



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 321 789**

⑫ Número de solicitud: 200700563

⑬ Int. Cl.:
C12N 7/00 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **02.03.2007**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2009**

Fecha de la concesión: **01.03.2010**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **15.03.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
15.03.2010

⑲ Titular/es: **Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Ctra. de la Coruña, Km. 7,5
28040 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Tafalla Piñeiro, Carolina y
Col Morales, Julio**

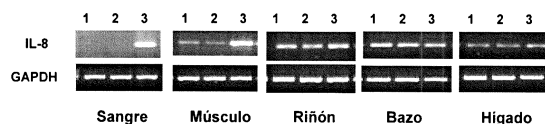
㉑ Agente: **Arizti Acha, Mónica**

㉒ Título: **Utilización del vector pIL8+ de trucha como inmunoestimulante o adyuvante para vacunas ADN en peces.**

㉓ Resumen:

Utilización del vector pIL8+ de trucha como inmunoestimulante o adyuvante para vacunas ADN en peces. Procedimiento para inmunizar peces de cultivo industrial contra la infección de rabdovirus, que comprende la administración de: a) una vacuna ADN que induce una respuesta inmune en los peces contra la infección de rabdovirus, en una cantidad inferior a la que produciría un 100% de protección inmunogénica; y b) un coadyuvante obtenido por clonación de la interleuquina-b (IL-8) de trucha en una cantidad suficiente para aumentar el efecto de la vacuna (a) entre un 10% y un 60%. Los peces son Truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). Los rabdovirus son el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV). El coadyuvante (b) es un plásmido denominado pIL8+ obtenido por clonación de la región codificante del gen de la IL-8 de Trucha Arco Iris en un vector de expresión eucariota. También incluye la composición farmacéutica y/o el kit conteniendo (a) y (b).

FIGURA 1



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Utilización del vector pIL8+ de trucha como inmunoestimulante o adyuvante para vacunas ADN en peces.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a la utilización del vector pIL8+ obtenido de Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) como inmunoestimulante o adyuvante para vacunas ADN para prevenir la infección de peces por virus. La presente invención también se refiere al procedimiento y dosis de utilización de dicho vector pIL8+ como adyuvante de las vacunas ADN concretamente frente a los rabdovirus, tales como el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoiética infecciosa IHNV). La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para inmunizar truchas contra el VHSV y el IHNV, que comprende una vacuna ADN y el pIL8+ como adyuvante.

15 **Estado de la técnica**

La población mundial es actualmente de 6 billones de personas y se estima que en el año 2050, seamos alrededor 9 billones. Este aumento de la población se traduce en un aumento del consumo de alimentos y también de pescado y mariscos. Así, desde el año 1991 al 97, se produjo un aumento en el consumo mundial de pescado y mariscos aproximadamente 10 millones de toneladas métricas. Pero los recursos pesqueros no son inagotables y es por ello que la FAO, en mayo de 1998 llamo la atención a la comunidad internacional para que se redujera en un 30% la capacidad pesquera mundial. Para contrarrestar este descenso en las capturas pesqueras, la acuicultura se ha desarrollado enormemente, duplicando su producción durante los años 92-97. En la actualidad 1 de cada 3 pescados o mariscos consumidos, se produjo en una instalación de acuicultura. Uno de los graves problemas que puede frenar el desarrollo de la acuicultura son las enfermedades, fundamentalmente las producidas por virus. Se estima que alrededor del 10% de las especies acuáticas cultivadas, murió como consecuencia de enfermedades, la mayoría de ellas víricas. Por ejemplo en 1991, 1 millón de toneladas de trucha murieron en los Estados Unidos, como consecuencia de una infección por el Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV).

El impacto económico que estas enfermedades provocan en la acuicultura mundial es muy grande y por ello es necesario desarrollar estrategias de prevención (vacunas) de estas enfermedades.

Las primeras vacunas contra enfermedades bacterianas en las piscifactorías se desarrollaron en los 1970s, y se introdujeron en la acuicultura comercial en los 1980s. Como consecuencia ha disminuido grandemente la utilización de antibióticos lo que ha contribuido a una mayor aceptación de los peces crecidos en piscifactorías por parte del consumidor. Además, la salud de los peces ha mejorado notablemente desde la introducción de las vacunas.

Así, para la prevención de estas enfermedades virales nuevas vacunas están siendo desarrolladas. En concreto, los niveles de protección obtenidos con las recientes vacunas ADN no habían sido obtenidos con ninguna de las vacunas anteriores. Es por ello, por lo que se está trabajando en el diseño de vacunas de ADN más seguras y eficaces para controlar enfermedades víricas.

Entre los virus de peces que mayor impacto económico causan en la piscicultura europea destacan los rabdovirus. Los rabdovirus afectan, tanto a especies de peces tradicionalmente cultivadas (trucha, salmón, carpa), como a especies con perspectivas de incipiente cultivo y futuro desarrollo (lubina, rodaballo, anguila) y también a especies silvestres (carpa, Lucio) incluidos incluso algunos crustáceos cultivados (langostinos).

De todos los virus de peces actualmente conocidos, los rabdovirus junto con los birnavirus constituyen el grupo más numeroso y más extendido por todo el mundo. De estos dos grupos, los rabdovirus tienen una mayor incidencia económica porque causan altas mortalidades en adultos. Entre los rabdovirus de peces que se han aislado e identificado en Europa destacan los que afectan a peces de agua fría como el virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica y el virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa, conocidos por sus iniciales en inglés VHSV e IHNV respectivamente.

Entre un 20% y un 40% del tonelaje anual se pierde por rabdovirosis a nivel mundial (Europa, Estados Unidos y Japón). Ninguna otra patología infecciosa o no, vírica, bacteriana o parasitaria, causa semejantes pérdidas en Acuicultura.

Ha habido varios intentos para desarrollar vacunas tipo tradicional con virus atenuados o inactivados pero estos conllevan un alto coste.

Hace ya más de 15 años que se empezaron a investigar las vacunas genéticas (vacunas ADN) y desde entonces se han desarrollado vacunas para hacer resistentes a los humanos frente a diversas infecciones virales, como por ejemplo la hepatitis B, el herpes 1 y 2 o el virus de la polio.

La vacunación con ADN consiste en administrar al organismo receptor el gen que codifica el antígeno inmunógeno en lugar del propio antígeno. La subsiguiente expresión del gen en las células del animal vacunado activa su sistema inmunitario.

En los últimos años, la vacunación genética frente a los rhabdovirus de peces, tanto el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) como el virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV) ha demostrado ser muy efectiva utilizando un plásmido de expresión que codifica para la glicoproteína G del virus mediante la acción de un promotor del citomegalovirus (CMV) incluido en el plásmido. Estos plásmidos para conferir protección deben de ser inyectados intramuscularmente en el pez, donde se expresará la glicoproteína viral, desatando la respuesta inmune [1: Leong JC, Anderson E, Bootland LM, Chiou PW, Johnson M, Kim C, *et al.*. Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Dev Biol Stand* 1997; 90: 267-77; and US 5,354,555 (Jo-Ann C. Leong); 2: Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Heppell J, Wu T, Davis H. Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol*. 1998; 8: 261-70.; 3: LaPatra SE, Corbeil S, Jones GR, Shewmaker WD, Lorenzen N, Anderson ED, *et al.* Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine* 2001; 19: 4011-9.] A pesar de que los mecanismos a través de los cuales confieren protección todavía no están claros [4: Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, Benmansour A. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 1998; 249: 297-306.; 5: McLauchlan PE, Collet B, Ingerslev E, Secombes CJ, Lorenzen N, Ellis AE. DNA vaccination against viral haemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection-early protection correlates with Mx expression. *Fish & Shellfish Immunol* 2003; 15(1): 39-50.], los mecanismos de defensa inespecíficos, que pueden incrementarse mediante el uso de adyuvantes, tienen un papel muy importante en la protección conferida [5: McLauchlan PE, Collet B, Ingerslev E, Secombes CJ, Lorenzen N, Ellis AE. DNA vaccination against viral haemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection-early protection correlates with Mx expression. *Fish & Shellfish Immunol* 2003; 15(1): 39-50.; 6: Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, LaPatra SE. DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunol* 2002; 12(5): 439-53.; 7: Purcell MK, Kurath G, Garver KA, Herwig RP, Winton JR. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunol* 2004; 17(5): 447-62.].

Además, hay otros aspectos que también podrían verse favorablemente afectados por el uso de adyuvantes tales como el poder utilizar rutas de administración mas cómodas o como disminuir el coste de la vacuna.

En los mamíferos, las citoquinas (proteínas de bajo peso molecular con funciones inmunes producidas generalmente por células del sistema inmune) se han estudiado en muchos casos como adyuvantes en vacunación contra los virus. Dentro de las citoquinas, el grupo de las quimioquinas, ha sido uno de los mas estudiados [8: Eo SK, Pack C, Kumaraguru U, Rouse BT. Optimisation of DNA vaccines for the prophylaxis and modulation of herpes simplex virus infections. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1(2): 213-25.; 9: Lusso P. HIV and chemokines: implications for therapy and vaccine. *Vaccine* 2002; 20: 1964-7.; 10: Ahlers JD, Belyakov IM, Berzofsky JA. Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines. *Curr Mol Med* 2003; 3(3): 285-301.]. Las quimioquinas son citoquinas producidas por distintos tipos celulares, que tienen entre otras funciones, propiedades quimioatrayentes. La familia de las quimioquinas se divide en 4 grupos, según la posición de sus dos primeras cisteínas conservadas en su secuencia. Existen quimioquinas CXC, CC, C y CX₃C que en los mamíferos tienen 28, 16, 2 y 1 miembros respectivamente [11: Laing KJ, Secombes CJ Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns. *Mol Immunol*. 2004; 41(8): 793-808]. Recientemente, se han descrito como los adyuvantes "inteligentes" de las vacunas ya que son capaces no solo de atraer mas células inmunes al sitio de inoculación, sino que además son capaces de modular el tipo de respuesta inmune que se produce [9: Lusso P. HIV and chemokines: implications for therapy and vaccine. *Vaccine* 2002; 20: 1964-7.]. En mamíferos, las quimioquinas se han testado como adyuvantes de vacunas ADN en plásmidos independientes, en el plásmido vacunal [12: Kim JJ, Yang JS, Dentschev T, Dang K, Weiner DB. Chemokine gene adjuvants can modulate immune responses induced by DNA vaccines. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20(5): 487-98.; 13: Eo SK, Lee S, Kumaraguru U, Rouse BT. Immunopotential of DNA vaccine against herpes simplex virus via co-delivery of plasmid DNA expressing CCR7 ligands. *Vaccine*. 2001; 19(32): 4685-93.; 14: Barouch DH, McKay PF, Sumida SM, Santra S, Jackson SS, Gorgone DA, *et al.* Plasmid chemokines and colony-stimulating factors enhance the immunogenicity of DNA priming-viral vector boosting human immunodeficiency virus type 1 vaccines. *J Virol* 2003; 77(16): 8729-35.; 15: Toka FN, Gierynska M, Rouse BT. Code-livery of CCR7 Ligands as Molecular Adjuvants Enhances the Protective Immune Response against Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol* 2003; 12742-52.], o fusionadas al antígeno [16: Ruffini PA, Biragyn A, Coscia M, Harvey LK, Cha SC, Bogen B *et al.* Genetic fusions with viral chemokines target delivery of nonimmunogenic antigen to trigger antitumor immunity independent of chemotaxis. *J Leukoc Biol* 2004; 76(1): 77-85.].

La interleuquina 8 (IL-8) es una quimioquina del tipo CXC producida por varios tipos celulares. En mamíferos, la producen los monocitos/macrófagos, las células epiteliales, los neutrófilos, los fibroblastos y las células endoteliales en respuesta a una infección o a las citoquinas como la IL-1 β o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) [17: Mukaida N, Hishinuma A, Zachariae CO, Oppenheim JJ, Matsushima K. Regulation of human interleukin 8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for interleukin-8. *Adv. Exp Med Biol* 1991; 305: 31-8.; 18: Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55: 97-179.]. La IL-8, siendo una quimioquina del tipo CXC, atrae principalmente a neutrófilos, los cuales además se activan en respuesta a la IL-8, activándose la síntesis del leucotrienos [19: Fogh K, Larsen CG, Iversen L, Kragballe K. Interleukin-8 stimulates the formation of 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid by human neutrophils *in vitro*. *Agents Actions* 1992; 35(3-4): 227-31.], la liberación de su contenido granular [20: Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD, Weiss J, Zychlinsky A. Neutrophil elastase targets virulence factors of entero-

bacteria. Nature 2002; 417(6884): 91-4.; 21: Gomez HF, Ochoa TJ, Carlin LG, Cleary TG. Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri*. J Infect Dis 2003; 187(1): 87-95.], la adherencia a células endoteliales y la producción de óxido nítrico [19: Fogh K, Larsen CG, Iversen L, Kragballe K. Interleukin-8 stimulates the formation of 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid by human neutrophils *in vitro*. Agents Actions 1992; 35(3-4): 227-31.; 22: Nourshargh S, Perkins JA, Showell HJ, Matsushima K, Williams TJ, Collins PD. A comparative study of the neutrophil stimulatory activity *in vitro* and pro-inflammatory properties *in vivo* of 72 amino acid and 77 amino acid IL-8. J Immunol 1992; 148(1): 106-11.]. La IL-8 también es capaz de atraer a otros tipos celulares tales como los basófilos, linfocitos T, y células NK, siendo también capaz de aumentar la permeabilidad de las células endoteliales [18: Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC chemokines. Adv Immunol 1994; 55: 97-179.; 23: Larsen CG, Anderson AO, Apella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. Neutrophil activating protein 1 (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. Science 1989; 243: 1464-6.; 24: White MV, Yoshimura T, Hook W, Kaliner M, Leonard EJ. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. Immunol Left 1989; 22: 151-4.; 25: Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. Cytokine Growth Factor Rev 1998; 9(1): 9-23.]. En los mamíferos, algunos estudios se han centrado en el uso de la IL-8 como adyuvante en vacunas. Por ejemplo, Kim y colaboradores [12: Kim JJ, Yang JS, Dentshev T, Dang K, Weiner DB. Chemokine gene adjuvants can modulate immune responses induced by DNA vaccines. J Interferon Cytokine Res 2000; 20(5): 487-98.] determinaron que la co-administración de IL-8 con una vacuna ADN aumentaba el título de anticuerpos y la proliferación de linfocitos Th. En otro estudio, se demostró que la co-administración de la IL-8 aumentaba significativamente los niveles de citoquinas del tipo Th1 tales como IL-2 o IFN- γ , y de otras quimioquinas como RANTES (*regulated on activation, normal T cells expressed and secreted*) o la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) [26: Sin J-I, Kim JJ, Pachuk C, Satishchandran C, Weiner DB. DNA vaccines encoding Interleukin-8 and RANTES enhance antigen-specific Th1-type CD4⁺ T-cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 *in vivo*. J Virol 74(23): 11173-80.]. Todos estos resultados demostraron la capacidad de la IL-8 de mamíferos para modular la producción de citoquinas *in vivo* y por lo tanto llevar la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo Th1, la cual es más eficaz para conferir resistencia antiviral.

