

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 702**

21 Número de solicitud: 201531020

51 Int. Cl.:

C07K 14/285 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

13.07.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.10.2015

Fecha de la concesión:

30.08.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.09.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
Edificio Emprendia - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
UNIVERSIDADE DA CORUÑA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEMON RAMOS, Manuel Luis;
BALADO DACOSTA, Miguel;
JIMÉNEZ GONZÁLEZ, Carlos;
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Jaime;
VILA SANJURJO, Antón y
VALDERRAMA PEREIRA, Andrea Katherine**

74 Agente/Representante:

PARDO SECO, Fernando Rafael

54 Título: **PROTEÍNA RECOMBINANTE DEL RECEPTOR DE LA FERRI-PISCIBACTINA Y SU APLICACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA FRENTE A LA PASTEURELOSIS**

57 Resumen:

Proteína recombinante del receptor de la ferri-piscibactina y su aplicación para la producción de una composición inmunogénica frente a la pasteurelosis. La invención describe el uso de la proteína recombinante rFrpA como antígeno capaz de servir como vacuna eficaz frente a *Pseudomonas damsela* subespecie piscicida, agente causal de la pasteurelosis en peces. La vacuna es capaz de inducir una potente respuesta inmunitaria y confiere una elevada protección frente a la patología, cuando es suministrada vía parenteral.

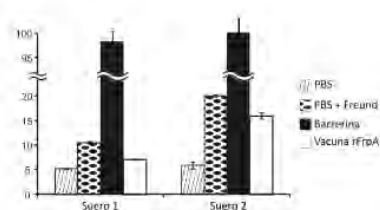


FIG. 6

ES 2 549 702 B1

DESCRIPCIÓN

Proteína recombinante del receptor de la ferri-piscibactina y su aplicación para la producción de una composición inmunogénica frente a la pasteurelosis

5

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dentro de la biología y de la biología molecular, y se refiere a la elaboración de composiciones inmunogénicas que comprenden la proteína del receptor de la ferri-piscibactina (FrpA) de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* para el desarrollo de una vacuna frente a la pasteurelosis que afecta a especies de peces de interés comercial de la industria acuícola.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*PhDP*) es una bacteria gram-negativa conocida previamente como *Pasteurella piscicida*. *PhDP* es el agente causal de la pasteurelosis, fotobacteriosis o pseudotuberculosis, una enfermedad devastadora en la acuicultura marina que provoca elevadas mortalidades, posee un amplio rango de hospedadores, afectando a más de 20 especies de peces de interés acuícola, y tiene una amplia distribución global (Romalde, 2002., *Int. Microbiol.* 5 (1): 3-9; Thyssen et al., 1998. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1145-1151; Toranzo et al., 2005. *Aquaculture.* 246 (1-4): 37-61; Barnes et al. 2005., *Dev. Biol. (Basel)*.121: 75-84).

15

20

PhDP es un patógeno facultativo intracelular capaz de promover su internalización en las células del hospedador (Acosta et al. 2009., *J. Fish Dis.* 32(6): 535-541). El hecho de que *PhDP* sea un parásito intracelular capaz de resistir a la fagocitosis hace que sea un patógeno difícil de detectar por el sistema inmune del hospedador a la vez que dificulta los tratamientos quimioterápicos (Do Vale et al., 2005. *Mol. Microbiol.* 58(4): 1025-1038).

25

La pasteurelosis puede cursar de forma aguda, provocando grandes mortalidades, o de modo crónico asintomático. Las infecciones asintomáticas afectan tanto a peces cultivados como a animales salvajes, siendo las poblaciones naturales de peces y moluscos el reservorio natural del patógeno (Serraca et al., 2011. *Can. J. Microbiol.* 57(5): 437-40). Los peces enfermos suelen perder peso, presentar un oscurecimiento de la piel, necrosis en las branquias y en las vísceras suelen apreciarse granulomas blancos. Los brotes de pasteurelosis se producen en los meses de primavera y verano y se asocian a condiciones de estrés de los peces y a la baja calidad del agua: temperatura alta (> 18°C) y baja salinidad (Magariños et al., 1996. *Annu. Rev. Fish Dis.* 6(0): 41-64). La enfermedad aparece mayoritariamente durante el estado larvario, provocando mortalidades de hasta el 90%, pero también afecta a peces juveniles en los que ocasiona pérdidas del 50%. Tras los brotes agudos, los animales asintomáticos se convierten en portadores y pueden desarrollar la enfermedad cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables para el patógeno. Además, se ha detectado la presencia de *PhDP* en fluidos ováricos y huevos provenientes de reproductores sanos, lo que indica una probable transmisión vertical (Romalde et al., 1999. *J. Microbiol. Methods.* 38 (1-2): 147-154) Todo ello hace que los brotes de pasteurelosis sean un problema recurrente en las plantas de acuicultura debido a su difícil erradicación y control.

30

35

40

Inicialmente, los brotes de pasteurelosis aparecieron mayoritariamente en Japón; sin embargo, en la década de 1990 empezaron a detectarse los primeros brotes en Europa. Aunque las cepas de *PhDP* muestran características bioquímicas y serológicas muy homogéneas, se sabe que pueden agruparse en dos líneas clonales: una formada por los aislados de origen japonés y la otra formada por los aislados de origen europeo y americano (Magariños et al., 2000. *Epidemiol. Infect.* 125 (1): 213-219). Las bacterias patógenas tienen una serie de herramientas, denominadas factores de virulencia, que les permiten colonizar y persistir dentro de un hospedador. Los principales factores de virulencia descritos en *PhDP* son la presencia de una cápsula de polisacáridos y actividades enzimáticas como proteasas, fosfolipasas, lipasas y hemolisinas (Thyssen et al., 2000. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (3): 1013-1019; Magariños et al., 1996. *Microb. Pathog.* 21 (4): 289-297). De todos los factores de virulencia descritos en esta bacteria los más importantes son la producción de la toxina apoptótica AIP56, que le permite resistir la fagocitosis, y la producción y utilización de piscibactina, un potente sideróforo que le permite captar hierro del hospedador (Souto et al., 2012. *Eur. J. Org. Chem.* 29: 5693-5700; Osorio et al., 2006. *Microbiology.* 152 (11): 3327-3341). El sistema de la piscibactina está codificado en el plásmido pPHDP70 cuya presencia es una característica común a todos los aislados europeos y además se sabe que constituye un factor de virulencia clave (Osorio et al., 2015. *Appl. Environ. Microbiol.* Jun19, 19, pii: AEM.01580-15). Dentro de este plásmido el gen más importante a la hora de captar la piscibactina es *frpA*, ya que codifica el receptor de membrana externa FrpA que permite la internalización del complejo hierro-piscibactina.

