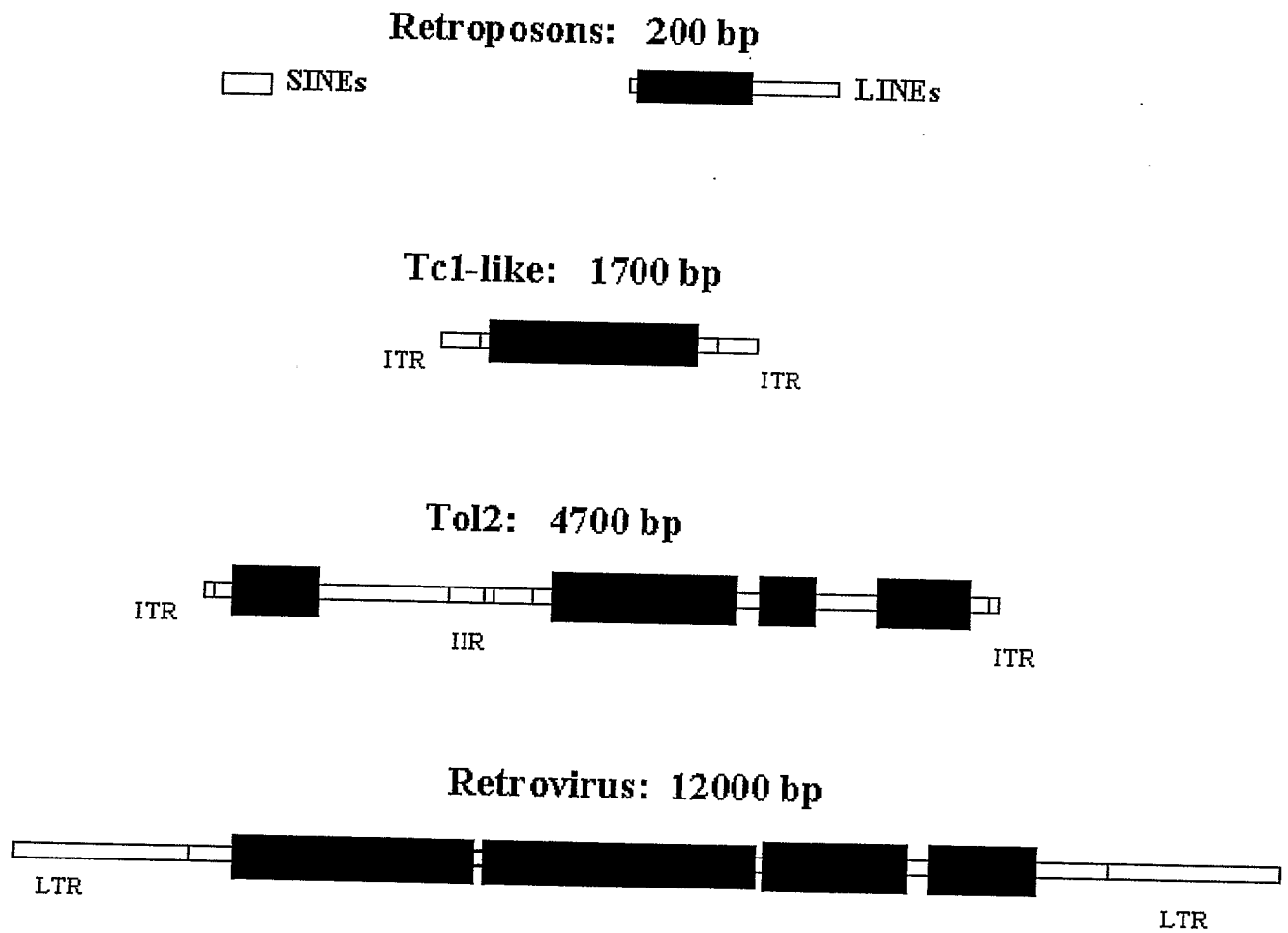