En peces, se ha identificado un homólogo de IL-8 en lamprea (*Lampetra fluviatilis*) [27: Najakshin AM, Mechetina LV, Alabyev BY, Taranin AV. Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary divergence of chemokines. Eur J Immunol 1999; 29(2): 375-82.] y se ha clonado y secuenciado la IL-8 en lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) [28: Lee EY, Park HH, Kim YT, Choi TJ. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gene 2001; 274: 237-43.].

En la solicitud de patente ES 2189608 A1 (2003) se describe el procedimiento para la obtención de la IL-1 β recombinante de dorada (*Sparus aurata* L.). Se sugiere su uso como inmunoestimulante y adyuvante en peces de cultivo industrial, dando un ejemplo de tratamiento de doradas infectadas con bacterias de cepa no virulenta de *Vibrio anguillarum*. También se sugiere su utilidad como adyuvante de vacunas en los citados peces pero en los resultados no se menciona el tipo de vacunas ni contra qué elementos patógenos pueden actuar dichas vacunas.

En el caso de la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*), se ha identificado y analizado una molécula análoga a la IL-8 [29: Laing KJ, Zou JJ, Wang T, Bois N, Hirono I, Aoki T *et al.* Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Devel Comp Immunol 2002; 26: 433-44.; 30: Sangrador-Vegas A, Lennington JB, Smith TJ. Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization Cytokine 2002; 17(2): 66-70.]; y se ha descrito la donación de nuevas isoformas de la IL-8 también en Trucha Arco Iris [31: Fujiki K, Gauley J, Bols NC, Dixon B. Genomic cloning of novel isotypes of the rainbow trout interleukin 8. Immunogenetics 2003; 55: 126-31.].

Sin embargo, hasta el momento, no se conoce a fondo el papel de esta quimioquina en ninguna de estas especies. Por el momento, en el ámbito de la regulación de su expresión, se sabe que se induce como respuesta a LPS [28: Lee EY, Park HH, Kim YT, Choi TJ. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gene 2001; 274: 237-43.; 29: Laing KJ, Zou JJ, Wang T, Bols N, Hirono I, Aoki T *et al.* Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Devel Comp Immunol 2002.] o Poly I:C [29: Laing KJ, Zou JJ, Wang T, Bols N, Hirono I, Aoki T *et al.* Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Devel Comp Immunol 2002.].

En la solicitud de patente US 5,354,555 (1994) se describe la utilización conjunta de los plásmidos pG8 y pUC8 para vacunar contra el virus IHN en peces.

La solicitud de patente WO 98/17802 A1 (1998), hace referencia a la donación de la interleuquina IL-1 β de Trucha Arco Iris y proporciona el ácido nucleico que la codifica, así como variantes y homólogos. La invención presenta un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica para el polipéptido de interés, así como las apropiadas secuencias reguladoras para la expresión del polipéptido (tanto en sistemas de expresión *in vitro* como *in vivo*). El documento describe el uso terapéutico o profiláctico de una composición que comprenda el vector que codifica para IL-1 β de acuerdo con la invención. Así mismo, reivindica el efecto adyuvante del polipéptido, en la administración a peces.

El documento de patente WO 02/36070 A2 describe una nueva quimioquina obtenida de los peces, entre ellos de la Trucha Arco Iris, la quimioquina-2 o CK-2. En otros aspectos, la invención se refiere a los nuevos polipéptidos corres-

pondientes a la quimioquina CK-2 así como a los ácidos nucleicos que codifican para la quimioquina CK-2 y vacunas que se componen de un inmunógeno y dicha quimioquina CK-2, etc. La administración de CK-2 en combinación con un inmunógeno o vacuna, provoca el aumento de la respuesta inmune en el organismo (preferentemente en peces, como la Trucha Arco Iris). El documento reivindica un método para aumentar la respuesta inmune en peces frente a un
 5 inmunógeno mediante la administración al pez de cantidades efectivas de inmunógeno y el polipéptido CK-2, siendo esta administración a través de un primer vector de expresión que comprenda el ácido nucleico que codifica para el polipéptido inmunógeno y de un segundo vector de expresión que comprenda el ácido nucleico que codifique para el polipéptido CK-2; estando ambos vectores operativamente asociados con una secuencia de control de expresión. La invención también se refiere a métodos de selección útiles para identificar y/o aislar genes que codifiquen nuevas
 10 quimioquinas, citoquinas u oncogenes.

Por lo tanto sería deseable obtener un nuevo vector que actúe como inmunoestimulante o coadyuvante en la protección de las Truchas Arco Iris frente a los rhabdovirus cuando se las inmuniza con una vacuna ADN, de forma que se pueda disminuir la dosis de la vacuna empleada y por lo tanto disminuir o eliminar los efectos secundarios que una
 15 alta concentración de dicha vacuna puedan originar en la población de las truchas.

Los autores de la presente solicitud han publicado un artículo [32: N. Jimenez, J. Coll, F.J. Salguero, C. Tafalla. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vaccine 2006; 24: 5535-5654.] donde describen que la interleuquina-8 (IL-8) se induce de Trucha Arco Iris en respuesta a la infección con el virus VHSV. Además, se ha clonado la región codificante del gen de la IL-8 de Trucha Arco Iris en un vector de expresión eucariótica (pcDNA3.1-YOPO V5-HIS) y el vector generado, denominado pIL8+, se ha inyectado intramuscularmente en la Trucha Arco Iris produciendo un aumento de la infiltración linfocitaria. Se ha co-inyectado con una vacuna ADN frente a VHSV y se ha estudiado su efecto sobre varias citoquinas (IL-1 β , TNF- α , IL-11, TGF- β e IL-18) como respuesta a la vacuna especialmente en el bazo. Según estos resultados parece que la IL-8 es capaz de modular la respuesta inmune de algunas citoquinas que se producen como respuesta a una vacuna y por lo tanto podría ser un adyuvante en vacunas ADN frente a VHSV.

Descripción de la invención

En la presente solicitud, se ha utilizado un plásmido que codifica para la IL-8 de trucha arco iris para ver sus efectos como adyuvante o inmunoestimulante de vacunas virales, ya que nuestros resultados anteriores indicaron que la IL-8 se induce en respuesta a la infección de VHSV [33: Tafalla C, Coll J, Secombes CJ. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. Dev Comp Immunol. 2005; 29(7): 615-26.], sugiriendo algún papel en la defensa contra este virus.

En primer lugar, una vez construido el plásmido pIL8+ a utilizar como adyuvante se ha probado su actividad, determinado en que órganos se expresaba la IL-8 tras su inyección intramuscular, así como verificando su capacidad quimio-atrayente. Se ha determinado que después de la inyección intramuscular del pIL8+, la expresión de la IL-8 se detecta en músculo, así como en sangre, tal como se describió para otras quimioquinas administradas a la platija japonesa [34: Kono T, Kusuda R, Kawahara E, Sakai M. The analysis of immune responses of a novel CC-chemokine gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Vaccine 2003; 21: 446-57.], lo que conduciría a una mayor respuesta sistémica. El plásmido control pIL8- en el cual el ORF de la IL-8 se clonó en la orientación incorrecta, se probó en paralelo, para verificar que los efectos del pIL8+ no eran debidos a motivos CpG que pudieran estar presentes en el plásmido. Comprobamos que el pIL8- no tenía un efecto en la transcripción IL-8, y por lo tanto constituyó un buen control negativo para otros experimentos. También hemos verificado que tras la inyección de pIL8+ se observa una mayor infiltración celular en el sitio de la inoculación, mayor que la observada con el plásmido control pIL8-. Se observaron una gran cantidad de neutrófilos en el sitio de la inoculación del pIL8+ tal como ocurre en mamíferos, sin embargo, es posible que otros tipos celulares tales como linfocitos de T sean atraídos por esta quimioquina tal como ocurre en mamíferos [23: Larsen CG, Anderson AO, Apella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. Neutrophil activating protein 1 (NAP-1) is also chemotactic for *T lymphocytes*. Science 1989; 243: 1464-6.]. También hemos comprobado que la inyección de pIL8+ es capaz de inducir por sí sola la expresión de las IL-1 β , TNF- α , IL-11, TGF- β e IL-18 en el bazo al tercer día después de la inyección y también en el séptimo día en el caso del TGF- β y de la IL-18.

En el músculo, también hemos demostrado que la inyección del plásmido pIL8+ induce otras quimioquinas de tipo CC tales como la CK5B, la CK6 y la CK7A, así como TNF- α e iNOS. El hecho de que la IL-8, que atrae principalmente neutrófilos, induzca a su vez otras quimioquinas de tipo CC que en teoría inducen la migración de macrófagos facilitaría que se induzca una respuesta inmune más completa en el sitio de inyección.

Una vacuna ADN cuando se inyecta en el músculo produce una respuesta sistémica inmune que es de gran importancia a la hora de determinar la protección que esta vacuna va a conferir. Es por esto, que también estudiamos como la co-administración del plásmido pIL8+ junto con la vacuna podía alterar los niveles de citoquinas que se inducen en una etapa temprana frente a la vacuna. El hecho de que la IL-8 sea capaz de modular la respuesta temprana de citoquinas frente a la vacuna, según lo visto en mamíferos, sugiere que tiene consecuencias en la inmunogenicidad. Nos hemos centrado en determinar el efecto de la IL-8 en dos citoquinas típicamente pro-inflamatorias tales como IL-1 β y TNF- α 1, dos citoquinas fundamentalmente inhibitorias como el TGF- β y la IL-11; así como una citoquina del tipo Th1, tal como la IL-18. Nos centramos en el efecto observado en bazo y riñón anterior, puesto que estos dos órganos son los principales órganos linfoides en peces así como sitios importantes de replicación de VHSV [35: Wolf K. Viral he-

- morrhagic septicemia. In: Fish Viruses and Fish Viral Diseases: Ithaca, NY, Cornell University Press. 1988: 217-49.]. Respecto a las dos citoquinas pro-inflamatorias estudiadas, la co-administración de pIL8+ aumentó significativamente la expresión en respuesta a la vacuna en el bazo en los días 3 y 7 posteriores a la inyección en el caso de la IL-1 β . En el caso de la IL-11, no se encontró un efecto significativo de la co-administración de pIL8+ en sus niveles de expresión.
- 5 En mamíferos, IL-11 es una citoquina anti-inflamatoria, que inhibe la producción de las citoquinas pro-inflamatorias producidas por los macrófagos, incluyendo IL-1 β , TNF- α e IL-12 [36: Trepicchio WL, Bozza M, Pedneault G, Dorner AJ. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol* 1996; 157: 3627-34.]. La IL-11 también inhibe las funciones de las células T, disminuyendo principalmente citoquinas de tipo Th1 tales como IL-12 e interferón γ (IFN- γ) [43: Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M *et al.* Interferon-gamma-inducing factor enhances T
- 10 helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production. *Eur J Immunol* 1996; 26, 1647-51.] mientras que realza las citoquinas Th2 tales como IL-4 e IL-10 [37: Bozza M, Bliss JL, Dorner AJ, Trepicchio WL. Interleukin-11 modulates Th1/Th2 cytokine production from activated CD4+ T cells. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21(1): 21-30.; 38: Curti A, Ratta M, Corinti S, Girolomoni G, Ricci F, Tazzari P *et al.* Interleukin-11 induces Th2 polarization of human CD4+ T cells *Blood* 2001; 97(9): 2758-63.]. La co-administración de pIL8+ sí que tuvo sin embargo un efecto en otra de las citoquinas anti-inflamatorias estudiadas, TGF- β , ya que aumentó significativamente sus niveles de expresión en el bazo según se observó en los días 3 y 7 posteriores a la vacunación. En mamíferos, TGF- β inhibe la proliferación y diferenciación de linfocitos B y T, antagonizando con citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ [39: Lotz M, Seth P. TGF beta and HIV infection. *Ann NY Acad Sci* 1993; 685: 501-11.], sin embargo, se sabe que el TGF- β , en las primeras etapas de la infección, puede facilitar respuestas de CD8+T tales como su diferenciación [40: Suda T, Zlotnik A. *In vitro* induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. I. Transforming growth factor β and tumor necrosis factor α induce CD8 expression on CD8 thymic subsets including the CD25+CD3-CD4-CD8-Pre-T cell subset. *J Immunol* 1992; 148: 1737-45.] y secreción de IL-2 [41: Swaing SL, Huston G, Tonkonogy S, Weinberg A. Transforming growth factor β and IL-4 cause
- 25 helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype. *J Immunol* 1991; 147: 2991-3000.]. También estudiamos la expresión de otra citoquina, la IL-18 [42: Zou J, Bird S, Truckle J, Bois N, Horne M, Secombes C (2004) Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Eur J Biochem* 271(10): 1913-23.]. En trucha de arco iris, se ha demostrado que existe una forma de "splicing" alternativo de esta citoquina, con diferencias en su regulación. En este estudio, nos hemos centrado en la forma predominante de IL-18 de trucha. En mamíferos, esta citoquina induce la producción de IFN- γ , de TNF- α y de GM-CSF y para sinergizar con IL-12 [43: Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M *et al.* Interferon-gamma-inducing factor enhances T
- 30 helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production. *Eur J Immunol* 1996; 26, 1647-51.], para activar a los linfocitos Th1 [44: Xu D, Ling Chan W, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW *et al.* Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* Volume 1998; 188(8): 1485-92.]. En ausencia de IL-12, puede también estimular las respuestas Th2 [45: Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 423-74.]. IL-18 también actúa sobre los neutrófilos activando su estallido respiratorio y su degranulación [46: Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C *et al.* A Role for IL-18 in Neutrophil Activation. *J Immunol* 2001; 167: 2879-86.]. En mamíferos, la producción IL-18 se regula sobre todo en un nivel del post-transcripcional con la activación de un precursor inactivo [45: Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 423-74.] y con la producción de una proteína inhibitoria de IL-18 [47: Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999;10(1): 127-36.]. En trucha arcoiris, aunque la expresión de IL-18 no se vio afectada en respuesta a LPS, Poly I:C ni rIL-1 β en macrófagos de riñón, sí que lo hizo en la línea celular fibroblástica RTG-2. En estas células tanto Poly I:C como LPS disminuyeron significativamente la expresión de IL-18, mientras que realizaron la expresión de la forma alternativa de "splicing", sugiriendo alguna regulación transcripcional [42: Zou J, Bird S, Truckle J, Bois N, Horne M, Secombes C (2004) Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow
- 40 trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Eur J Biochem* 271(10): 1913-23.]. La co-administración de la pIL8+ en este caso lo que hizo es disminuir significativamente la expresión de IL-18 en riñón anterior a día 3 y aumentarla significativamente a día 10.