45

50

55

60

La primera estrategia utilizada para combatir la enfermedad se basó en el uso de antibióticos, pero la aparición de cepas resistentes y multiresistentes provocó que esta estrategia fuese rápidamente

- ineficiente. Además, la persistencia de estas sustancias en el pez y el impacto que provocan al medioambiente hace que su utilización sea cada vez más restrictiva. En las últimas décadas los esfuerzos para controlar la enfermedad se han centrado en el desarrollo de vacunas efectivas. Son numerosas las vacunas desarrolladas frente a *PhDP* y entre ellas podemos encontrar de diversos tipos y formulaciones.
- 5 Sin embargo, los niveles de protección en el pez no suelen ser satisfactorios. Las vacunas convencionales, llamadas bacterinas, están compuestas por cultivos de la bacteria inactivados por calor, formol u otros métodos. Además este tipo de vacunas pueden ser enriquecidas con antígenos solubles como lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (OMP), componentes de la cápsula (CPS) o productos extracelulares (ECPs). De las numerosas vacunas disponibles la ICTHIOVAC-PD (vacuna
- 10 DI21) comercializada por Hipra (España), es la que ha mostrado mayores grados de protección (protección en lubina $\geq 60\%$) (Magariños et al., 1994. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14 (4): 120-122). Se trata de una bacterina enriquecida con ECPs que se viene utilizando desde mediados de los años noventa.
- 15 El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido utilizar nuevas estrategias para la formulación de vacunas. En los últimos años se han publicado trabajos en los que se opta por la utilización como antígeno de proteínas recombinantes purificadas a partir de cultivos de *E. coli* que, formuladas junto a otros componentes como sustancias adyuvantes o nano y microsistemas de vectorización, están obteniendo resultados prometedores, postulándose como candidatos potenciales para desarrollar nuevas vacunas para distintas especies de peces (Andreoni et al., 2013. *Vaccine*. 31 (5): 820-826; Ho L-P et al., 2011. *Fish Shellfish Immunol.* 30 (1): 412-419; Ho L-P et al., 2014. *J. Fish Dis.* 37 (1): 51-56; Zhao et al. 2014. *Vaccine* 32: 327-337).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

- 25 La estrategia basada en el uso de antibióticos a gran escala para el tratamiento de la pasteurelosis ha dado lugar a la aparición de cepas resistentes y multiresistentes que han hecho que su uso sea ineficiente. Además, la persistencia de los quimioterápicos en el pez y el impacto que provocan al medioambiente hace que su utilización sea cada vez más restrictiva. El desarrollo de la biología molecular ha permitido, en los últimos años, la formulación de vacunas basadas en el uso de proteínas recombinantes en el papel de antígeno. En la presente invención se describe por primera vez el uso de la proteína recombinante rFrpA de *PhDP* para el control de la pasteurelosis en peces.
- 30

- 35 Dado que las proteínas más inmunogénicas son las que forman parte de su superficie celular (Scarselli et al., 2005. *Trends Biotechnol.* 23(2): 84-91), creemos que la utilización del receptor de membrana externa FrpA, necesario para la internalización de piscibactina, actuará como un antígeno eficaz capaz de activar el sistema inmune específico del pez. Para ello, en la presente invención se ha clonado el gen *frpA* de *PhDP* en *E. coli* permitiendo la producción y purificación de la proteína recombinante FrpA (rFrpA). La presente invención muestra la formulación de un preparado inmunogénico a base de rFrpA y un adyuvante oleoso como el de Freund para obtener una vacuna frente a la pasteurelosis. La optimización de un protocolo de vacunación y los experimentos de infección experimental en lenguado (*Solea senegalensis* y *Solea solea*) indican que la inmunización con la proteína recombinante rFrpA induce la producción de anticuerpos específicos frente al receptor de la piscibactina, FrpA, confiriendo además una protección satisfactoria frente a *PhDP*.
- 40

- 45 Así, un primer aspecto de la invención se refiere a una proteína de *PhDP*, la FrpA, caracterizada por la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, a la proteína recombinante rFrpA, a polipéptidos con, al menos, un 80% de porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 2 y a fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas de FrpA. Cualquiera de estas proteínas o polipéptidos puede incluirse en una composición inmunogénica que permite la producción de una vacuna frente a *PhDP*. El uso de la vacuna así elaborada logra tasas de protección en peces iguales o superiores al 80% frente a peces no vacunados.
- 50

- 55 En esta memoria descriptiva se entiende como propiedades antigénicas la capacidad de una sustancia de ser reconocida por el sistema inmune de un organismo como un elemento extraño y generar una respuesta inmune específica que desemboca en la producción de anticuerpos contra dicha sustancia.

- 60 En esta memoria descriptiva se entiende por porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica el porcentaje de coincidencias de los mismos aminoácidos entre las dos secuencias alineadas, a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias. Además, los polipéptidos con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO:2 así como, los fragmentos inmunogénicos a los que se refiere la presente memoria son aquellos que mantienen las características antigénicas de la proteína FrpA.

- 65 En esta memoria descriptiva se entiende como fragmento inmunogénico un péptido capaz de activar el sistema inmune específico del pez generando anticuerpos frente a pasteurelosis.

- 5 La invención también se refiere al gen que codifica la proteína FrpA de *PhDP*, caracterizado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 y a secuencias con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de, al menos, el 70% o aquellas que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas.
- 10 En esta memoria descriptiva se entiende por porcentaje de identidad de la secuencia nucleotídica el porcentaje de coincidencias de los mismos nucleótidos entre dos secuencias alineadas, a lo largo de toda la longitud de ambas secuencias.
- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a la secuencia nucleotídica del gen *frpA*, o secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia, o secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas, clonadas en un vector recombinante que, asimismo, es susceptible de incluirse en células o microorganismos hospedadores en los que se expresan las secuencias nucleotídicas descritas.
- 20 Otro aspecto de la invención se refiere a un organismo transgénico no humano que contiene, insertado en su genoma, una secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, secuencias con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de, al menos, el 70%, secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas o vectores que comprenden cualquiera de las anteriores secuencias.
- 25 La invención también se refiere a una composición inmunogénica que incluye: la proteína FrpA, la proteína recombinante rFrpA, polipéptidos con, al menos, un 80% de identidad con la proteína FrpA o fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas; la molécula nucleotídica del gen de FrpA, secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia o secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas; vectores recombinantes que comprenden cualquiera de estas secuencias nucleotídicas o células, microorganismos u organismos transgénicos no humanos portadores de vectores que incluyen la molécula nucleotídica del gen de FrpA, secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia nucleotídica o secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas.
- 30 Esta composición inmunogénica se puede utilizar en la elaboración de una vacuna o preparación farmacéutica con actividad inmunizadora para su administración a peces con el fin de conferirles protección frente a la pasteurellosis, enfermedad causada por la infección por *PhDP*. Además, la composición inmunogénica comprende un adyuvante, el adyuvante de Freund, para mejorar la respuesta inmune y puede comprender también un micro o nanosistema como sistema de vectorización.
- 35 En esta memoria descriptiva se entiende como microsistema de vectorización a un sistema constituido por partículas que presentan unas dimensiones microescalares y que puede ser utilizado para modificar y/o controlar la distribución de la composición inmunogénica a nivel tisular, celular o subcelular.
- 40 En esta memoria descriptiva se entiende como nanosistema de vectorización a un sistema constituido por partículas que presentan unas dimensiones nanoescalares y que puede ser utilizado para modificar y/o controlar la distribución de la composición inmunogénica a nivel tisular, celular o subcelular.
- 45 La vacuna elaborada con la composición inmunogénica que incluye la proteína recombinante rFrpA y adyuvante de Freund alcanza valores de protección satisfactorios, igualando la protección alcanzada por la vacuna comercializada por la casa comercial Hipra, a lo que suma además otros beneficios como el hecho de evitar problemas asociados a la bioseguridad ya que, no es necesario el cultivo a gran escala del patógeno del que proviene la proteína y el uso de una proteína recombinante que no supone ningún riesgo para la salud animal ni para el medio ambiente.
- 50 La invención también se refiere a un procedimiento para la producción de proteína recombinante (rFrpA) o polipéptidos con, al menos, un 80% de porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 2 o fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas de la proteína, que comprende el cultivo de una célula o microorganismo hospedador transfectado o transformado con la secuencia nucleotídica del gen *frpA*, o secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia o secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos que mantienen las propiedades antigénicas de la proteína clonadas en un vector, cultivado en condiciones que promueven la expresión para la posterior recuperación del polipéptido.
- 55 En esta memoria descriptiva se entiende como condiciones que promueven la expresión de un gen como aquellas condiciones de medio de cultivo, temperatura, pH y tiempo de incubación necesarias para que se
- 60
- 65

pueda obtener la correcta expresión de dicho gen obteniéndose la proteína madura correctamente plegada.