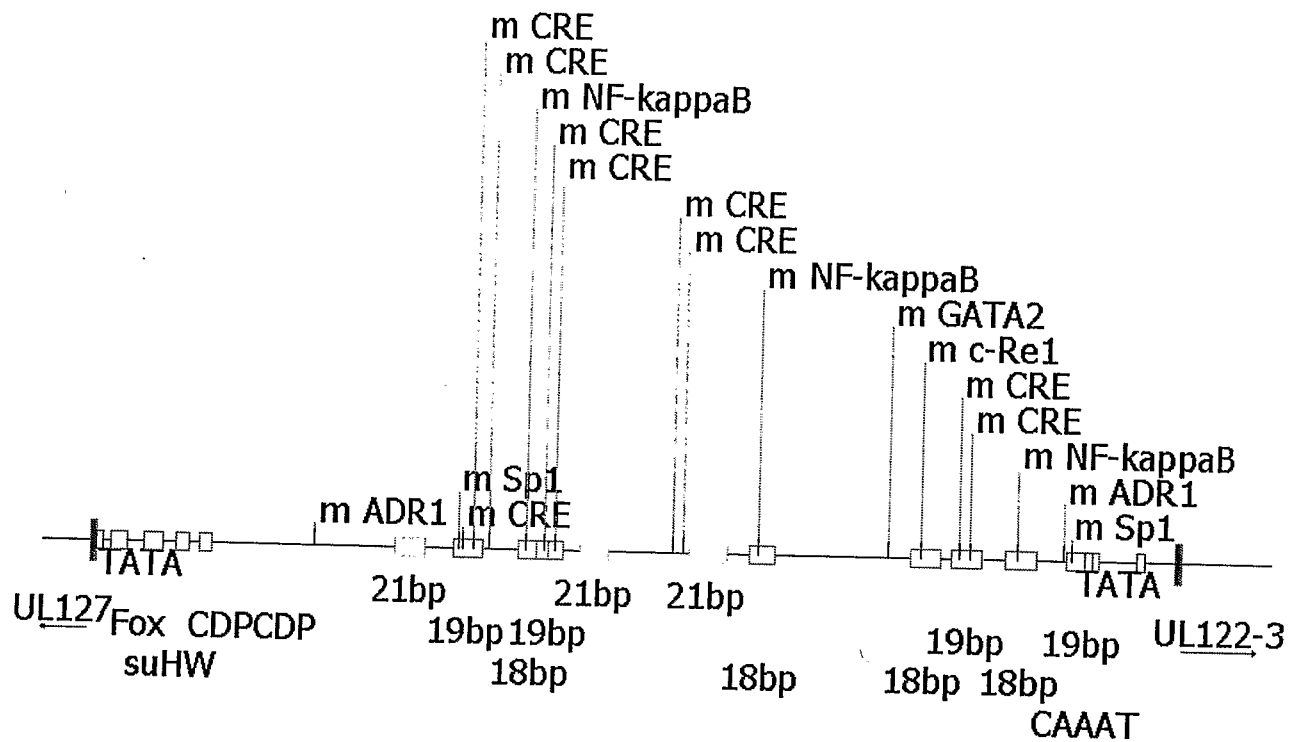