También hemos estudiado si la co-inyección del plásmido pIL8+ con la vacuna tiene efectos sobre la inducción de otras quimioquinas CC responsables de atraer macrófagos. La vacuna por sí sola induce CK5B y CK7A en riñón, mientras que en presencia de la IL-8 se induce también bazo, lo que repercutirá beneficiosamente en la protección conferida. Además el plásmido pIL8+ por sí solo aumenta la expresión de CK5B en riñón y de CK7A en bazo sumándose a la inducción que se observa en el músculo.

60 Finalmente hemos comprobado el efecto adyuvante del plásmido pIL8+ actuando conjuntamente con las vacunas ADN concretas contra peces rhabdovirus. Los dos rhabdovirus de peces estudiados, el IHNV y el VHSV tienen una alta homología, sus mecanismos de infección son similares, y las vacunas ADN funcionan de una manera totalmente paralela para los dos [48: Lorenzen N. Use of plasmid DNA for induction of protective immunity. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 2004;24: 11-5.; 49: Lorenzen N, LaPatra SE. DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Science Technology Office International Epizootics* 2005;24: 201-13.]. Por lo tanto, debido a la posibilidad de realizar los estudios de supervivencia en unas instalaciones a gran escala con el IHNV, los autores de la presente solicitud han llevado a cabo pruebas en las que han utilizado el plásmido pIL8+ como coadyuvante en la vacuna ADN frente a IHNV en Trucha Arco Iris.

Los resultados de la utilización del plásmido pIL8+ como inmunoestimulante y/o coadyuvante en la vacuna ADN con la cantidad inicial de pIL8+ considerada como óptima, según su capacidad de modular la respuesta inmune de algunas citoquinas en diversos órganos, no ha producido resultados totalmente satisfactorios por lo que también se han llevado a cabo pruebas en las que se ha utilizado el plásmido pIL8+ como inmunoestimulante y/o coadyuvante en la vacuna ADN con varias concentraciones y los autores de la presente solicitud han encontrando sorprendentemente que cuanto menor es la dosis del pIL8+, mayor es su efecto coadyuvante de la vacuna ADN con que se inyecta.

Así, un objeto de la presente invención es un procedimiento para inmunizar peces, preferiblemente truchas, y más preferiblemente Truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*), contra la infección de rabdovirus, preferiblemente el VHSV y/o el IHNV, que comprende la administración de: a) una vacuna ADN que induce una respuesta inmune en los peces contra la infección de rabdovirus, en una cantidad inferior a la que produciría un 100% de protección inmunogénica, preferiblemente una cantidad tal que esté comprendida entre el 40% y el 90%, más preferiblemente entre el 45% y el 80%, o todavía más preferiblemente entre el 50% y el 70%, de la cantidad que produciría una protección inmunogénica del 100%; y b) un coadyuvante obtenido por clonación de la interleuquina-8 (IL-8) de trucha, denominado pIL8+ obtenido por clonación de la región codificante del gen de la IL-8 de Trucha Arco Iris en un vector de expresión eucariota, cuya secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ. ID. No. 1, en una cantidad suficiente para aumentar el efecto de la vacuna (a) entre un 10% y un 60%, preferiblemente entre un 15% y un 50%, más preferiblemente entre un 20% y un 40%, y todavía más preferiblemente entre un 25% y un 35%.

Otro objeto de la presente invención es la utilización de un plásmido obtenido por clonación de la interleuquina-8 (IL-8) de Trucha Arco Iris, denominado pIL8+ obtenido por clonación de la región codificante del gen de la IL-8 de Trucha Arco Iris en un vector de expresión eucariota, cuya secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ. ID. No. 1, en el procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus de acuerdo que cuando se utiliza con una vacuna ADN contra rabdovirus incrementa entre un 10% y un 60%, preferiblemente entre un 15% y un 50%, más preferiblemente entre un 20% y un 40%, y todavía más preferiblemente entre un 25% y un 35% el efecto de dicha vacuna.

Y, otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para inmunizar peces, preferiblemente truchas, y más preferiblemente Truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*), contra la infección de rabdovirus, preferiblemente el VHSV y/o el IHNV, que comprende la administración de: a) una vacuna ADN que induce una respuesta inmune en los peces contra la infección de rabdovirus, en una cantidad inferior a la que produciría un 100% de protección inmunogénica, preferiblemente una cantidad tal que esté comprendida entre el 40% y el 90%, más preferiblemente entre el 45% y el 80%, o todavía más preferiblemente entre el 50% y el 70%, de la cantidad que produciría una protección inmunogénica del 100%; y b) un coadyuvante obtenido por clonación de la interleuquina-8 (IL-8) de trucha, denominado pIL8+ obtenido por clonación de la región codificante del gen de la IL-8 de Trucha Arco Iris en un vector de expresión eucariota, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ. ID. No. 1, en una cantidad suficiente para aumentar el efecto de la vacuna (a) entre un 10% y un 60%, preferiblemente entre un 15% y un 50%, más preferiblemente entre un 20% y un 40%, y todavía más preferiblemente entre un 25% y un 35%. Dicha composición además comprende los vehículos o excipientes necesarios para contener los ingredientes (a) y (b) en una forma farmacéuticamente adecuada para su administración, por inyección intramuscular.

Descripción de las figuras

Figura 1. Expresión de transcritos de IL-8 en distintos órganos tras la inyección intramuscular del plásmido pIL8+. Las truchas se inyectaron con PBS (1), con el plásmido control pIL8- (2) o con el plásmido pIL8+ (3) y después de 1 ó 3 días, se determinó la expresión de IL-8 por RT-PCR. La figura muestra los resultados obtenidos a los 3 días post-inyección, que fueron idénticos a los obtenidos a día 1.

Figura 2. Cortes histológicos (H&E) del tejido muscular en los que se muestran las zonas de inyección de los peces inoculados con el plásmido pIL8+. (A) Peces controles muestreados a 3 días post-inyección. Algunas fibras musculares se muestran necróticas debido a la inyección, pero no se observa infiltración leucocitaria. 200x (B) Infiltración celular (i) rodeando las fibras musculares (m) en la musculatura dorsal de peces inoculados con el pIL8+ y muestreados a día 3. 200x. (C) Infiltración de neutrófilos (flechas) junto con algunos eritrocitos (cabezas de flechas) en el punto de inoculación de un pez tratado con pIL8+ después de 3 días. 400x.

Figura 3. Efecto de la co-administración de la IL-8 en la expresión de IL-1 β en respuesta a pMCV1.4-G. Niveles de expresión de IL-1 β en bazo (A) y riñón anterior (B) de peces controles (Grupo 1), peces inyectados intramuscularmente con 0.5 μ g de pMCV1.4-G (Grupo 2), peces inyectados con 0.5 μ g de pMCV1.4-G y 0.5 μ g de plásmido control pIL8- (Grupo 3), inyectados con 0.5 μ g de pMCV1.4-G y 0.5 μ g de pIL8+ (Grupo 4) o tratados con el plásmido pIL8+ únicamente (Grupo 5). Los datos se presentan como la media de la expresión relativa a la expresión de GAPDH $\pm$ SD para 5 individuos en cada grupo. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles (Grupo 1), mientras que los valores marcados con "b" son significativamente diferentes a los peces tratados con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8- (Grupo 3).

Figura 4. El efecto de la co-administración de la IL-8 en la expresión de TNF- α 1 en respuesta a pMCV1.4-G se determinó como se describe en la leyenda de la figura 3. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles (Grupo 1), mientras que los valores marcados con "b" son significativamente diferentes a los peces tratados con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8- (Grupo 3).

Figura 5. El efecto de la co-administración de la IL-8 en la expresión de IL-11 en respuesta a pMCV1.4-G se determinó como se describe en la leyenda de la figura 3. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles (Grupo 1), mientras que los valores marcados con "b" son significativamente diferentes a los peces tratados con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8- (Grupo 3).

Figura 6. El efecto de la co-administración de la IL-8 en la expresión de TGF- β en respuesta a pMCV 1.4-G se determinó como se describe en la leyenda de la figura 3. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles (Grupo 1), mientras que los valores marcados con "b" son significativamente diferentes a los peces tratados con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8- (Grupo 3).

Figura 7. El efecto de la co-administración de la IL-8 en la expresión de IL-18 en respuesta a pMCV1.4-G se determinó como se describe en la leyenda de la figura 3. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles (Grupo 1), mientras que los valores marcados con "b" son significativamente diferentes a los peces tratados con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8- (Grupo 3).

Figura 8. El efecto de la co-administración de la IL-8 en la expresión de CK5B en respuesta a pMCV1.4-G se determinó como se describe en la leyenda de la figura 3. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles (Grupo 1), mientras que los valores marcados con "b" son significativamente diferentes a los peces tratados con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8- (Grupo 3).

Figura 9. El efecto de la co-administración de la IL-8 en la expresión de CK6 en respuesta a pMCV1.4-G se determinó como se describe en la leyenda de la figura 3. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles (Grupo 1), mientras que los valores marcados con "b" son significativamente diferentes a los peces tratados con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8- (Grupo 3).

Figura 10. El efecto de la co-administración de la IL-8 en la expresión de CK7A en respuesta a pMCV1.4-G se determinó como se describe en la leyenda de la figura 3. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles (Grupo 1), mientras que los valores marcados con "b" son significativamente diferentes a los peces tratados con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8- (Grupo 3).

Figura 11. Expresión de distintas citoquinas en músculo en peces tratados con el plásmido pIL8+ en comparación con los peces controles a días 3 y 7 post-inyección. Los datos se presentan como la media de la expresión relativa a la expresión de GAPDH $\pm$ SD para 3 individuos en cada grupo. Los valores marcados con "a" son significativamente diferentes que los obtenidos en peces controles.

Figura 12. Para confirmar el hecho de que la IL8 de trucha tiene una potente actividad quimioatrayente y que por lo tanto se puede considerar un buen candidato a adyuvante, se realizaron ensayos *in vitro* para verificar esta actividad. Se transfectaron células EPC de carpa con 1 μ g de pIL8+ o con 1 μ g de pIL8- como control utilizando Eugene (Roche). A las 72 h se recogieron los sobrenadantes de estas células y se colocaron en la parte inferior de cámaras de quimiotaxis (Nunc) en las que un filtro de 3 μ m separa a los leucocitos totales de sangre que se introdujeron en la parte superior. Después de 90 min de incubación a 20°C, los filtros se fijaron con etanol, y se tiñeron con Giemsa para proceder a contar el número de células que había migrado a la parte inferior de la cámara. Se contabilizó el número de células en 10 campos por trucha. Los sobrenadantes de células EPC transfectadas con el plásmido pIL8+ que deben de contener IL-8 de trucha, mostraron una fuerte actividad quimiotáctica para los leucocitos totales de sangre (Figura 12), confirmando las observaciones que se realizaron por histología en el músculo de peces inyectados con pIL8+.

Descripción detallada de la invención

A. Peces

Para todos los experimentos que se describen más adelante se utilizaron truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de unos 8-10 cm suministradas por Lillogen (León). Los peces se mantuvieron en el Centro de Investigaciones en Sanidad Animal (CISA-INIA) a 14°C y se alimentaron diariamente con una dieta comercial (Trow, León). Antes de comenzar los experimentos, los peces se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante 2 semanas.

B. Obtención del plásmido pIL8+ y del plásmido vacunal

Para amplificar toda la región codificante (ORF) de la IL-8 excluyendo el codón stop, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos a partir de la secuencia de la IL-8: full-IL-8F (5' AAGATGAGCATCAGAATGTCAGCCAG 3') SEQ. ID. No 2 y full-IL-8R (5' TTTGTTGTTGGCCAGCATCTTCTCAA 3') SEQ. ID. No 3. Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar la IL-8 en una muestra de cADN de un bazo de trucha infectada con VHSV tal como describieron anteriormente los mismos autores de la presente solicitud [33: Tafalla C, Coll J, Secombes CJ. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. Dev Comp Immunol. 2005; 29(7): 615-26.]. El producto de PCR (8 μ l) se visualizó en un gel de 2% agarosa teñido con bromuro de etidio, donde se observó una única banda de 294 pares de bases (pb) correspondientes al tamaño esperado. El producto de PCR (4 μ l) sin purificar se ligó directamente en el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto ligado se

utilizó para transformar bacterias competentes One Shot TOP10 *Escherichia coli* cells (Invitrogen). Los clones que contenían el inserto se identificaron por PCR y por secuenciación se verificó que tuvieran la orientación adecuada para una correcta transcripción. El plásmido resultante se denominó pIL8+. También se obtuvo un plásmido en el que la IL-8 estaba donada en la orientación incorrecta, al que se denominó pIL8-, el cual se utilizaría como control negativo en los experimentos, ya que tiene la misma secuencia de ADN pero no codifica para la IL-8.