5 La invención también se refiere a un procedimiento para la replicación del gen que codifica la proteína FrpA de *PhDP*, caracterizado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, secuencias con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de, al menos, el 80%, o secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas de la proteína FrpA que comprende el cultivo de una célula o microorganismo hospedador transfectado o transformado con un vector recombinante que a su vez comprende el gen que codifica la proteína FrpA de *PhDP*, caracterizado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, secuencias con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de, al menos, el 80% o secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas de la proteína FrpA cultivado en condiciones que promueven la replicación para la posterior recuperación del gen.

15 Se entiende como condiciones que promueven la replicación aquellas condiciones de temperatura, pH, medio de cultivo y tiempo necesarias para que se pueda obtener la replicación del vector utilizado para clonar la proteína recombinante.

20 Por otro lado, la invención también se refiere al procedimiento para elaborar una composición inmunogénica o preparación farmacéutica con actividad inmunizadora en peces que comprende la formulación de, al menos, uno de los siguientes productos: la proteína FrpA, caracterizada por SEQ ID NO:2, la proteína recombinante rFrpA, polipéptidos con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO:2 o fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas; el gen que codifica la proteína FrpA de *PhDP*, caracterizado por SEQ ID NO:1, secuencias con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO:1 de, al menos, el 70% o secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas; un vector recombinante que incluye una de estas secuencias nucleotídicas; una célula o microorganismo transfectado o transformado con un vector recombinante como el descrito aquí; un organismo transgénico no humano que comprende insertado en su genoma una secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, secuencias con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1 de, al menos, el 70%, secuencias que codifican fragmentos inmunogénicos de la proteína FrpA que mantienen las propiedades antigénicas o vectores que comprenden cualquiera de las anteriores secuencias; un adyuvante; un microsistema o nanosistema de vectorización.

35 La composición inmunogénica de la invención permite la obtención de un grado de protección elevado en peces, evitando el cultivo y manipulación del patógeno y evitando los problemas asociados a la utilización de vacunas poco caracterizadas procedentes de extractos brutos de la bacteria que puedan contener otros componentes no deseados como endotoxinas, exotoxinas, enzimas hidrolíticas, etc.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 **Figura 1.** Gel agarosa 1%. **A.** Amplificación del gen *frpA* a partir de DNA genómico de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* DI21. 1) marcador de peso molecular. 2) amplificación sin DNA genómico. 3) amplificación con DNA genómico. **B.** Amplificación del gen *frpA* tras ser clonado en pBAD. 1) marcador de peso molecular. 2) amplificación sin DNA plasmídico. 3) amplificación con el vector original derivado de pBAD (Guzman *et al.*, 1995. *J. Bacteriol.* 177 (14): 4121-4130) (Nótese que este vector contenía la secuencia codificadora de otra proteína en el lugar a ocupar por FrpA; Vila Sanjurjo *et al.*, sin publicar). 4) amplificación de pBAD-10His-FrpA. **C.** Amplificación del gen *frpA* que contiene *peIB* y 10 His tras ser clonado en pBAD 1) Amplificación sin DNA plasmídico. 2) Amplificación de pBAD-10His-FrpA.

50 **Figura 2.** Análisis de la expresión de rFrpA. M corresponde al marcador de peso molecular. Las fracciones celulares insolubles (pellet) obtenidas después de la lisis por sonicado y posterior centrifugación fueron separadas en un gel de poliacrilamida 8%-SDS. 1) Proteínas presentes sin inducción. 2) proteínas después de la inducción con arabinosa 0.2%. La flecha indica la proteína recombinante.

55 **Figura 3.** Las fracciones obtenidas en el proceso de purificación de rFrpA usando una resina de afinidad de níquel fueron analizadas en un gel de poliacrilamida 10%-SDS. M corresponde al marcador de peso molecular. 1) Fracción membranas totales de las células después de la solubilización con sarkosyl 1.5%. 2) Fracción membranas externas de las células después de la solubilización con elugent 5%. 3) Fracción no retenida en la columna de afinidad de níquel. 4-6) Fracciones de lavado de la columna con tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 0.05 M, elugent 0.25% e imidazol 30 mM. 9-12) Fracciones de elución de la proteína con tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 0.05 M, elugent 0.25% y imidazol 500 mM. 13) FrpA concentrada obtenida después de combinar las fracciones de la columna.

Figura 4. A Digestión de rFrpA con tripsina. La reacción se llevó a cabo con 4 µg/mL de tripsina durante 15 min a temperatura ambiente. Los fragmentos obtenidos fueron analizados en un gel de poliacrilamida 10%-SDS. M corresponde al marcador de peso molecular. 1) Fragmentos de rFrpA nativa 2) Fragmentos de rFrpA desnaturalizada por calentamiento a 100°C durante 10 min en presencia de SDS. **B.** Espectro de

5

Figura 5. Protocolo experimental de vacunación e infección experimental realizado para determinar el nivel de protección. También se muestran los días en los que se obtuvieron muestras de suero para cuantificar la producción de anticuerpos.

10

Figura 6. Nivel de anticuerpos en sangre frente a *PhDP* presente en el suero de los grupos de peces inmunizados con 100 µl de: PBS, PBS con adyuvante de Freund (en proporción 1:1), bacterina o vacuna rFrpA.

15

Figura 7. Supervivencia acumulada en los cuatro grupos de peces inmunizados con vacuna rFrpA, bacterina, PBS y Freund o PBS. Los resultados se muestran como el porcentaje de supervivencia acumulada en cada grupo de peces.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

20

La presente invención se ilustra adecuadamente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Expresión de la proteína recombinante de FrpA (rFrpA) en *E. coli*

25

En este ejemplo se ilustra la metodología utilizada para la producción de la proteína recombinante rFrpA en *E. coli* BL1 CodonPlus. Para ello se construyó un plásmido recombinante al clonar el gen *frpA*, que codifica para la proteína FrpA, en el plásmido pBAD (Guzman *et al.*, 1995. *J. Bacteriol.* 177 (14): 4121-4130). La utilización del pBAD como vector de clonación permite que la expresión de *frpA* se active al añadir arabinosa al medio de cultivo. La construcción se realizó mediante “*overlap extension PCR cloning*” (Bryksin *et al.*, 2010, 48: 463-465). El gen *frpA* se amplificó mediante PCR a partir del ADN de *PhDP* usando polimerasa Phusion (Thermo Scientific) y los cebadores mencionados en la tabla No. 1. Para asegurar la correcta localización de rFrpA en la membrana externa de *E. coli*, se sustituyó el péptido señal nativo de FrpA, correspondiente a los primeros 26 aminoácidos del extremo N-terminal, por *pelB* de *Erwinia carotovora* caracterizado por SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4. Adicionalmente se incluyó una secuencia que codifica la síntesis de 10 histidinas útil durante la purificación de rFrpA mediante resina de afinidad de níquel (de aquí en adelante nos referiremos al constructo como: *pelB*-10His-FrpA). La construcción fue transformada en *E. coli* BL21 CodonPlus.