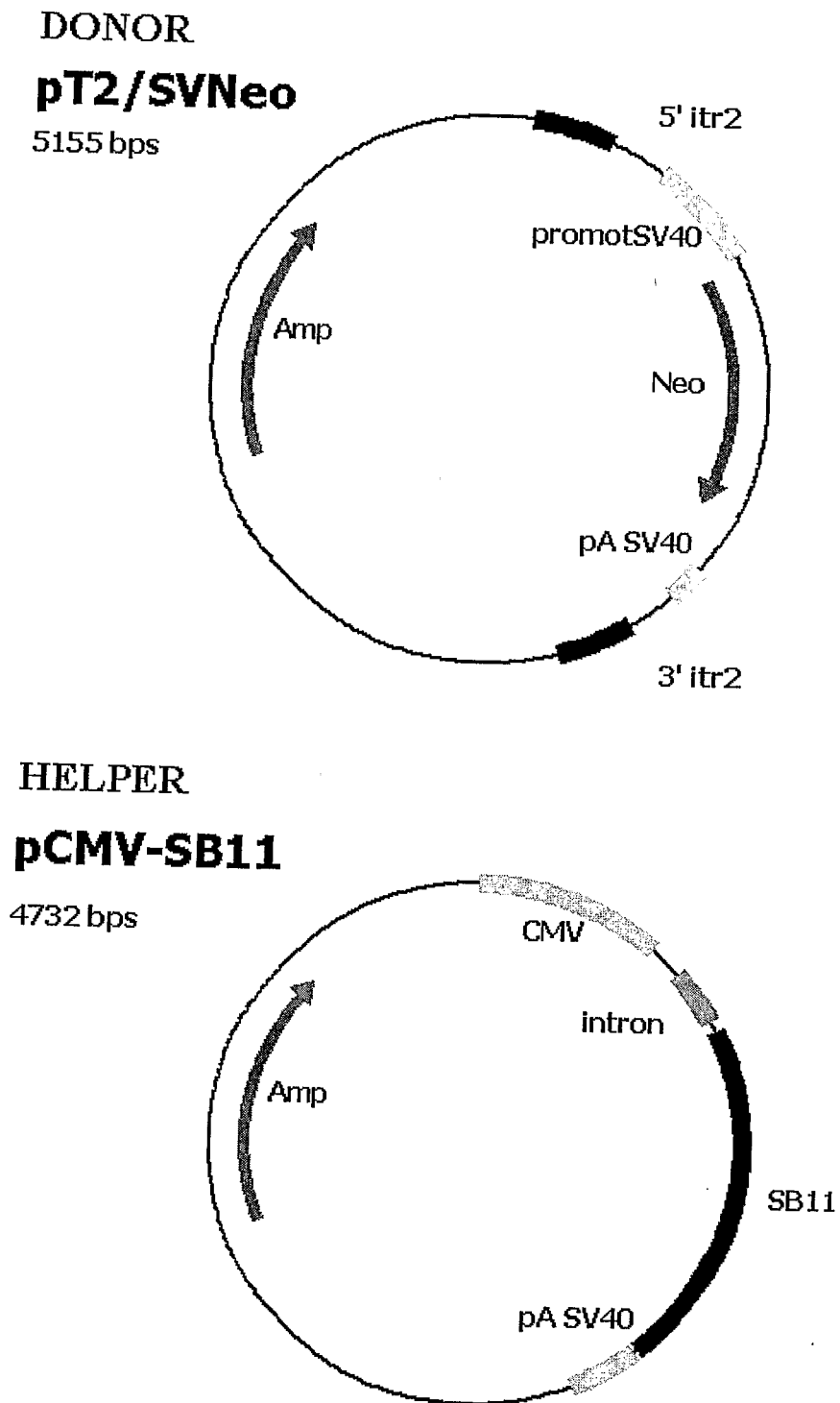
FIGURA 2

5



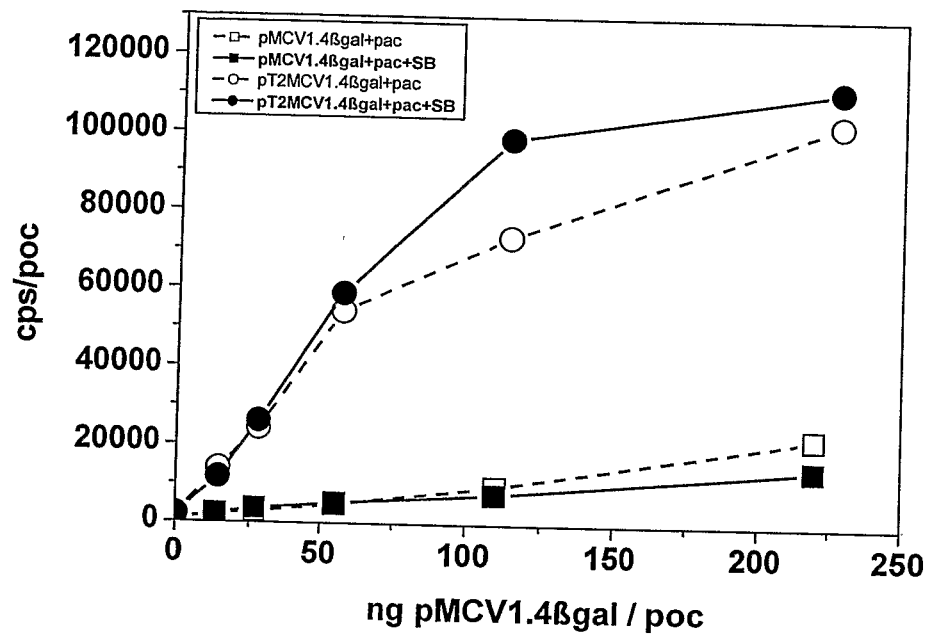
3/5

FIGURA 3



4/5

FIGURA 4



5/5

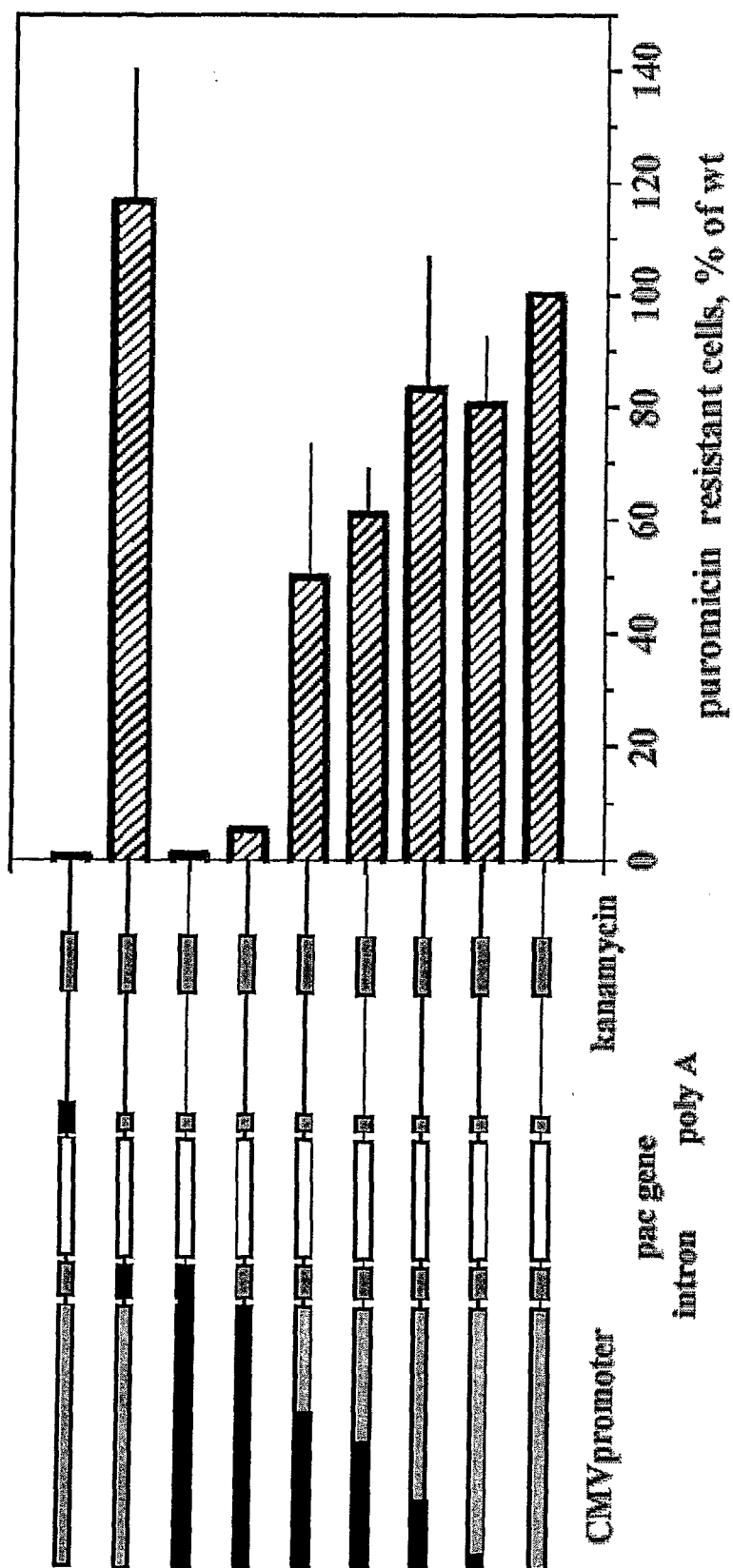


FIGURA 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/000006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, EMBASE, NPL, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	ES 2247942 A1 (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA (INIA)) 01.03.2006, the whole the document.	1-15
X	ROCHA, A., RUIZ, S., COLL, J. M. Improvement of transfection efficiency of epithelioma papulosum cyprini carp cells by modification of cell cycle and use of an optimal promoter. Marine Biotechnology, Vol. 6, N° 5, pages 401-410. ISSN 1436-2228.	1-15
X	EP 0773295 A2 (OTTAWA CIVIC HOSPITAL) 14.05.1997, the whole the document.	1, 3, 5-15
Y		2, 4
Y	WO 2003/031469 A2 (MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS-, UND VERTRIEBS, GMBH) 17.04.2003, SEC. ID. NO. 1 and SEC. ID. NO. 2	2, 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents.	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2007 (16.05.2007)

Date of mailing of the international search report

(23/05/2007)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España
Facsimile No 34 91 3495304

Authorized officer

E. Relaño Reyes

Telephone No + 34 91 3493047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES 2007/000006

C (continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	FERNÁNDEZ- ALONSO, M., ROCHA, A., COLL, J. M. DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. Vaccine. April 2001, Vol. 19, N° 23-24, pages 3067-3075. ISSN0264-410X.	1-15
Y	EMBL database; 09.11.2004; [online]; Renilla luciferase reporter vector pGL4.75[hRluc/CMV]; accession number AY738231	1-15
A	GRABHER, C, HENRICH, T., SASADO, T. et al. Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. Gene December 2003, Vol. 322, pages 57-66 ISSN 0378-1119.	9
A	DAVIDSON, A. E., BALCIUNAS, D, MOHN, D. et al. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the <i>Sleeping Beauty</i> transposon. Developmental Biology. November 2003, Vol. 263, N° 2, pages 191-202. ISSN 0012-1606.	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2007/000006