El plásmido vacunal utilizado para probar la capacidad del pIL8+ como adyuvante fue el pMCV1.4-G, en el que el gen de la glicoproteína G de VHSV se ha clonado bajo el control del promotor largo del CMV, de forma similar a como lo describieron los mismos autores de la presente solicitud [50: Rocha A, Ruiz S, Tafalla C, Coll JM. Conformation and fusion defective mutants in the hypothetical phospholipid-binding and fusion peptides of the protein G of viral haemorrhagic septicemia salmonid rhabdovirus. J Virol 2004; 78: 9115-22.]. Este pMCV1.4-G contiene dos zonas adicionales de 218 pb y 687 pb con actividad "enhancer" y un intrón, aunque es más pequeño que su precursor pMOK (Ready Vector, Madrid) ya que en él se eliminaron mas o menos ~ 1 Kpb de secuencias innecesarias.

La secuencia de nucleótidos del plásmido pIL8+ se muestra en SEQ. ID. No 1.

C. Estudio de la Actividad transcripcional de la IL-8 tras la inyección intramuscular de pIL8+ por su expresión e histología

La actividad transcripcional del pIL8+ se determinó estudiando la expresión de la IL-8 en diversos órganos después de la inyección del plásmido, y mediante técnicas histológicas.

C.1. Materiales y métodos

Para estudiar en qué órganos se transcribe la IL-8 después de la inyección del pIL8+, los peces se inyectaron intramuscularmente con pIL8+ (0.5 µg en 100 µl de PBS por pez); con la misma cantidad de la construcción usada como control negativo, pIL8-; o con el mismo volumen de PBS. Los peces se sacrificaron a 1 y 3 días post-inyección, y de cada pez y se realizó un muestreo de sangre, músculo, riñón anterior, bazo e hígado. En los distintos órganos, se utilizó un método previamente descrito por los autores de la presente solicitud de RT-PCR para detectar la transcripción de la IL-8 [33: Tafalla C, Coll J, Secombes CJ. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. Dev Comp Immunol. 2005; 29(7): 615-26.]. También se tomaron muestras del músculo para histología. Estas muestras de la zona del músculo alrededor del punto de inoculación, incluyendo piel y musculatura dorsal se fijaron en fijador de Bouin durante 18 horas. Después de la fijación, las muestras se trataron con etanol 70% y se deshidrataron con una serie creciente de etanol a xylol para luego incluirse en parafina. De estos bloques, se obtuvieron secciones de 4 µm que se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E).

C.2. Resultados

Tras la inyección intramuscular del pIL8+, se detectó un incremento significativo de la expresión del mRNA de la IL-8 en el músculo (el triple o el cuádruple) y en la sangre (quíntuplo) de las truchas tratadas (Figura 1). Este aumento, que se observó tanto en los días 1 como 3 posteriores a la inyección, no se observó en los controles ni en los peces inyectados con el plásmido control pIL8-. En el caso del riñón, bazo e hígado los niveles de la expresión del mRNA de la IL-8 no mostraron diferencias entre los animales tratados con el plásmido pIL8+ y los controles.

También se estudió la infiltración de leucocitos en el músculo en los puntos de inoculación (Figura 2). La infiltración era significativamente más alta en los peces inoculados con el plásmido pIL8+ (Figura 2B) que la observada en los inoculados con PBS o con el plásmido de control pIL8- (Figura 2A). Estas células infiltradas eran principalmente neutrófilos pero también se pudieron observar algunos eritrocitos y linfocitos (Figura 2C).

D. Efecto de la co-inyección de pIL8+ y pMCV1.4-G en la expresión de citoquinas

Para determinar si la IL-8 es capaz de modificar la respuesta inmune producida frente al pMCV I.4-G, las truchas se inyectaron intramuscularmente con la vacuna en presencia o ausencia de pIL8+.

D.1. Materiales y métodos

Se utilizaron 100 peces que se dividieron en 5 grupos (20 peces por grupo) y se inyectó cada pez intramuscularmente con uno de los siguientes tratamientos:

- Grupo 1: 100 µl de PBS;
- Grupo 2: 100 µl de PBS con 0.5 µg de pMCV1.4-G;
- Grupo 3: 100 µl de PBS con 0.5 µg de pMCV1.4-G y 0.5 µg pIL8-;

- Grupo 4: 100 μ l de PBS con 0.5 μ g pMCV1.4-G y 0.5 μ g pIL8+; y

- Grupo 5: 100 μ l de PBS con 0.5 μ g pIL8+.

5 A los días 3 y 7 posteriores a la inyección, se sacrificaron cinco truchas de cada grupo y se les extrajo riñón anterior y bazo.

E. Síntesis de cADN

10

El RNA total de los distintos órganos se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se resuspendió en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) y se almacenó a -80°C hasta su utilización. Para obtener el cADN con la reverso-transcriptasa Superscript II (Invitrogen) y oligo dT (Invitrogen) se usaron 2 μ g de RNA. El protocolo se realizó según lo indicado por el fabricante. El cADN resultante se diluyó en una
15 proporción de 1:5 con agua tratada con DEPC y se almacenó a -20°C.

F. Efecto de la co-inyección del pIL8+ en la expresión de PCR de la IL-1 β , TNF- α 1, IL-11, TGF- β y IL-18 en el bazo y el riñón

20

Se estudió por reverso transcripción la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en el bazo y el riñón de los grupos vacunados tanto en presencia como en ausencia de pIL8+, de distintas citoquinas, tales como las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α 1, la IL-11 de tipo inhibidor, la TGF- β que transforma el factor del crecimiento, y finalmente la IL-18, una citoquina del tipo Th1.

25

F.1. Materiales y métodos

Todas las reacciones de amplificación se realizaron utilizando 0.5 μ l de dNTP (10 mM), 0.2 μ l de Taq polimerasa (5 unidades/ μ l, Invitrogen), 2.5 μ l de Taq 10x buffer, 0.75 μ l MgCl₂ (50 mM), 0.5 μ l de cada oligonucleótido (50 μ M) y 1
30 μ l de cADN en un volumen final del 25 μ l. En primer lugar, se realizó una PCR con oligonucleótidos para el GAPDH en todas las muestras como control positivo para la RT-PCR, puesto que el GAPDH se expresa constitutivamente en todos los órganos en igual medida. Estos productos de PCR también permitieron la verificación de que había cantidades equivalentes de cADN en todas las muestras y que por lo tanto la expresión de los distintos genes es comparable entre las muestras.

35

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los distintos genes, y los tamaños de los diversos productos de PCR se muestran en la Tabla 1. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research) y las condiciones de la amplificación consistieron siempre en un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos seguido por las condiciones específicas para cada muestra especificadas en la Tabla 1, tras lo cual se incubaron 7
40 minutos a 72°C para finalizar. Para cada gen, después de optimizar las condiciones de amplificación (Tabla 1), se realizaron por lo menos dos PCRs con distinto número de ciclos para determinar en qué punto de la amplificación las diferencias eran evidentes entre muestras. Una vez que se determinó el número óptimo de los ciclos (Tabla 1), todas las muestras fueron amplificadas dos veces para verificar los resultados. Los productos de PCR (8 μ l) se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las muestras a comparar siempre se cargaron en el mismo
45 gel. La intensidad de las bandas se estimó usando el software ImageGauge 4.0 (Fujifilm). El análisis semi-cuantitativo para cada gen se obtuvo dividiendo la intensidad de la banda del gen por la intensidad de su banda correspondiente de GAPDH, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

F.2. Resultados de la expresión de la IL-1 β y la TNF- α 1

50

En el bazo, el pMCV 1.4-G a la concentración utilizada, no fue capaz de inducir significativamente la expresión de IL-1 β , ni por separado ni junto con el plásmido de control pIL8- (Figura 3A). Sin embargo, cuando se administró el pMCV1.4-G con el pIL8+, en los días 3 y 7 posteriores a la inyección se observó un aumento de la expresión de la IL-1 β . Esta expresión era significativamente mayor que la de los controles no inyectados así como la del grupo inyectado
55 con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8-. El día 3, también se observó una inducción significativa de IL-1 β en los peces tratados con el plásmido pIL8+ únicamente. No se encontró ningún efecto en el riñón (Fig. 3B).

También se estudió la transcripción de TNF- α 1 en los grupos inyectados. En el bazo, a día 3, se observó una inducción significativa de TNF- α 1 únicamente en los peces inyectados con pMCV1.4-G y pIL8+, así como en los
60 peces tratados con el pIL8+ solo (Figura 4A). En el día 7, todavía se podía observar una cierta inducción, aunque no significativa debido a las altas variaciones individuales. No se observó ningún efecto sobre la expresión TNF- α 1 en el riñón anterior en los días 3 y 7 posteriores a la inyección (Figura 4B).

F.3. Resultados de la expresión de la IL-11 y el TGF- β

65

En el bazo, se observó una inducción significativa de la expresión del mRNA de la IL-11, en comparación con la observada en los controles, en todos los grupos en el día 3 posterior a la inyección (Figura 5A). Cuando el pMCV1.4-G fue administrado junto con el pIL8+, se observó una expresión más alta de IL-11, aunque no significativamente

diferente que la observada en el grupo tratado con pMCV1.4-G y el plásmido control pIL8-. En riñón anterior, en el día 3, solamente el grupo inyectado con pMCV1.4-G conjuntamente con pIL8+ expresó IL-11 en mayor cantidad que los controles (Figura 5B).

En el caso del TGF- β , después de 3 y 7 días, se observó un aumento significativo en los niveles de la expresión de esta citoquina en el bazo en todos los grupos comparados con el grupo de control, incluyendo el grupo tratado con pIL8+ solo (Figura 6A). La expresión del TGF- β observada en estos puntos en el grupo tratado con pMCV1.4-G y pIL8+ era significativamente más alta que la observada en el grupo tratado con pMCV1.4-G y pIL8-. No se observó ningún efecto del pMCV1.4-G ni de la IL-8 en el riñón anterior en los tiempos estudiados (Figura 6B).

F.4. Resultados de la expresión de la IL-18

Solamente el grupo co-inyectado con pMCV1.4-G y pIL8+, y el grupo tratado con pIL8+ demostraron un incremento significativo de la expresión del mRNA de la IL-18 en el bazo comparado con los controles en los días 3 y 7 posteriores a la vacunación (Figura 7A). Por otra parte, se obtuvo una disminución significativa de los niveles de mRNA de la IL-18 con respecto a niveles del control en el riñón anterior de los peces co-inyectados con pMCV1.4-G conjuntamente con pIL8- o pIL8+, así como del grupo tratado con el plásmido de pIL8+ solamente (Figura 7B).

G. Efecto de la co-inyección de pIL8+ y pMCV1.4-G en la expresión de diversas quimioquinas en el bazo y el riñón

También se estudió por RT-PCR la expresión de otras quimioquinas de tipo CC en los grupos vacunados tanto en presencia como en ausencia de pIL8+ para determinar si la IL-8 induce la activación a su vez de otras quimioquinas que puedan atraer más células al sitio de inyección. Se estudió la expresión de CK5A, CK5B, CK6 y CK7A a los días 3 y 7 posteriores a la inyección, utilizando las condiciones de PCR previamente descritas [51: Laing KJ, Secombes CJ (2004) Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns. Molecular Immunology 41: 793-808.] y mostradas en la Tabla 1.

G.1. Resultados de la expresión de quimioquinas CK5B, CK6 y CK7

En el bazo, solamente el grupo tratado con la vacuna en presencia de la IL-8 mostró una expresión significativamente mas alta que los controles de CK5B (Fig. 8A) tanto en el día 3 como en el día 7 posterior a la inyección. En el riñón anterior, se indujo CKSB en todos los grupos vacunados, así como en el grupo tratado con el pIL8+ solo, aunque no se observaron diferencias significativas entre grupos.

En el bazo, en el día 3 posterior a la vacunación, sólo el grupo tratado con la vacuna y el pIL8+ mostró una expresión de CK6 significativamente mas alta que en los controles y mas alta que la observada en el Grupo 3 (Fig. 9A). No se observó ningún efecto en el riñón (Fig. 9B).

La expresión de la quimioquina CK7A aumentó significativamente en el bazo en el grupo vacunado en presencia de la IL-8 (Fig. 10A). Esta expresión fue significativamente mayor a la observada en el Grupo 3. También se observó un aumento significativo de la expresión en los peces inyectados con pIL8+ únicamente. En el riñón se observó una inducción de la expresión de CK7A a día 7 en todos los grupos vacunados (Fig. 10B), aunque no se observaron diferencias significativas entre grupos.

H. Activación de citoquinas en músculo tras la inyección de pIL8+

En el caso del músculo se estudió mas específicamente qué citoquinas se inducen en el sitio de inyección en respuesta al pIL8+. Para ello, se analizó por RT-PCR, la expresión de distintos genes en el músculo de los peces inoculados con pIL8+ a los 3 y 7 días posteriores a la vacunación. En estas muestras se estudió la inducción de quimioquinas como la CK5B, la CK6, y la CK7A, de la proteína inducida por IFN de tipo I Mx3, de genes pro-inflamatorios como IL-1 β y TNF- α , y de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). Las PCRs se efectuaron tal como se ha detallado anteriormente utilizando las condiciones descritas en la Tabla 1.