30

35

Tabla 1. Cebadores usados para la amplificación del gen *frpA* y para su inserción en el plásmido pBAD.

Cebador (oligonucleótido)	Secuencia 5'→3'
Fwd-frpA-pBAD Caracterizado por SEQ ID NO:5	CCCGTTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATTAACCATGTACAGGAACAGTTTC TCGCTCTCTCC
Rev-frpA-pBAD Caracterizado por SEQ ID NO:6	CGAATTCCAATGACAACCTCCGTCTTCTTACCACTCTAGCTTCATATTCACA CCC
F-pBAD-pelB Caracterizado por SEQ ID NO:7	GGGCTAACAGGAGGAATTAACCAUGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTG CTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCC
pelB-His-FrpA-R Caracterizado por SEQ ID NO:8	CCGTAACCTTCTGGATTATGTTTCATCATGATGATGATGGTGGTGGTGGTGGT GATGGG CCATCGCCGGCTGGGCAGC

Tras clonar la secuencia *pelB*-10His-FrpA en *E. coli*, se optimizaron las condiciones de expresión de rFrpA, para ello se probaron diferentes condiciones de cultivo variando la concentración de arabinosa,

temperatura y el tiempo de incubación. Finalmente, las mayores cantidades de rFrpA se obtuvieron con cultivos de *E. coli* BL21 CodonPlus incubados a 28°C durante 38 h suplementando el medio de cultivo con un 0.2% de arabinosa.

5 Para comprobar la correcta expresión de rFrpA se prepararon dos cultivos de *E. coli* BL21 CodonPlus con el plásmido pelB-10His-frpA, uno de los cultivos se dejó crecer sin inducir y el otro cultivo se indujo con arabinosa 0.2% durante 3 h. A continuación se centrifugaron los cultivos y las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, KCl 0.1 M y se lisaron por sonicación, obteniéndose dos fracciones, el sobrenadante y el pellet, este último se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, Urea 6 M.
10 Estas fracciones se cargaron en geles de poliacrilamida al 8%. En la figura 2 se puede observar como al adicionar el inductor, aparece una banda alrededor de 75 KDa. Dicha banda fue analizada empleando la técnica de huella peptídica y fragmentación (MS y MS/MS) mediante MALDI-TOF/TOF. Los péptidos obtenidos permitieron comprobar la presencia de rFrpA.

15 **Ejemplo 2. Purificación de la proteína rFrpA y estudio de su estructura terciaria**

Para la preparación de la vacuna se optó por trabajar con la proteína purificada a partir de las membranas externas de *E. coli* que expresasen la proteína rFrpA. En el ejemplo anterior hemos visto que rFrpA puede ser sobreexpresada correctamente en *E. coli* BL21 CodonPlus. En este ejemplo se ilustra la producción y purificación de rFrpA a media escala utilizando para ello cromatografía de afinidad, y se demuestra que
20 rFrpA conserva la estructura tridimensional nativa de la proteína FrpA de *PhDP*.

De una placa de *E. coli* BL21 CodonPlus que porta la construcción pelB-10His-FrpA se inició un cultivo bacteriano de 100 mL de LB suplementado con 200 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de cloranfenicol que se incubó durante una noche a 28°C en agitación a 180 rpm. A la mañana siguiente se usaron 60 mL de preinóculo para iniciar un cultivo de 6 L del mismo medio. Este cultivo se incubó a 28°C con agitación durante aproximadamente 90 min, momento en el que se indujo la expresión de rFrpA al añadir al medio de cultivo 0.2% de arabinosa. El cultivo se dejó crecer a 28°C con agitación durante 38 h. Posteriormente, se obtuvo el pellet celular mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. Siguiendo esta metodología se obtuvo un pellet de 24.7 g que se conservó a -80° C hasta su procesamiento.
25

El pellet obtenido de la inducción con arabinosa se resuspendió en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, conteniendo lisozima (Alfa Aesar), DNasa RQ1 *RNase-Free* (PROMEGA) e inhibidor de proteasas (SIGMA ALDRICH). Las células bacterianas se lisaron por sonicación y el lisado se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min a 4°C para retirar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 33000 g durante 1 h a 4°C, para obtener las membranas totales. Posteriormente, las membranas totales se resuspendieron en agua y se adicionó sarkosyl (lauroil-sarcosinato sódico, SIGMA ALDRICH) al 3%. Estas membranas se solubilizaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Una vez disueltas las membranas internas se obtuvieron las membranas externas por centrifugación a 30000 g durante 1 h a 4°C.
30

Las membranas externas obtenidas por centrifugación como se mencionó previamente, se resuspendieron en elugent 5% (CALBIOCHEM) y se dejaron una noche a 4°C con agitación. Para retirar las impurezas no solubles se centrifugó a 33.000 g durante 1 h a 4°C. La fracción soluble de las membranas se combinó con tampón de equilibrio (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 0.05 M, elugent 0.25% y imidazol 10 mM). La purificación de rFrpA se hizo usando columnas de afinidad de níquel de 1 mL (Thermo Scientific™ HisPur™ Ni-NTA). La separación en la columna se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, utilizando como tampón de lavado Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 0.05 M, elugent 0.25% e imidazol 30 mM, y como tampón de elución Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 0.05 M, elugent 0.25% e imidazol 500 mM. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y las fracciones que contenían la proteína fueron combinadas, concentradas y cambiadas a tampón PBS con elugent 0.25% usando células con agitación Amicon.
35
40
45
50

Por otra parte, para que rFrpA genere una respuesta inmune efectiva frente a *PhDP* es indispensable el correcto plegamiento de rFrpA en la membrana externa de *E. coli*. Para estudiar la estructura tridimensional de rFrpA se realizaron dos pruebas: digestión con tripsina y análisis de dicroísmo circular.
55 Reacción con tripsina: 10 µL de disolución de proteína (2.55 mg/mL) se trataron con 4 µg/mL de tripsina (Sigma Aldrich) durante 15 min a temperatura ambiente. Los resultados de la digestión se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 10%, una muestra de rFrpA obtenida de las membranas externas y una fracción de la muestra anterior sometida a desnaturalización con SDS 0.1% a 100°C. A diferencia de la rFrpA desnaturalizada, para la que se observan una gran cantidad de bandas debido a la presencia de sitios de corte expuestos durante la desnaturalización, los productos de digestión de la rFrpA nativa presentan menos bandas, debido a la protección de gran parte de estos sitios en la proteína intacta. (Figura 4A).
60

Para terminar de comprobar que rFrpA estaba en su forma nativa se hizo el espectro de dicroísmo circular. El espectro obtenido para rFrpA coincide con los espectros de proteínas de la familia de receptores de sideróforos que han sido estudiados previamente. El espectro de rFrpA presenta un mínimo
65

en 219 nm que confirma la presencia de láminas β en su estructura secundaria (Figura 4b). [*Microbes and Infection* 2006, 8: 2145-2153].

Ejemplo 3. Experimento de inmunización con rFrpA y producción de anticuerpos frente a PhDP

5 En este ejemplo se ilustra el experimento llevado a cabo para comprobar la capacidad inmunogénica de rFrpA en peces cultivados. Para ello se realizó una experiencia de inmunización de lenguados a los que se les monitorizó la producción de anticuerpos frente a *PhDP*.