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2247942 A1	01.03.2006	WO 2006/035084 A1	06.04.2006
EP 0773295 A2	14.05.1997	CA 2499302 A1	08.05.1997
		CA 2189831 A	08.05.1997
		NO 964713 A	09.05.1997
		JP 9285291 A	04.11.1997
		EP 0839913 A2	06.05.1998
		US 5780448 A	14.07.1998
		US 6180614 B1	30.01.2001
		AT 331030 T	15.07.2006
		DE 69736163 D	03.08.2006
		PT 839913 T	29.09.2006
		DK 0773295 T	27.12.2006
		DE 69736163 T	03.05.2007
WO 2003/031469 A2	17.04.2003	AU2002349277A1,A8	22.04.2003
		US2004235771 A1	22.04.2003
		CN 1564694 A	12.01.2005
		EP 1432439 B1	07.12.2005
		AT 311899 T	15.12.2005
		DE 50205223 D	12.01.2006
		DK 1432439 T	03.04.2006
		ES 2254758 T3	16.06.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/000006

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2007/000006

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, EMBASE, NPL, EMBL

C DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	ES 2247942 A1 (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA (INIA)) 01.03.2006, todo el documento.	1-15
X	ROCHA, A., RUIZ, S., COLL, J. M. Improvement of transfection efficiency of epithelioma papulosum cyprini carp cells by modification of cell cycle and use of an optimal promoter. Marine Biotechnology, Vol. 6, Nº 5, páginas 401-410. ISSN 1436-2228.	1-15
X	EP 0773295 A2 (OTTAWA CIVIC HOSPITAL) 14.05.1997, todo el documento.	1, 3, 5-15
Y		2, 4
Y	WO 2003/031469 A2 (MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS-, UND VERTRIEBS, GMBH) 17.04.2003, SEC. ID. NO. 1 y SEC. ID. NO. 2	2, 4

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulteior publicado con posteioridad a la fecha de presentación internacional o de ppoitdad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del pncipio o teoría que constituye la base de la invención
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posteior		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de ppoitdad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posteioridad a la fecha de ppoitdad reivindicada	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

16 Mayo 2007 (16.05.2007)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

23 de mayo de 2007 (23/05/2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relafio Reyes

Nº de teléfono + 34 91 3493047

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2007/000006

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	FERNÁNDEZ- ALONSO, M., ROCHA, A., COLL, J. M .DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. Vaccine. Abril 2001, VoL 19, N° 23-24, páginas 3067-3075. ISSN0264-410X.	1-15
Y	Base de datos EMBL; 09.11.2004; [en línea]; Renilla luciferase repórtor vector pGL4.75[hRluc/CMV]; número de acceso AY738231	1-15
A	GRABHER, C , HENRICH, T., SASADO, T. et al. Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. Gene. Diciembre 2003, Vol. 322, páginas 57-66. ISSN 0378-1119.	9
A	DAVIDSON, A. E., BALCIUNAS, D., MOHN, D. et al. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the <i>Sleeping Beauty</i> transposon. Developmental Biology. Noviembre 2003, Vol. 263, N° 2, páginas 191-202. ISSN 0012-1606.	9

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2007/000006

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2247942 A1	01.03.2006	WO 2006/035084 A1	06.04.2006
EP 0773295 A2	14.05.1997	CA 2499302 A1	08.05.1997
		CA 2189831 A	08.05.1997
		NO 964713 A	09.05.1997
		JP 9285291 A	04.11.1997
		EP 0839913 A2	06.05.1998
		US 5780448 A	14.07.1998
		US 6180614 B1	30.01.2001
		AT 331030 T	15.07.2006
		DE 69736163 D	03.08.2006
		PT 839913 T	29.09.2006
		DK 0773295 T	27.12.2006
		DE 69736163 T	03.05.2007
WO 2003/031469 A2	17.04.2003	AU2002349277A1,A8	22.04.2003
		US2004235771 A1	22.04.2003
		CN 1564694 A	12.01.2005
		EP 1432439 B1	07.12.2005
		AT 311899 T	15.12.2005
		DE 50205223 D	12.01.2006
		DK 1432439 T	03.04.2006
		ES 2254758 T3	16.06.2006

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2007/000006

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)