H.1. Resultados

Todos los genes estudiados aumentaron su expresión en respuesta al plásmido pIL8+ (Fig. 11), sin embargo debido a diferencias entre individuos, sólo algunos de ellos aumentaron de forma significativa. El plásmido pIL8+ inyectado en el músculo induce significativamente la expresión de TNF- α e iNOS 3 días posteriormente a la inyección. En el día 7 posterior a la inyección se observó que se inducen significativamente las quimioquinas de tipo CC tales como la CKSB, la CK6, la CK7A y se sigue manteniendo la inducción de TNF- α .

Exposición detallada de al menos un modo de realización (Ejemplos)

Ejemplo 1

5 Confirmación de la actividad biológica de la IL8 de trucha

Para confirmar el hecho de que la IL8 de trucha tiene una potente actividad quimioatrayente y que por lo tanto se puede considerar un buen candidato a adyuvante, realizamos ensayos *in vitro* para verificar esta actividad.

10 Materiales y métodos

Para ello, se transfectaron células EPC de carpa con 1 μ g de pIL8+ o con 1 μ g de pIL8- como control utilizando Eugene (Roche). A las 72 h se recogieron los sobrenadantes de estas células y se colocaron en la parte inferior de cámaras de quimiotaxis (Nunc) en las que un filtro de 3 μ m separa a los leucocitos totales de sangre que se introdujeron en la parte superior. Después de 90 min de incubación a 20°C, los filtros se fijaron con etanol, y se tiñeron con Giemsa para proceder a contar el número de células que había migrado a la parte inferior de la cámara. Se contabilizó el número de células en 10 campos por trucha.

20 Resultados

Los sobrenadantes de células EPC transfectadas con el plásmido pIL8+ que por lo tanto deben de contener IL-8 de trucha, mostraron una fuerte actividad quimiotáctica para los leucocitos totales de sangre (Figura 12), confirmando las observaciones que se realizaron por histología en el músculo de peces inyectados con pIL8+.

25 Ejemplo 2

Utilización del pIL8+ como adyuvante en una vacuna DNA

30 Con el fin de evaluar la posible eficacia del pIL8+ frente a rabdovirus se llevó a cabo un experimento con truchas arco iris utilizando el pIL8+ y la vacuna sola como control. Se seleccionó una vacuna DNA contra el IHNV y se eligió una dosis que se utilizó en todos los experimentos con la que se obtuviera un 50-60% de protección (10 ng) para poder observar mejor el efecto del pIL8+ y cuantificar su eficacia más detalladamente. Con la dosis de vacuna fijada se determinó si el pIL8+ era efectivo como adyuvante y en qué cantidad.

35 Materiales y métodos

Para determinar la eficacia del pIL8+ como adyuvante, se utilizaron grupos de 25 truchas arco iris de unos 3-5 cm, que se dividieron y cada grupo se hizo por duplicado. La vacuna utilizada fue del tipo ADN frente a IHNV. Las truchas de todos los grupos se mantuvieron aproximadamente a 14°C y se alimentaron con la misma dieta durante 2 semanas antes de empezar los experimentos. Dependiendo del grupo a que pertenecía se inyectó cada una de las truchas intramuscularmente con cada uno de los tratamientos siguientes:

45 Grupo 1: 100 μ l de PBS

Grupo 2: 100 μ l de PBS con 0.5 μ g de pIL8+

Grupo 3: 100 μ l de PBS con 10 ng de vacuna DNA

50 Grupo 4: 100 μ l de PBS con 10 ng de vacuna más 0.5 μ g de pIL8+

Grupo 5: 100 μ l de PBS con 10 ng de vacuna más 0.1 μ g de pIL8+

55 Grupo 6: 100 μ l de PBS con 10 ng de vacuna más 0.05 μ g de pIL8+.

A los 30 días después del tratamiento correspondiente a cada grupo, los tanques de todos los grupos se infectaron con una dosis letal de IHNV por tanque y se registraron las muertes de los peces en cada tanque durante los 30 días siguientes.

60 Los resultados de supervivencia tras el desafío con IHNV virulento, expresados en porcentaje de truchas supervivientes pueden observarse en la Tabla 2.

65

TABLA 2

Grupo/Tratamiento	Tanque 1	Tanque 2	Media
1: PBS	28%	8%	18%
2: pIL8+ (0.5 µg)	4%	8,3%	6,1%
3: Vacuna	68%	52%	60%
4: Vacuna + 0.05 µg de pIL8+	75%	60%	67,4%
5: Vacuna + 0.1 µg de pIL8+	60%	56%	58%
6: Vacuna + 0.5 µg de pIL8+	44%	44%	44%

Resultados

Según se observa en la Tabla 2 se obtuvieron los resultados siguientes:

- tanto en los peces no vacunados como en los inyectados con pIL8+ se observó un muy bajo porcentaje de supervivencia a IHNV (ver Grupos 1 y 2),
- se confirma que el pIL8+ no protege por sí solo (ver Grupo 2 de control negativo),
- se confirma que la vacuna, por sí sola a la dosis elegida, no confiere una protección del 100% sino de aproximadamente un 60%, tal y como se había determinado (ver Grupo 3 como control sin coadyuvante),
- de las tres dosis de pIL8+ (0.11 µg, 0.5 µg y 0.05 µg) utilizados conjuntamente con la vacuna los resultados obtenidos con las dos dosis más altas (ver Grupos 4 y 5) fueron aproximadamente iguales o peores que con la vacuna sola, y
- el pIL8+ funciona como adyuvante de la vacuna, ya que el número de supervivientes fue mayor en los tanques vacunados conteniendo 0.05 µg de pIL8+ que en los vacunados únicamente (ver Grupo 6), siendo sorprendente que el mayor efecto del pIL8+ como adyuvante se obtenga con la dosis menor.

Ejemplo 3

Determinación de la dosis óptima de pIL8+ como adyuvante de vacunas ADN

A la vista de los resultados del ejemplo anterior, se repitió el experimento utilizando los mismos controles, y una dosis más baja de pIL8+ (0.01 µg). En el Grupo 2 de control negativo, la dosis del pIL8+ utilizada fue la de 0.05 µg, ya que esa cantidad dio los mejores resultados como adyuvante de la vacuna.

Materiales y métodos

Al igual que en el ejemplo 2, se utilizaron grupos de 25 truchas arco iris cada uno y cada grupo se hizo por duplicado. La vacuna utilizada fue del tipo ADN frente a IHNV. Dependiendo del grupo a que pertenecía se inyectó cada una de las truchas intramuscularmente con cada uno de los tratamientos siguientes:

Grupo 1: 100 µl de PBS

Grupo 2: 100 µl de PBS con 0.05 µg de pIL8+

Grupo 3: 100 µl de PBS con 10 ng de vacuna DNA

ES 2 321 789 B1

Grupo 4: 100 μ l de PBS con 10 ng de vacuna más 0.05 μ g de pIL8+

Grupo 5: 100 μ l de PBS con 10 ng de vacuna más 0.01 μ g de pIL8+

5 El Grupo 4 se ha incorporado para poder comparar los resultados con 0.05 μ g y 0.01 μ g de pIL8+ obtenidos en las exactas condiciones experimentales.

Los resultados de supervivencia tras el desafío con IHNV virulento, expresados en porcentaje de truchas supervi-

TABLA 3

Grupo/Tratamiento	Tanque 1	Tanque 2	Media
1: PBS	10,5%	61,1%	35,1%
2: pIL8+ (0.05 μ g)	47,4%	55,6%	51,4%
3: Vacuna	68,2%	50%	58,7%
4: Vacuna + 0.05 μ g pIL8+	60%	60%	60%
5: Vacuna + 0.01 μ g pIL8+	82,6%	79,2%	80,9%

Resultados

Según se observa en la Tabla 3 se obtuvieron los resultados siguientes:

- sorprendentemente cuando el pIL8+ se utiliza en la menor cantidad (Grupo 5) de 0.01 μ g es cuando ejerce el mayor efecto coadyuvante de la vacuna ADN, aumentando su efecto aproximadamente entre un 25% y un 35%.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos, tamaños de los fragmentos amplificados y condiciones de PCR para los distintos genes estudiados.

Gen	Oligonucleótidos	SEQ ID No	Tamaño del producto (pb)	Nº de ciclos	Condiciones PCR	Referencia
GAPDH	F: 5' ATGTCAGACCTCTGTGTTGG 3'	4	514 pb	25	94°C 30s 58°C 30 s 72°C 1 min	[52]
	R: 5' TCCTCGATGCCGAAGTTGTCG 3'	5				
IL-1β	F: 5' AGGGAGGCAGCAGCTACACAA 3'	6	353 pb	28	94°C 30s 60°C 30 s 72°C 30 s	[53]
	R: 5' GGGGGCTGCCCTTCTGACACAT 3'	7				
TNF-α1	F: 5' TTCGGGCAAAATATTCAGTCG 3'	8	433 pb	10	94°C 1 min 60°C 1 min 72°C 20 s	[54]
	R: 5' GCCGTCATCCTTCTCCACT 3'	9				
				25	94°C 1 min 60°C 1 min 72°C 20s + 1 s per cycle	

IL-11	F: 5' TCAACTCCCTTGAGATGAGACC 3' R: 5' TCCTGGGAAGACTGTAAACACATC 3'	10 11	271 pb	33	94°C 30 s 52°C 30 s 72°C 30 s	[55]
TGF-β	F: 5' AGACTCTGAATGAGTGGCTGCAAG 3' R: 5' CTCCAAGACCTGTGGAAACACAGCA 3'	12 13	482 pb	29	94°C 30s 60°C 30s 72°C 1 min	[54]
IL-18	F: 5' AGCAGCTCCGAAATGTAAAGGTG 3' R: 5' AGGCAAAGGTTGCTCCAGTG 3'	14 15	384 pb	35	94°C 20s 60°C 20 s 72°C 20 s	[42]
CK5B	F: 5' TTTGCTGATCGTCAGATACCC 3' R: 5' GGACCATGACTGCTCTCTCTG 3'	16 17	315 pb	35	94°C 20s 60°C 20s 72°C 20s	[51]
CK6	F: 5' CGAATCTGCTCTGACACTTCC 3' R: 5' TGGTGAGTTGTTGACCATTGA 3'	18 19	219 pb	35	94°C 20s 60°C 20s 72°C 20s	[51]

Strain	Genotype	Genomic location	Primer	Sequence	Length (bp)	Temperature (°C)	Time (min)	Reference
CK7A	F: 5' TCTGCAGGTGTCATTAAAGTTGG 3' R: 5' TCTTTGTGGTGAAAAATCAGTGC 3'	20 21	139 pb		35	94°C 20s 60°C 20s 72°C 20s		[51]
iNOS	F: 5' CATACGCCCCCAACAAACCAGTGC 3' R: 5' CCTCGCCTTCTCATCTCCAGTGTC 3'	22 23	746 bp		35	94°C 1 min 62°C 1 min 72°C 2 min		[54]
Mx3	F: 5' ATGCCACCCTACAGGAGATGAT 3' R: 5' CCACAGTGACATTAGTTG 3'	24 25	384 bp		35	94°C 20s 60°C 20 s 72°C 20 s		[5]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, **caracterizado** porque comprende la administración de:
 - a) una vacuna ADN que induce una respuesta inmune en los peces contra la infección de rabdovirus, en una cantidad inferior a la que produciría un 100% de protección inmunogénica; y
 - b) un coadyuvante obtenido por clonación de la interleuquina-8 (IL-8) de trucha en una cantidad suficiente para aumentar el efecto de la vacuna (a) entre un 10% y un 60%.
2. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque los peces son truchas.
3. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, **caracterizado** porque los peces son Truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*).
4. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque el rabdovirus es el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV).
5. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque el rabdovirus es el virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV).
6. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque el coadyuvante (b) es un plásmido denominado pIL8+ obtenido por clonación de la región codificante del gen de la IL-8 de Trucha Arco Iris en un vector de expresión eucariota cuya secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ. ID. No. 1.
7. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque la vacuna (a) se administra en una cantidad tal que está comprendida entre el 40% y el 90% de la cantidad que produciría una protección inmunogénica del 100%.
8. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque la vacuna (a) se administra en una cantidad tal que está comprendida entre el 45% y el 80% de la cantidad que produciría una protección inmunogénica del 100%.
9. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque la vacuna (a) se administra en una cantidad tal que está comprendida entre el 50% y el 70% de la cantidad que produciría una protección inmunogénica del 100%.
10. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** porque el plásmido (b) se administra en una cantidad suficiente para incrementar el efecto inmunológico de la vacuna (a) entre un 15% y un 50%.
11. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** porque el plásmido (b) se administra en una cantidad suficiente para incrementar el efecto inmunológico de la vacuna (a) entre un 20% y un 40%.
12. Procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** porque el plásmido (b) se administra en una cantidad suficiente para incrementar el efecto inmunológico de la vacuna (a) entre un 25% y un 35%.
13. Utilización de un plásmido obtenido por donación de la interleuquina-8 (IL-8) de Trucha Arco Iris, en el procedimiento para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus de acuerdo con las reivindicaciones 1-12.
14. Utilización de un plásmido de acuerdo con la reivindicación 13, denominado pIL8+ obtenido por donación de la región codificante del gen de la IL-8 de Trucha Arco Iris en un vector de expresión eucariota cuya secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ. ID. No. 1.
15. Utilización del plásmido pIL8+, de acuerdo con las reivindicaciones 13-14, **caracterizado** porque cuando se utiliza con una vacuna ADN contra rabdovirus incrementa del 10% al 60% el efecto de dicha vacuna.
16. Composición farmacéutica para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, **caracterizada** porque comprende:
 - a) una vacuna ADN que induce una respuesta inmune en los peces contra la infección de rabdovirus de peces, en una cantidad inferior a la que produciría un 100% de protección inmunogénica; y

b) un coadyuvante obtenido por donación de la interleuquina-8 (IL-8) de trucha en una cantidad suficiente para aumentar el efecto de la vacuna (a) en al menos un 10%.

5 17. Composición farmacéutica para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizada** porque el coadyuvante (b) es el plásmido pIL8+ cuya secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ. ID. No. 1..

10 18. Composición farmacéutica para inmunizar peces contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-17, **caracterizada** porque los peces son Truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*).

19. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-18, **caracterizada** porque el rabdovirus es el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV).

15 20. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-18, **caracterizada** porque el rabdovirus es el virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV).

20 21. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-20, **caracterizada** porque la vacuna (a) está presente en una cantidad tal que está comprendida entre el 40% y el 90% de la cantidad que produciría una protección inmunogénica del 100%.

25 22. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-21, **caracterizada** porque la vacuna (a) está presente en una cantidad tal que está comprendida entre el 45% y el 80% de la cantidad que produciría una protección inmunogénica del 100%.

23. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-22, **caracterizada** porque la vacuna (a) está presente en una cantidad tal que está comprendida entre el 50% y el 70% de la cantidad que produciría una protección inmunogénica del 100%.

30 24. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-23, **caracterizada** porque el plásmido (b) está presente en una cantidad suficiente para incrementar el efecto inmunológico de la vacuna (a) entre un 15% y un 50%.

35 25. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-24, **caracterizada** porque el plásmido (b) está presente en una cantidad suficiente para incrementar el efecto inmunológico de la vacuna (a) entre un 20% y un 40%.

40 26. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-25, **caracterizada** porque el plásmido (b) está presente en una cantidad suficiente para incrementar el efecto inmunológico de la vacuna (a) entre un 25% y un 35%.

45 27. Composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con las reivindicaciones 16-26, **caracterizada** porque además comprende los vehículos o excipientes necesarios para contener los ingredientes (a) y (b) en una forma farmacéuticamente adecuada para su administración.

28. Una composición farmacéutica para inmunizar Truchas Arco Iris contra la infección de rabdovirus, de acuerdo con la reivindicación 27, **caracterizada** porque dicha composición está preparada para ser administrada por inyección intramuscular.

50

55

60

65

FIGURA 1

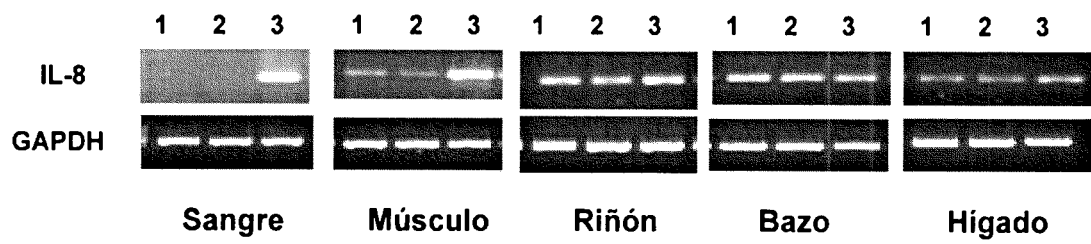


FIGURA 2A

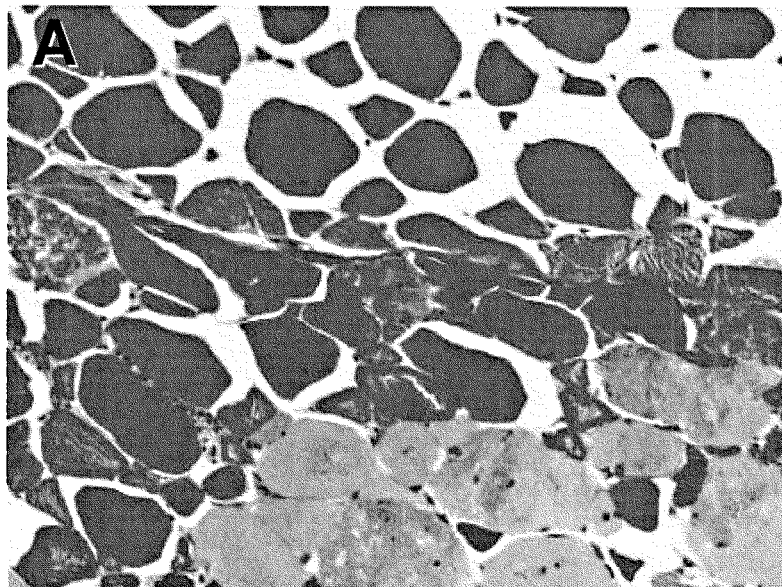


FIGURA 2B

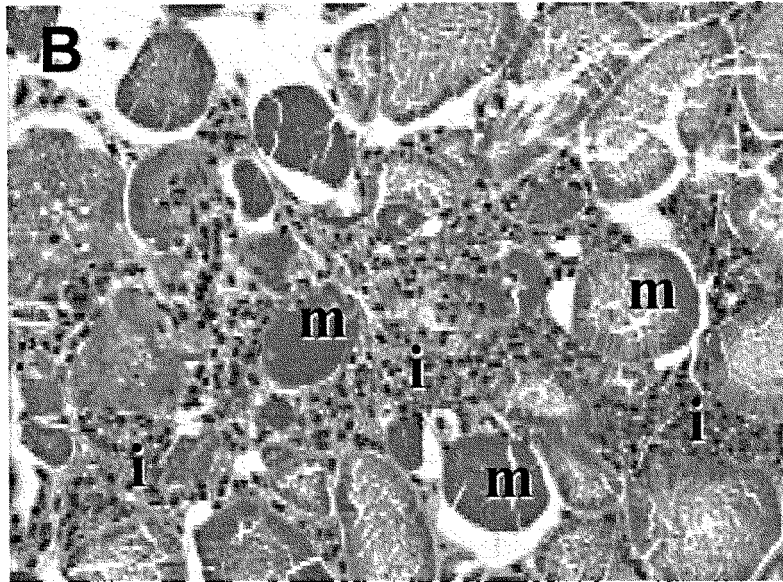


FIGURA 2C

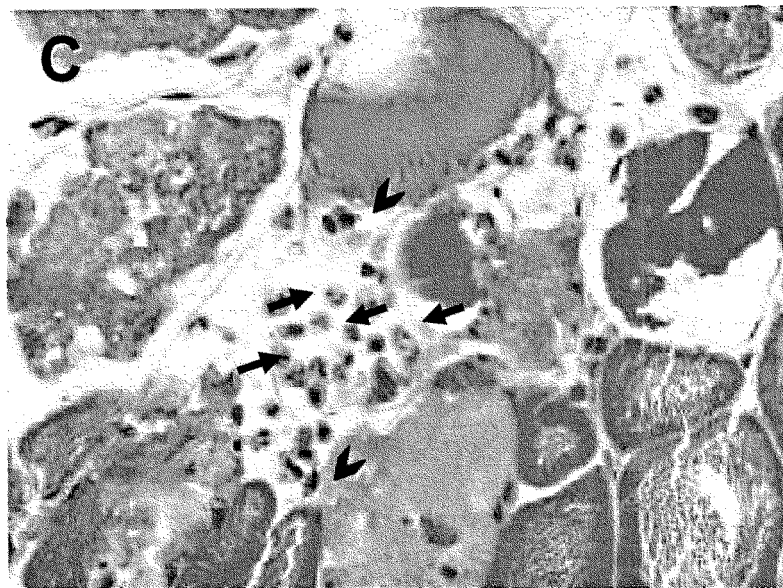


FIGURA 3

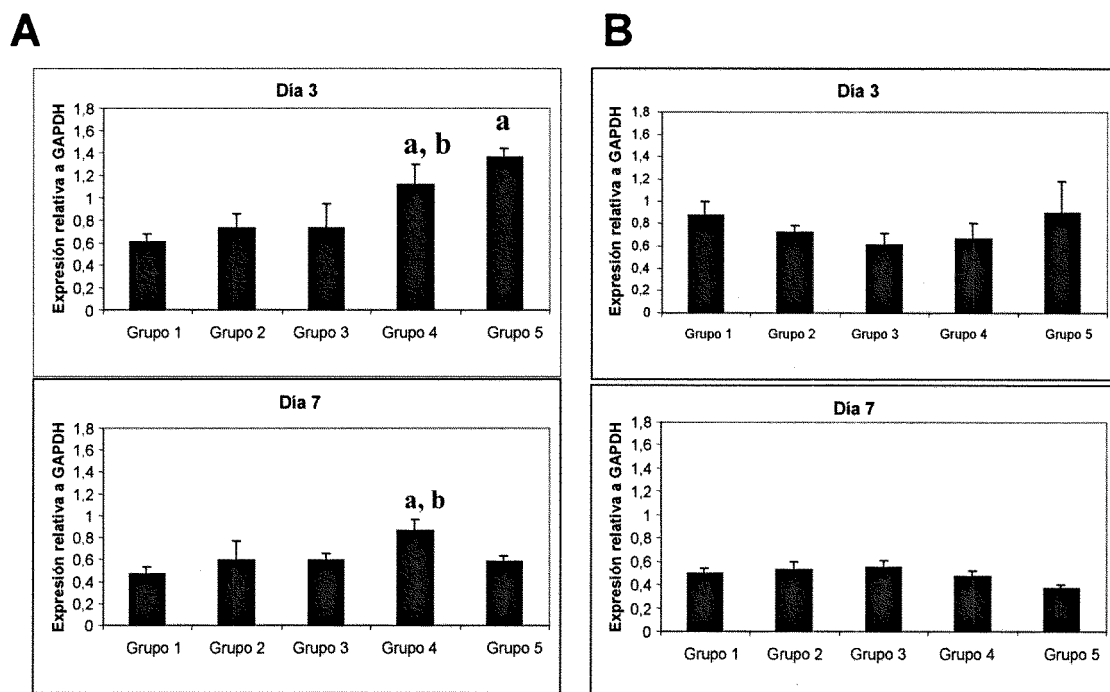


FIGURA 4

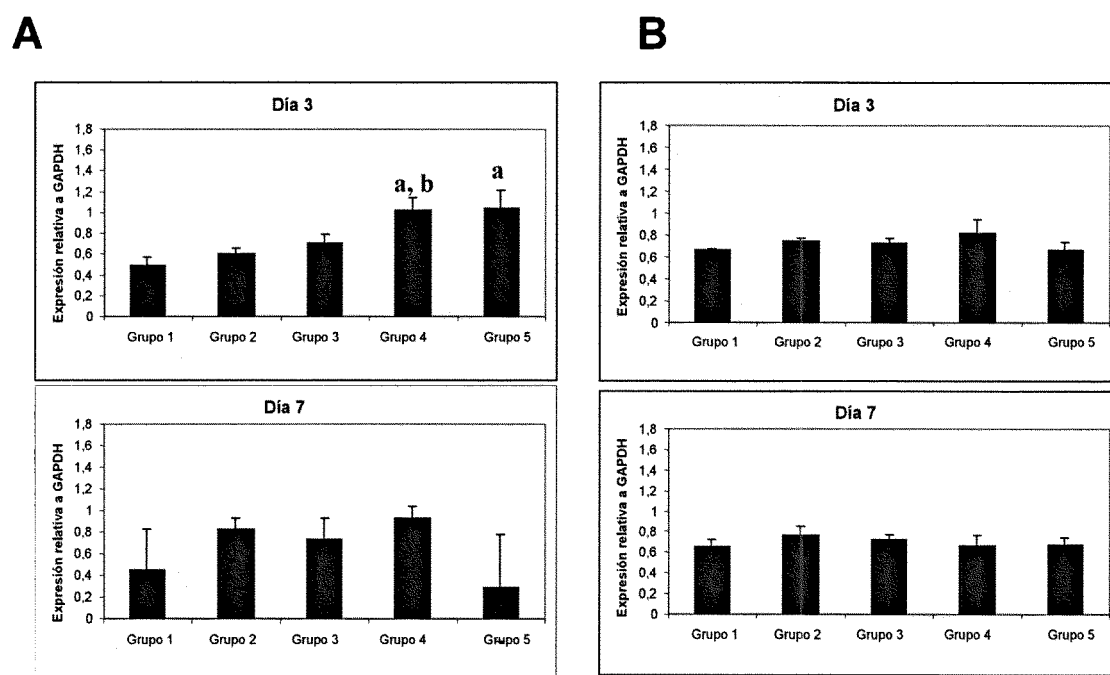
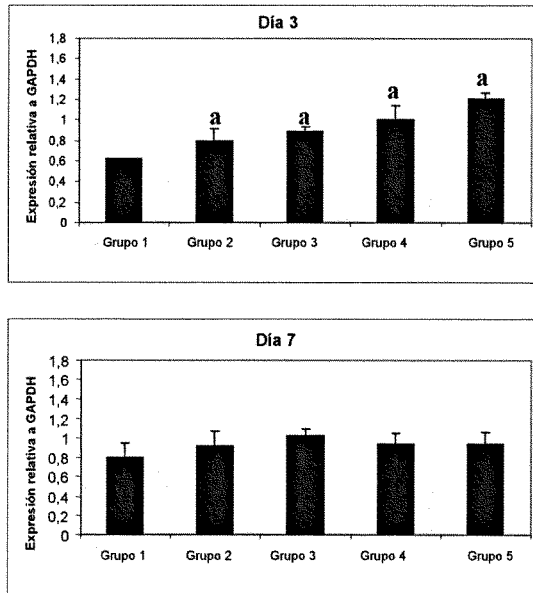