10 El protocolo de inmunización utilizado se ilustra en la figura 5. Se utilizaron un total de 250 lenguados de 10 g de peso que fueron distribuidos al azar en 5 grupos de 50 peces. Un grupo de 50 peces actuó como testigo del experimento, los restantes 4 grupos fueron sometidos a diferentes tratamientos al ser inmunizados con 100 μ L de: (1) una solución inmunogénica que contenía la proteína rFrpA. A cada pez se le suministró 30 μ g de rFrpA resuspendida en una solución de PBS con 0.25% de elugent y adyuvante de Freund en una proporción 1:1 (2) una bacterina (vacuna tradicional) obtenida al inactivar un cultivo de *PhDP* con un 0.1% de formol, este cultivo inactivado se ajustó con PBS a una $DO_{600} = 1$, (3) adyuvante de Freund. A este grupo de peces se les suministró una solución de PBS y adyuvante de Freund en una proporción 1:1 y por último, (4) el grupo control sin vacunar tratado con solución salina. El método elegido para suministrar los tratamientos fueron dos inmunizaciones por inyección intraperitoneal que se suministraron los días 0 y 30 siguiendo el protocolo expuesto en la Figura 4.

20 Para cuantificar la respuesta inmune generada en el pez, los días 0, 30 y 60 se obtuvieron muestras de suero. Con los sueros se realizó un inmunoensayo ELISA tipo sándwich, o de captura de antígeno, utilizando como antígeno células inactivadas de *PhDP* y como anticuerpo una IgM anti-Gurami capaz de reconocer específicamente los anticuerpos del lenguado. En la figura 6 se muestran los niveles de anticuerpos frente a *PhDP* presentes en los sueros de los peces de cada tratamiento. Los resultados se expresan como un porcentaje siendo el 100% el nivel de anticuerpos de los peces inmunizados con bacterina el día 60 ya que este fue el valor máximo. En los peces control, tratados con PBS, la presencia de anticuerpos frente a *PhDP* es testimonial y apenas alcanza el 5%. En el grupo de peces inmunizados con adyuvante de Freund se observa una producción significativa de anticuerpos. El adyuvante de Freund consiste en una suspensión oleosa de *Mycobacterium tuberculosis* por lo que creemos que se está produciendo un reconocimiento cruzado entre los anticuerpos frente a *Mycobacterium* y *PhDP*. En los peces inmunizados con bacterina se observa una producción de anticuerpos intensa y rápida, como se muestra en la figura 6 la producción ya es máxima desde la primera inmunización. En el grupo de peces inmunizados con rFrpA vemos que la producción de anticuerpos es gradual, de apenas el 7%, tras la primera inmunización, que sin embargo aumenta al 20% tras la segunda inmunización. Aunque los niveles de anticuerpos son estadísticamente superiores en el grupo de peces inoculados con bacterina, la presencia de anticuerpos frente a *PhDP* en el suero de los lenguados inmunizados con rFrpA demuestra que rFrpA es una proteína inmunogénica capaz de inducir una respuesta inmune específica en el lenguado. Tal y como se refleja en la bibliografía, cuando se realizan inmunizaciones con vacunas recombinantes, es necesario realizar una segunda inmunización o dosis de refuerzo, esta necesidad se refleja en el grupo de peces tratados con rFrpA, en el que sólo se detecta una producción significativa de anticuerpos tras la segunda inmunización.

Ejemplo 4. Determinación de la protección conferida frente a PhDP por la rFrpA

45 Para determinar el nivel de protección conferida por la vacuna recombinante rFrpA frente a *PhDP* se realizó una infección experimental inoculando a los lenguados una dosis de *PhDP* capaz de producir un 100% mortalidad en un plazo de 7 a 10 días. En este experimento también se comparó el nivel de protección de la vacuna rFrpA con el conferido por una bacterina clásica utilizada en la industria acuícola.

50 Tras haber suministrado los diferentes tratamientos por medio de dos inmunizaciones, el día 60, se les inoculó a los lenguados 100 μ L de una suspensión de PBS con 10^7 células mL^{-1} de *PhDP*. A partir de este momento se registró la mortalidad acumulada en cada grupo de peces (tratamiento). Tras la infección se retiraron peces muertos entre los días 64 y 71, momento a partir del cual se estabilizaron las curvas de supervivencia. La figura 7 muestra la dinámica de supervivencia registrada entre los días 61 y 75. Como se puede ver en la Figura 7, existen diferencias significativas entre los grupos de animales vacunados (grupo 1 y 2) y los grupos control (grupo 3 y 4) ($p < 0.001$). En los peces inoculados con PBS, o grupo control, se observa una rápida mortalidad que alcanza el día 68 al 100% de los peces. En el grupo de peces tratados con adyuvante se observa una reducción significativa de la mortalidad respecto al grupo control, consiguiendo contener la mortalidad en un 55%. Los grupos donde se observa un mayor nivel de supervivencia, y por tanto de protección frente a la pasteurelisis, son los grupos tratados con la vacuna recombinante rFrpA y con la bacterina. El índice de supervivencia se situó en el 74% y 80% respectivamente. Las diferencias no son significativas por lo que se puede considerar que la protección conseguida con la vacuna recombinante es equivalente a la conseguida con la bacterina, pero con las ventajas comentadas anteriormente que aporta el uso de una proteína purificada.

65

Los resultados obtenidos en el experimento de inmunización indican que la inmunización de los lenguados de 10 g de peso con 30 µg de proteína recombinante rFrpA es suficiente para conferir un nivel de protección satisfactorio, lo que hace que la utilización de la proteína de membrana externa FrpA se postule como una opción prometedora a la hora de combatir la pasteurelisis.

5

Ejemplo 5. Formulación de la vacuna recombinante rFrpA y protocolo de inmunización.

En este ejemplo se realiza una descripción detallada de la composición de la solución inmunogénica a base de la proteína recombinante FrpA (rFrpA). La vacuna recombinante rFrpA consiste en una solución de 600 µg/ml de rFrpA en tampón fosfato salino (PBS; pH 7.4) con un 0.25 % de elugent que se mezcla en una proporción 1:1 con adyuvante de Freund. Para la correcta inmunización de los peces la vacuna recombinante debe ser suministrada por medio de dos inmunizaciones. La inmunización consistirá en la inyección intraperitoneal de un volumen de 100 µl de la solución inmunogénica, por tanto cada pez será inmunizado con 30 µg de rFrpA. En la primera inmunización el adyuvante utilizado será el completo de Freund (SIGMA-ALDRICH), mientras que en la segunda inmunización (dosis de refuerzo) se utilizará el adyuvante incompleto de Freund (SIGMA-ALDRICH). Las dos inmunizaciones deben estar espaciadas por un periodo de 30 días. Dado que la respuesta protectora en el pez es dependiente de la edad y la especie, podría ser conveniente ajustar la cantidad de proteína recombinante inyectada a las circunstancias específicas de cada vacunación. La presente invención no pretende limitar la cantidad de proteína suministrada, y aunque en los ejemplos 3 y 4 se ha acreditado que la inmunización de lenguados de 10 g de peso con 30 µg de proteína recombinante es suficiente para generar un grado de protección satisfactorio, la composición inmunogénica podría contener hasta 300 µg de proteína recombinante sin provocar efectos nocivos en los animales.