FIGURA 5

A



B

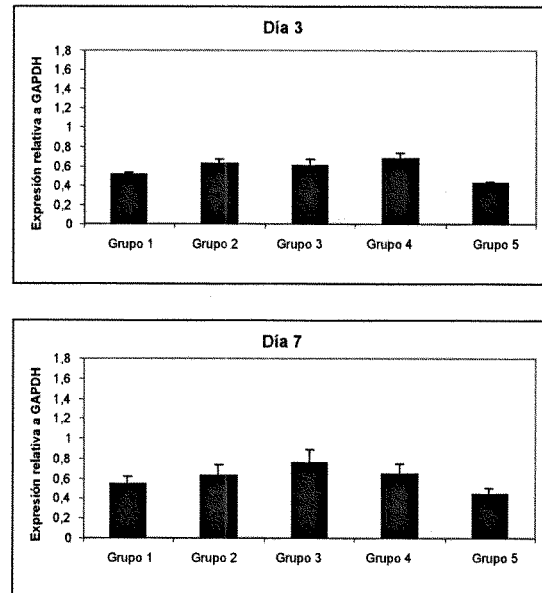
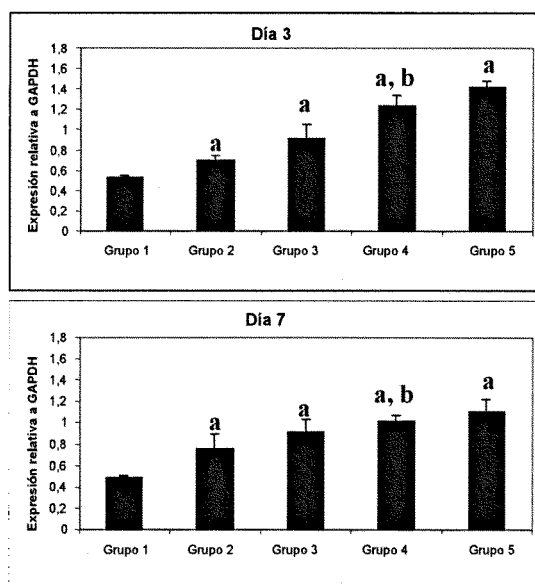


FIGURA 6

A



B

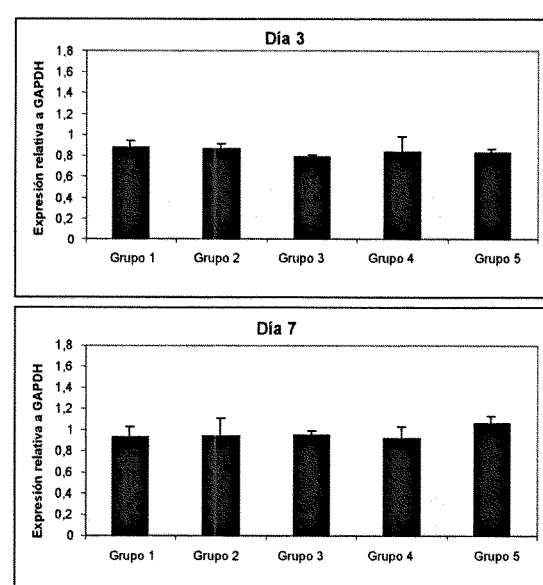


FIGURA 7

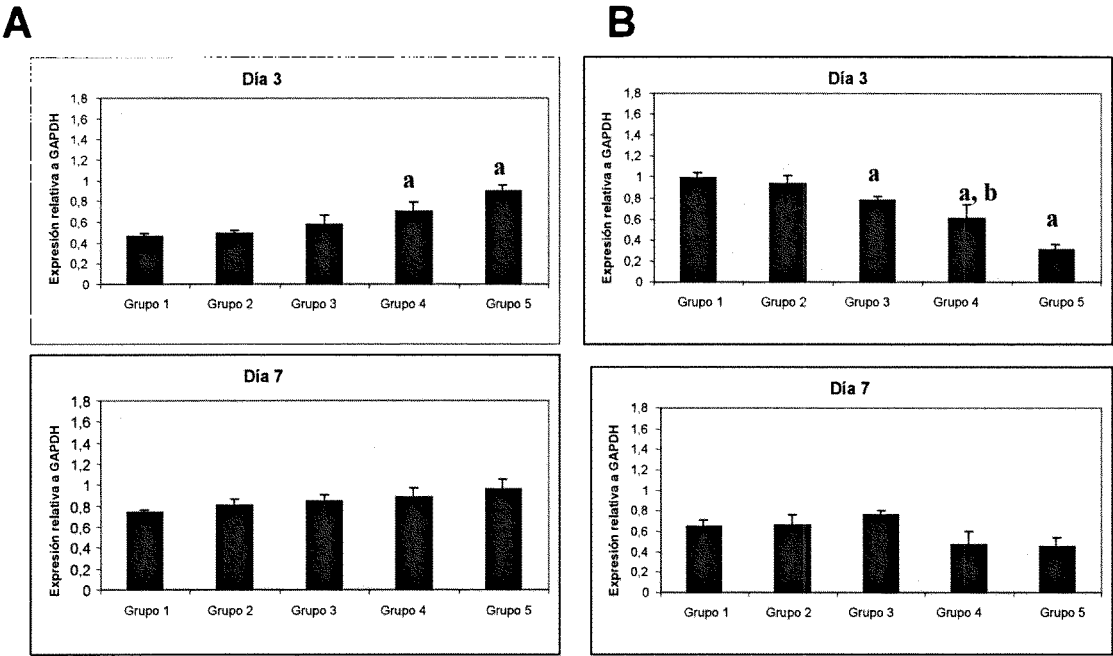


FIGURA 8

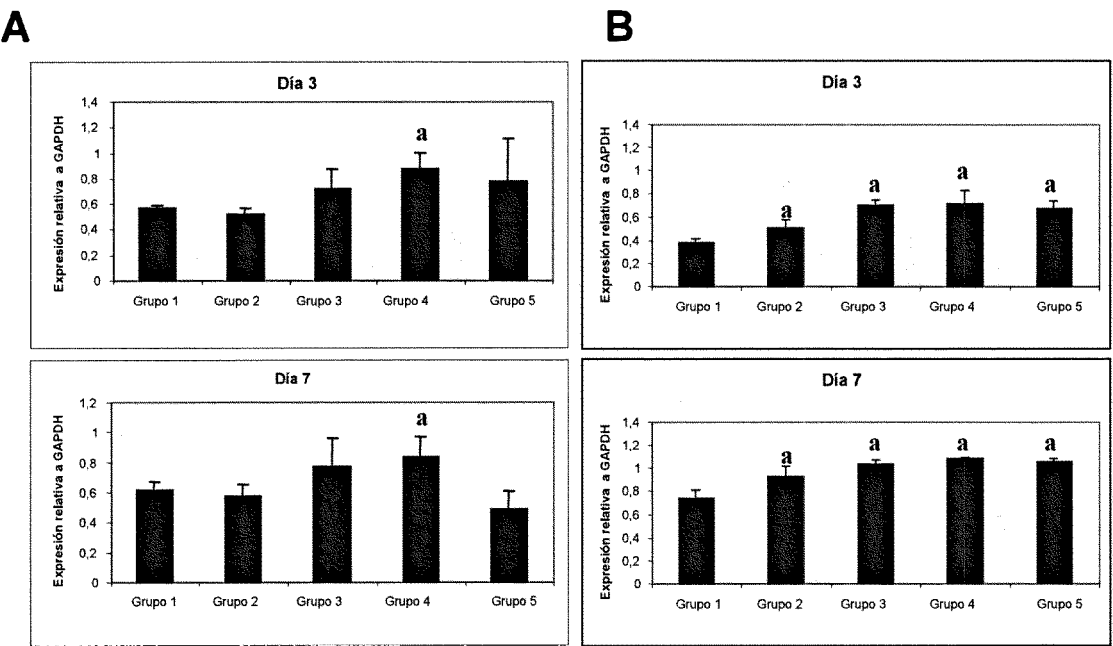
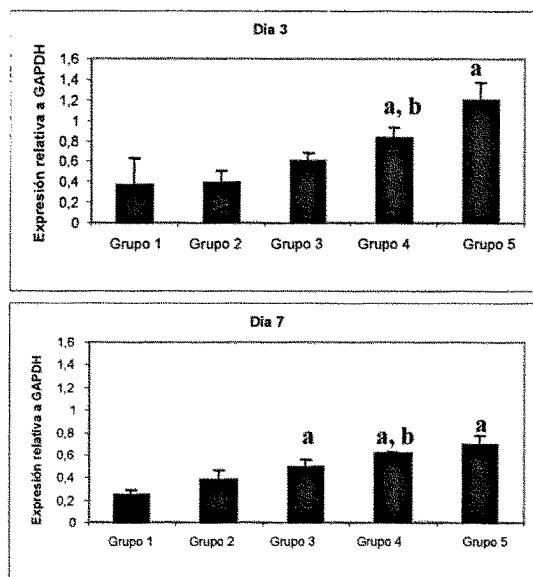


FIGURA 9

A



B

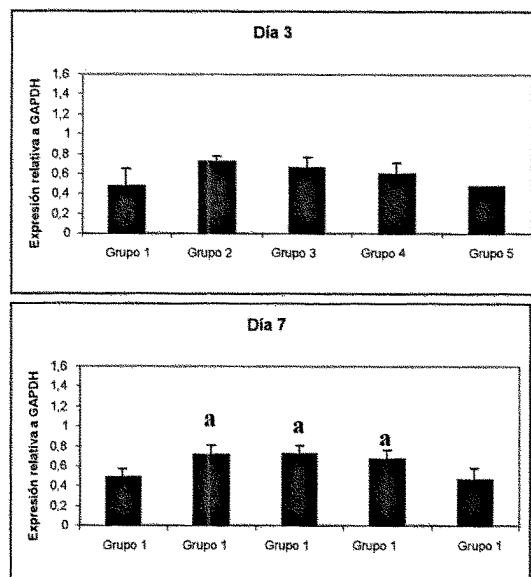
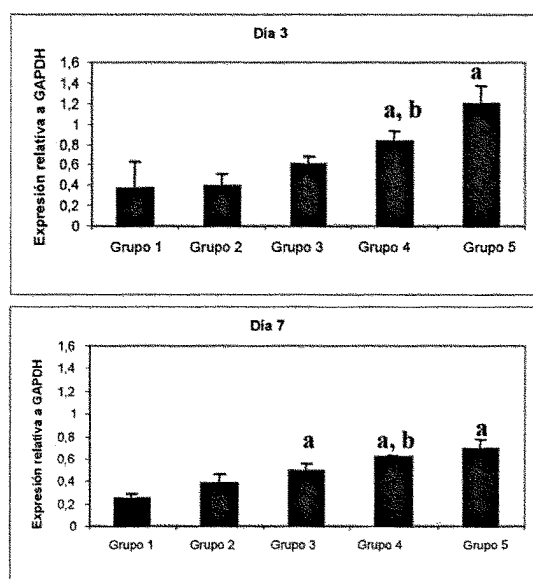


FIGURA 10

A



B

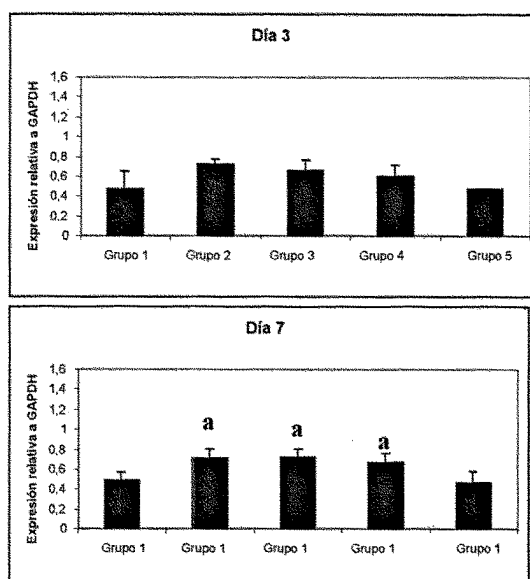


FIGURA 11

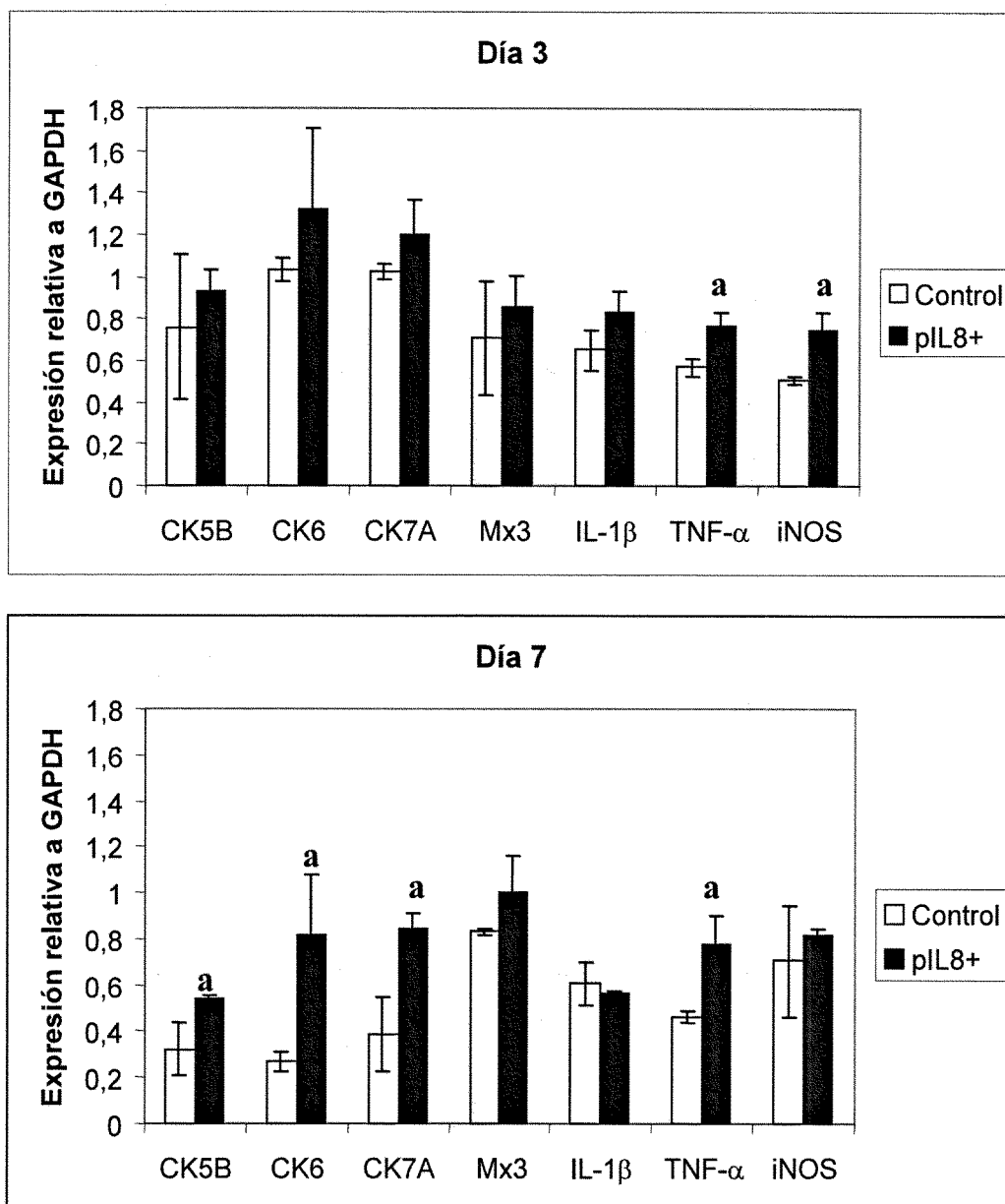
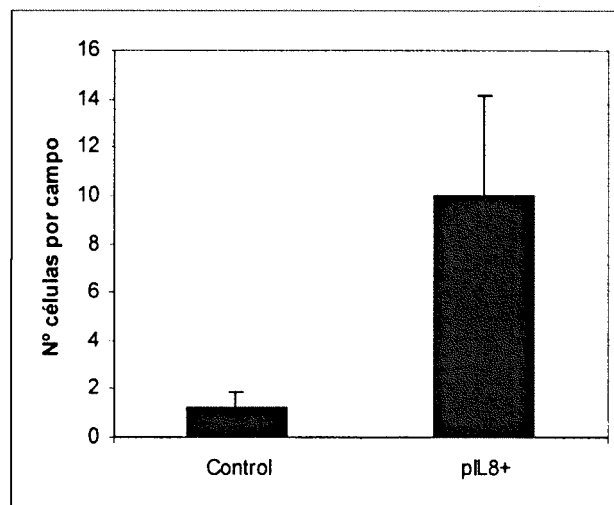


FIGURA 12



ES 2 321 789 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)	
5	<120> UTILIZACIÓN DEL VECTOR pIL8+ DE TRUCHA COMO INMUNOESTIMULANTE O ADYUVANTE PARA VACUNAS ADN EN PECES	
	<130> P200700563	
	<140> P200700563	
10	<141> 2007-03-02	
	<160> 25	
	<170> PatentIn version 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 5814	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del plásmido pIL8+	
25	<400> 1	
	gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60	
	ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120	
30	cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180	
	ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240	
	gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacggggtc attagtccat agcccatata 300	
35	tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc 360	
	cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420	
	attgacgtca atgggtggac tattttacgg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480	
40	atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540	
	atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600	
	tcgctattac catgggtgat cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660	
	actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720	
45	aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccctattgacg caaatgggcg 780	
	gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840	
	ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagt 900	
50	taagcttggt accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaattgcc cttaagatga 960	
	gcatcagaat gtcagccagc cttgtcggtg tgctcctggc cctcctgacc attactgagg 1020	
	ggatgagtct gagaggcatg ggggctgacc tgcgatgtcg ctgcattgag acggaagca 1080	
55	gacgaattgg taaactcatt aagaagggtg agatgttccc tcccagctcg cactgcagag 1140	
	acactgagat cattgccact ctgagcaaga gcggtcagga gatttgtctg gatgtcagcg 1200	
	ctccgtgggt caagagggtc attgagaaga tgctggccaa caacaagggc aattctgcag 1260	
60	atatccagca cagtggcggc cgctcgagtc tagagggccc gcggttcgaa ggtaagccta 1320	
	tccctaacc tctcctcggt ctcgattcta cgcgtaccgg tcatcatcac catcaccatt 1380	
65		

ES 2 321 789 B1

	gagttttaa	ccgctgatca	gcctcgactg	tgccttctag	ttgccagcca	tctgttgttt	1440
	gcccctcccc	cgtgccttcc	ttgaccctgg	aaggtgccac	tcccactgtc	ctttccta	1500
5	aaaatgagga	aattgcatcg	cattgtctga	gtaggtgtca	ttctattctg	gggggtggg	1560
	tggggcagga	cagcaagggg	gaggattggg	aagacaatag	caggcatgct	ggggatgcg	1620
	tgggctctat	ggcttctgag	gcggaagaa	ccagctgggg	ctctagggg	tatccccac	1680
	cgcctgtag	cggcgcatta	agcgcggcgg	gtgtggtggt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	1740
10	cacttgccag	cgcctagcg	cccgtcctt	tcgctttctt	cccttccttt	ctcgccacgt	1800
	tcgcggcctt	tccccgtcaa	gctctaaatc	ggggcatccc	tttagggttc	cgatttagtg	1860
	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	attaggggtga	tggttcacgt	agtgggccat	1920
15	cgcctgata	gacggttttt	cgccttttga	cgttggagtc	cacgttcttt	aatagtggac	1980
	tcttgttcca	aactggaaca	acactcaacc	ctatctcggt	ctattctttt	gatttataag	2040
	ggattttggg	gatttcggcc	tattggttaa	aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	2100
20	cgaattaatt	ctgtggaatg	tgtgtcagtt	aggggtgtga	aagtccccag	gctccccagg	2160
	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccagggtg	ggaaagtccc	2220
	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	2280
25	tcccgccct	aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	2340
	cccatggctg	actaattttt	tttatttatg	cagaggccga	ggccgcctct	gcctctgagc	2400
	tattccagaa	gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctcccg	2460
	gagcttgtat	atccattttc	ggatctgata	aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	2520
30	ttgaacaaga	tggattgcac	gcaggttctc	cgcccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	2580
	atgactgggc	acaacagaca	atcggtgct	ctgatgccgc	cgtgttcgg	ctgtcagcgc	2640
	aggggcgccc	ggttcttttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgcctgaat	gaactgcagg	2700
35	acgaggcagc	gcggctatcg	tggctggcca	cgacggcggt	tccttgcgca	gctgtgctcg	2760
	acgttgtcac	tgaagcggga	agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	2820
	tcctgtcatc	tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	2880
40	ggctgcatac	gcttgatccg	gtacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaaa	catcgcatcg	2940
	agcgagcacg	tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	3000
	atcaggggct	cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggtcaa	ggcgcgcatg	cccgaaggcg	3060
45	aggatctcgt	cgtgacccat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatggtg	gaaaatggcc	3120
	gcttttcttg	attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	3180
	cgttggttac	ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgttctctcg	3240
	tgctttacgg	tatcgccgct	ccgattcgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	3300
50	agttcttctg	agcgggactc	tggggttcgc	gaaatgaccg	accaagcgac	gccccacctg	3360
	ccatcacgag	atttcgattc	caccgcggcc	ttctatgaaa	ggttgggctt	cggaatcggt	3420
	ttccgggacg	ccggtgggat	gatactccag	cgcggggatc	tcatgctgga	gttcttcgcc	3480
55	caccccaact	tgtttattgc	agcttataat	ggttaciaaat	aaagcaatag	catcaciaaat	3540
	ttcaciaaata	aagcattttt	ttcactgcat	tctagttgtg	gtttgtccaa	actcatcaat	3600
	gtatcttatc	atgtctgtat	accgtcgacc	tctagctaga	gcttggcgta	atcatgggtca	3660
60	tagctgtttc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	ctcacaattc	cacacaacat	acgagccgga	3720
	agcataaagt	gtaaagcctg	gggtgcctaa	tgagtgagct	aactcacatt	aattgcgttg	3780
	cgtcactgc	ccgttttcca	gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agctgcatta	atgaatcggc	3840

65

ES 2 321 789 B1

	caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac	3900
	tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata	3960
5	cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa	4020
	aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct	4080
	gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa	4140
	agataaccagg cgtttccccc tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc gacctgccc	4200
10	cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcaatgctca	4260
	cgtgttaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtccca agctgggctg tgtgcacgaa	4320
	cccccgctt agcccgaccg ctgcgcctta tccggtact atcgtcttga gtccaacccg	4380
15	gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg	4440
	tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg	4500
	acagtatttg gtatctgctc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc	4560
20	tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggt tttttgttg caagcagcag	4620
	attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac	4680
	gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc	4740
25	ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag	4800
	taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtggg cacctatctc agcgatctgt	4860
	ctatttcgtt catccatagt tgccctgact cccgtcgtgt agataactac gatacgggag	4920
	ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggctcca	4980
30	gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact	5040
	ttatccgcct ccattccagtc tattaattgt tgccgggaag cttagagtaag tagttcgcca	5100
	gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg	5160
35	tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc	5220
	atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg	5280
	gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gactgcata attctcttac tgtcatgcca	5340
40	tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt	5400
	atgcccgcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc	5460
	agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc	5520
45	ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca	5580
	tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa	5640
	aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatc tcttccttt tcaatattat	5700
	tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa	5760
50	aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc	5814

<210> 2
 55 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido full-IL-8F
 <400> 2

65 aagatgagca tcagaatgtc agccag

26

ES 2 321 789 B1

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido full-IL-8R
 10 <400> 3

 tttgttggtg gccagcatct tctcaa 26
 15
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido F del gen GAPDH
 25 <400> 4

 atgtcagacc tctgtgttgg 20
 30
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido R del gen GADPH
 40 <400> 5

 tcctcgatgc cgaagttgtc g 21
 45
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido F del gen IL-1beta
 55 <400> 6

 agggaggcag cagctaccac aa 22
 60
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 65 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido R IL-1beta

ES 2 321 789 B1

	<400> 7	
	gggggctgcc ttctgacaca t	21
5		
	<210> 8	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido F del gen TNF-alpha1	
15		
	<400> 8	
	ttcgggcaaa tattcagtcg	20
20		
	<210> 9	
	<211> 20	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido R del gen TNF-alpha1	
30		
	<400> 9	
	gccgtcatcc tttctccact	20
35		
	<210> 10	
	<211> 22	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido F del gen IL-11	
45		
	<400> 10	
	tcaactccct tgagatgaga cc	22
50		
	<210> 11	
	<211> 23	
55	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido R del gen IL-11	
60		
	<400> 11	
	tcctgggaag actgtaacac atc	23
65		
	<210> 12	

ES 2 321 789 B1

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido F del gen TGF-beta

 <400> 12
 10 agactctgaa tgagtggctg caag 24

 <210> 13
 15 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido R del gen TGF-beta

 <400> 13
 25 ctccaagacc tgtggaacac agca 24

 <210> 14
 30 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido F del gen IL-18

 <400> 14
 40 agcagctccg aatgtaaggt g 21

 <210> 15
 45 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido R del gen IL-18

 <400> 15
 55 aggcaaaggt tgctccagtg 20

 <210> 16
 60 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Oligonucleótido F del gen CK5B

ES 2 321 789 B1

	<400> 16	
	tttgctgatac gtcagataacc c	21
5		
	<210> 17	
	<211> 21	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido R del gen CK5B	
15		
	<400> 17	
	ggaccatgac tgctctctct g	21
20		
	<210> 18	
	<211> 21	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido F del gen CK6	
30		
	<400> 18	
	cgaatctgct ctgacacttc c	21
35		
	<210> 19	
	<211> 21	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido R del gen CK6	
45		
	<400> 19	
	tggtgagttg ttgaccattg a	21
50		
	<210> 20	
	<211> 22	
55	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido F del gen CK7A	
60		
	<400> 20	
	tctgcaggtg tcattaagtt gg	22
65		
	<210> 21	

ES 2 321 789 B1

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido R del gen CK7A

 <400> 21
 10 tctttgtggt gaaaatcagt gc 22

 <210> 22
 15 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido F del gen iNOS

 <400> 22
 25 catacgcccc caacaaacca gtgc 24

 <210> 23
 30 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido R del gen iNOS

 <400> 23
 40 cctcgcttc tcattctccag tgtc 24

 <210> 24
 45 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido F del gen Mx3

 <400> 24
 55 atgccaccct acaggagatg at 22

 <210> 25
 60 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Oligonucleótido R del gen Mx3

ES 2 321 789 B1

<400> 25

ccacagtgtgta catttagttg

20

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 321 789

⑫ Nº de solicitud: 200700563

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **02.03.2007**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **C12N 7/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JIMENEZ N, et al. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). 2006. Vaccine. Vol. 24, páginas 5615-5626.	1-28
A	WO 03101482 A2 (GENESIS GROUP INC) 11.12.2003, reivindicaciones.	1-28

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

22.05.2009

Examinador

I.Rueda Molins

Página

1/4

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.05.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5, 16-28	SÍ
	Reivindicaciones	1-4, 6-15	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-28	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JIMENEZ N, et al. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>). Vaccine. Vol. 24, páginas 5615-5626.	2006
D02	WO 03/101482 A2 (GENESIS GROUP INC).	11.12.2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente divulga tanto un procedimiento (reivindicaciones 1-12), como una composición farmacéutica (reivindicaciones 16 - 28) para inmunizar peces contra la infección de rhabdovirus, así como, la utilización de un plásmido obtenido por clonación de la IL-8, para la realización de dicho procedimiento (reivindicaciones 13-14).

El documento D01, que refleja el estado de la técnica más cercano, divulga como la inyección de la interleuquina 8 (IL-8) junto con una vacuna de ADN frente al virus VHSV sirve para modular la respuesta en Trucha Arco Iris. Indicando como la IL-8, puede ser empleada para potenciar la respuesta inmune frente a dicha infección viral.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

Parte de la descripción detallada de la invención de la solicitud de patente (páginas 17-20) coincide con la información divulgada en el documento D01. Por tanto, las reivindicaciones: 1-4, 6-15 que se fundamentan en dicha parte de la solicitud de patente carecen de novedad. El resto de reivindicaciones: 5, 16-28, resultarían evidentes para el experto en la materia y por tanto no presentarían actividad inventiva, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01.

Por tanto, las reivindicaciones 1-4, 6-15, no presentan novedad y las reivindicaciones 5, 16-28 no presentan actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.