10

15

20

25

30

35

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula aislada de ácidos nucleicos, caracterizada por una secuencia nucleotídica SEC ID NO:1 o con, al menos, un 70% de identidad con SEQ ID NO:1, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína FrpA de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* caracterizada por SEQ ID NO:2, o un polipéptido con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO:2 que mantiene las propiedades antigénicas de FrpA o un fragmento inmunogénico que mantiene las propiedades antigénicas de FrpA.
- 10 2. Molécula aminoacídica aislada que comprende la secuencia aminoacídica de FrpA de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, caracterizada por la SEC ID NO:2, o la proteína recombinante rFrpA, o una secuencia con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO:2 que mantiene las propiedades antigénicas de FrpA o un fragmento inmunogénico que mantiene las propiedades antigénicas de FrpA.
- 15 3. Vector recombinante caracterizado porque comprende la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1.
4. Célula o microorganismo que comprende un vector recombinante según reivindicación 3.
- 20 5. Organismo transgénico no humano que comprende, insertado en su genoma, una secuencia nucleotídica según reivindicación 1 o un vector según reivindicación 3.
- 25 6. Composición inmunogénica caracterizada porque comprende un elemento seleccionado de la lista que consiste en:
 - a. Molécula aislada de ácidos nucleicos según reivindicación 1
 - b. Molécula aminoacídica aislada según reivindicación 2;
 - c. Vector recombinante según reivindicación 3 ;
 - d. Célula o microorganismo hospedador según reivindicación 4;
 - e. Organismo transgénico no humano según reivindicación 5;
- 30 o cualquiera de sus combinaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Composición inmunogénica según la reivindicación 6 donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es un adyuvante.
- 35 8. Composición inmunogénica según la reivindicación 7 en dónde el adyuvante se selecciona de la lista que consiste en: aceite mineral, adyuvante de Freund completo (FCA), adyuvante de Freund incompleto (FIA), alginatos, beta-glucanos, CpG, flagelina, fosfito de aluminio y potasio, hidróxido de aluminio, interleuquinas, levamisol, liposomas, microesferas biodegradables, Montanide ISA, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium butyricum*, *Mycobacterium chelonae*, nanopartículas PLGA, paredes celulares de micobacteria, polisacáridos bacterianos (LPS), quimiocinas, quitosano, saponinas, sorbitan sesquioleato, vitamina C, vitamina E, o cualquier combinación de los mismos.
- 40 9. Composición inmunogénica según reivindicación 8 en la que el adyuvante es el adyuvante de Freund.
- 45 10. Composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende un nanosistema como sistema de vectorización.
- 50 11. Composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende un microsistema como sistema de vectorización
- 55 12. Anticuerpo obtenible tras la inmunización de un animal con la composición inmunogénica según reivindicaciones 6 a 11.
13. Anticuerpos según la reivindicación 14, donde el animal empleado para la inmunización es un pez.
- 60 14. Uso como medicamento de los anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15.
15. Uso de la composición inmunogénica, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en la elaboración de un medicamento.
- 65 16. Uso según la reivindicación 15, donde el medicamento es una vacuna

17. Uso según la reivindicación 16, donde la vacuna es para peces.
- 5 18. Uso de la composición inmunogénica, según reivindicación 17, donde los peces se seleccionan de la lista que consiste en: *Dicentrarchus labrax*, *Epinephelus akaara*, *Macropodus opercularis*, *Morone americanus*, *Morone saxatilis*, *Mullus spp.*, *Pagrus pagrus*, *Pictiblennius yatabei*, *Rachycentron canadum*, *Seriola quinqueradiata*, *Solea senegalensi*, *Solea solea*, *Sparus aurata*.
- 10 19. Uso de la composición inmunogénica, según reivindicación 18, donde los peces son *Solea senegalensis* y *Solea solea*.
- 15 20. Procedimiento para la producción de una molécula aminoacídica, según reivindicación 2, caracterizado porque comprende el cultivo de una célula o microorganismo hospedador, según reivindicación 4, y la recuperación de la molécula aminoacídica del extracto celular o del sobrenadante.
- 20 21. Procedimiento para la producción de una molécula aminoacídica, según reivindicación 2, caracterizado porque comprende el cultivo de un organismo transgénico no humano, según reivindicación 5, y la recuperación de la molécula aminoacídica.
- 25 22. Procedimiento para la producción de una molécula nucleotídica, según reivindicación 1, caracterizado porque comprende el cultivo de una célula o microorganismo hospedador, según reivindicación 4, y la recuperación de la molécula nucleotídica a partir del extracto celular o del sobrenadante.
- 30 23. Procedimiento para la producción de una molécula nucleotídica, según reivindicación 1, caracterizado porque comprende el cultivo de un organismo transgénico no humano, según reivindicación 5, y la recuperación de la molécula nucleotídica.
- 35 24. Procedimiento para la elaboración de una composición inmunogénica según reivindicaciones 6 a 11, que comprende un procedimiento según reivindicaciones 20 o 23, y la adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.
25. Un kit para uso en la inducción de una respuesta inmune en peces, que comprende una composición inmunogénica o vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 y opcionalmente instrucciones relacionadas con la administración.

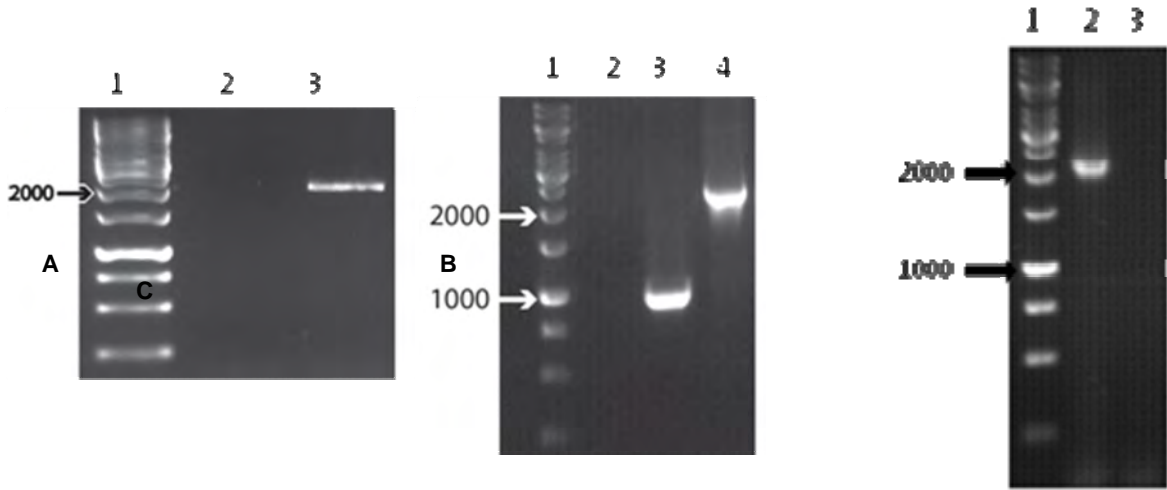


FIG.1

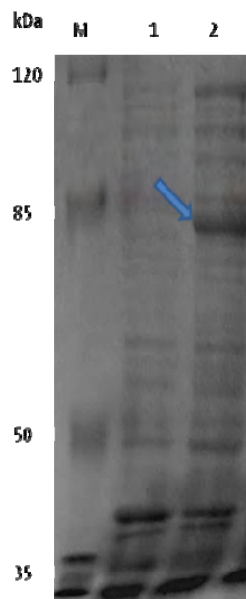


FIG.2

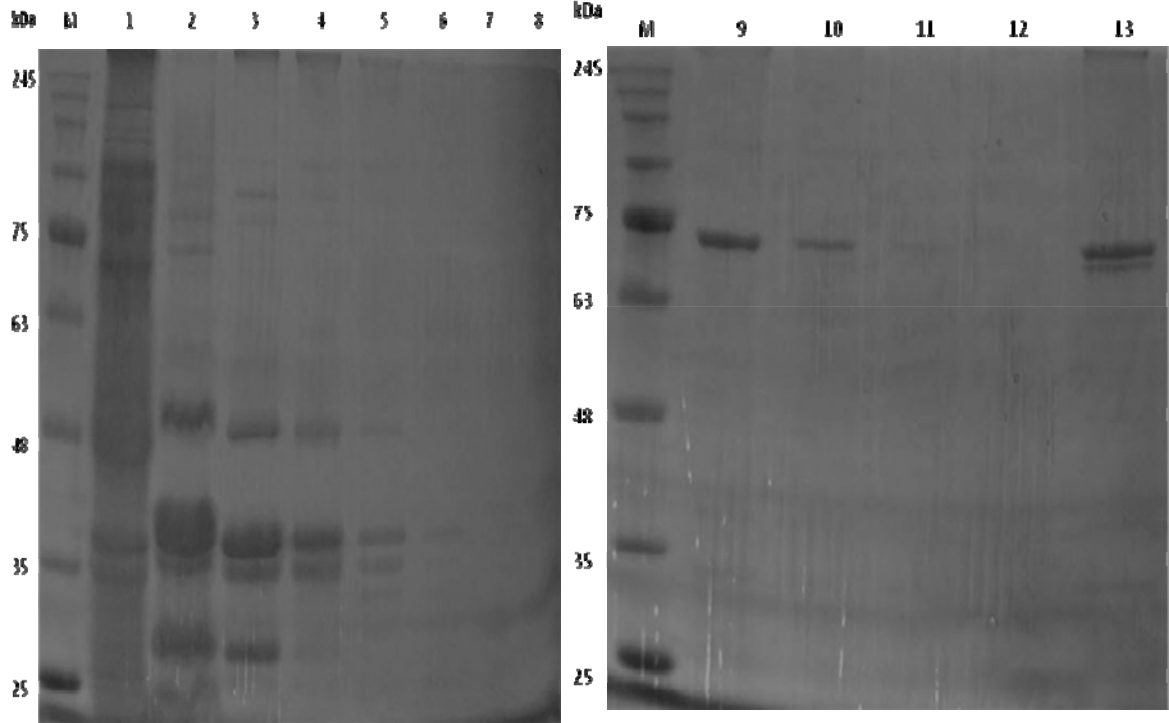


FIG.3

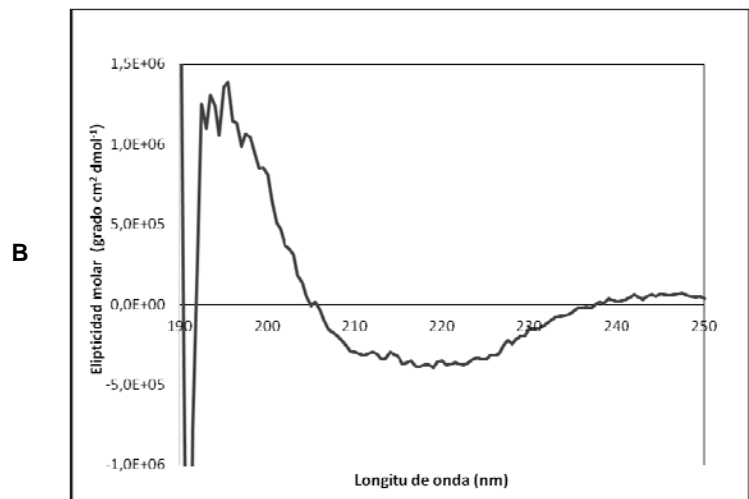
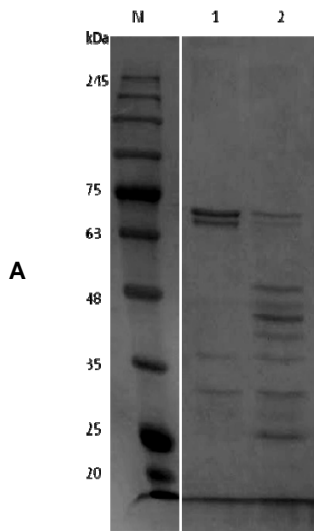


FIG.4

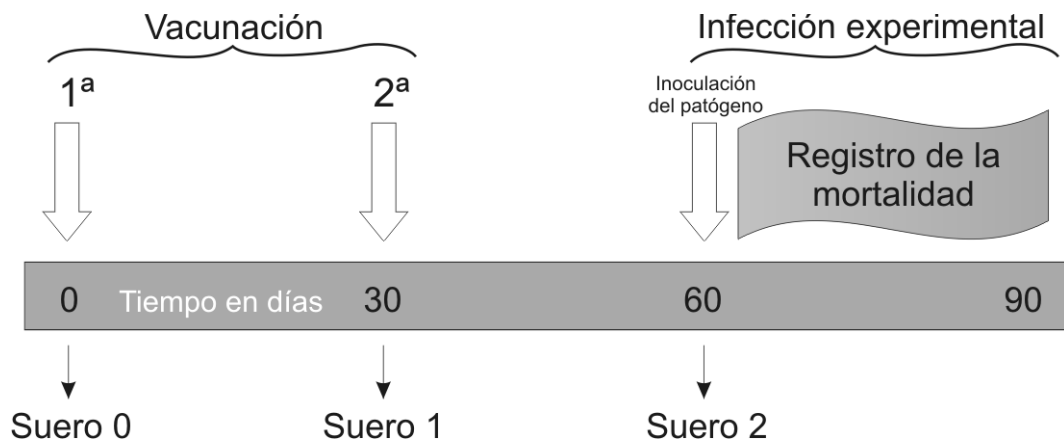


FIG.5

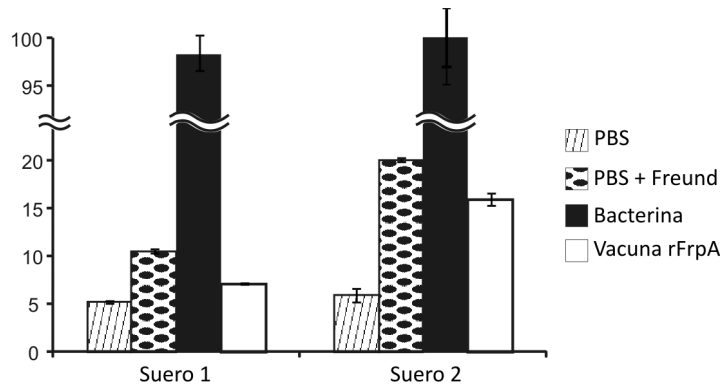


FIG.6

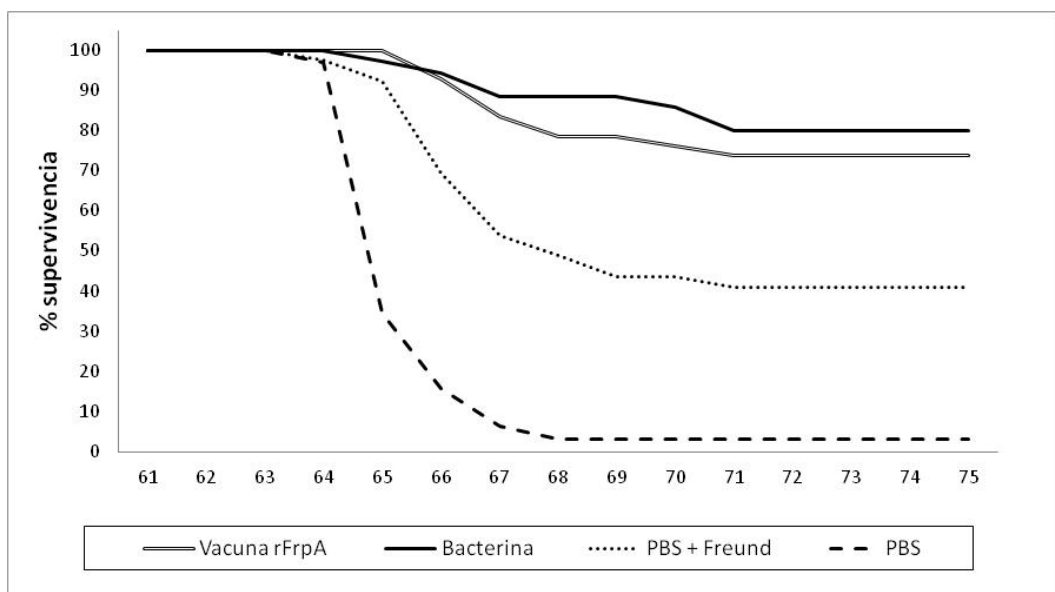


FIG.7

ES 2 549 702 B1

LISTA DE SECUENCIAS

```

<110> Universidade de Santiago de Compostela
<120> Proteína recombinante del receptor de la ferri-piscibactina y su
aplicación para la producción de una composición inmunogénica frente a
5  pasteurelisis
<130> FrpA
<160> 4
<170> BiSSAP 1.3

10 <210> 1
<211> 1983
<212> DNA
<213> Photobacterium damsela subsp. piscicida
<220>
15 <221> source
<222> 1..1983
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Photobacterium damsela subsp. piscicida"
<220>
20 <221> CDS
<222> 1..1980
<223> /transl_table=1
      /translation="MYRNSFSLSPSLAAILAATLSPVVSAD EHNPEVTVMETMIVEATKQNIS
LQQVDSSVLIK TGKELEKAGIHEVKDLEKAF PGLMIQTRGNRTYANTTIRGVSSPDYYSPTVSIYVDGVLQDS
25 AFLTQQLLNVEQVELLRGPQATLYGGNSQGGIINIITKKATDQNLASGGVTYSDRSKQLDASAAV
AISDSTYADIAIRSLKDEGNIRHIPSNTDDANDSKDFSGTARFHYLPQQSPLAVTFVSSAHLDSHEEW
YLTQQEYDKRATSQDIPELKRVVNSYALHIDYDLGATQLTSITAYQNRNVDREYIGGKWVEDQNTFSQEV RAN
TQFSDDL SALVGGYYEHRNFVDSAGANNDIETQTYALFGQMTYAMTDSIDL TGGLRASRFFSESDFGGNSAWR
IDSYQSDKSENVISP KAAIGWQINPDSRVFASLASGYRPGGFSPAPRSSGDKNGYSPEKSFNGELGWRTNLAE
30 NTVRFSGALYWIDTKDIQLYTG NPGSQVLRNMGDAQSRGIELDLAYYPTDDLTLTLGATFGQSTFESGNDGIE
GKTLPHYAPDTTVVAGIEYYLPQSWLDGELSIATNARYTSKIFFDESNTLAQDGYTLIDLAVQYAMNDNISFRV
FSNNLTDKEYTTTYAYSFGNTRFN NYGSEREVGVNMKLEW"

35 <400> 1
atgtacagga acagtttctc gctctctcca ctttcactag ctatcttagc tgcaaccttg      60
agccctgttg ttagtgcaga tgaacataat ccagaagtta cggttatgga aaccatgatt      120
40 gtcgaagcaa ccaagcagaa catttcatta caacaggttg atagctcagt gctcatcaaa      180
acaggaaaag agcttgagaa agcaggaatc catgaagtta aggacttaga aaaagccttc      240
45 cctggcctaa tgattcaaac ccgaggtaac cgtacgtatg ccaacaccac tatacgtggc      300
gtgagttcac ctgattacta ttctcctacc gtcagcatct atgtc gatgg tgtattgcaa      360
gacagtgc at ttctaacc ca gca gttactc aacgtagaac aggtagagct gcttcgaggg      420
50 ccgcaagcta cgctatatgg tggcaattct cagggaggta tcatcaatat catcaccaag      480
aaggcgactg atcaaaaacct agcgtctggt ggtgtcactt acagcgatcg aagcaaaaa      540
55 cttgatgctt cagcggcagt tgcgataagc gattcaactt acgctgat at agcgattcga      600
tcattaaag acgaaggtaa tattegtcac attcctagca acaccgatga cgctaacgac      660

```

ES 2 549 702 B1

agtaaagact ttagcggtag agctcgattc cactatctac ctcagcagtc ccctctcgct 720
 5 gtgacgtttt ctgtctcttc tgcacatcta gatagccatg aagagtggta tttgacccaa 780
 caagaatatg ataagcgagc caccagccaa gacatacctg aacttaagcg cgtcgtcaat 840
 agctatgcac tgcataattga ctacgaccta ggcgcaaccc aattaaccag tattaccgct 900
 10 taccaaaaacc gtaatgtgga tcgtgaatat atcggcggta aatggggttga agatcagaac 960
 accttcagtc aggaagtgcg cgctaacacc caattcagtg atgatctttc cgctttggtt 1020
 15 ggcgggtact atgagcatcg aaactttgat gtcagtgccg gtgcgaacaa cgatattgag 1080
 acccaaactt atgccttggt tgggtcaaag acttatgccg tgaccgatag tatcgattta 1140
 accggtgggt tgcgcgcatc acgttttttc tctgaatcag attttggcgg caactcagca 1200
 20 tggaggattg acagctatca atcagataag tccgaaaacg ttatctctcc taaagcggca 1260
 ataggttggc aaattaaccc agattcaaga gtatctgcct cactagccag cggctaccga 1320
 25 cctggcgggt ttagcccggc accacgaagt tctggcgata aaaatggcta ttcaccagaa 1380
 aagtctttca atggtgaatt gggatggcga actaacttag ctgaaaacac ggttcgcttc 1440
 agtggggctc tgtactggat cgacactaaa gatattcagc tctacaccgg aatccaggt 1500
 30 agccaagttc ttagaaacat gggcgatgcc caaagccgag gcattgagct tgatctcgca 1560
 tactacccta ccgacgattt gactctgaca ctgggcgcaa catttgcca gtctacgttc 1620
 35 gaatcgggca atgatgggat tgaaggtaaa aactaccct atgcaccgga tacaacagta 1680
 gtggcaggta tcgaatacta cctaccacaa tcatggctag atggagagtt gtctatcgcc 1740
 accaatgcac gctacacatc taaaatattc tttgacgaaa gcaatactct ggcgcaagac 1800
 40 ggttacacac ttatcgactt agcagttcaa tatgcgatga atgacaacat ctctttccga 1860
 gtgttttagca acaacctaac cgacaaagag tataccacct atgcctacag ctttggtaac 1920
 45 acgcgtttca acaactatgg ttcagaacgc gaggtgggtg tgaatatgaa gctagagtgg 1980
 taa 1983

50 <210> 2
 <211> 660
 <212> PRT
 <213> Photobacterium damsela subsp. piscicida
 <200>
 <221>SOURCE
 55 <222>1..660
 <223> /mol_type="protein"
 /note="[CDS]:1..1980 from SEQ ID NO 1"

ES 2 549 702 B1

<400> 2
 Met Tyr Arg Asn Ser Phe Ser Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala Ile Leu
 1 5 10 15
 5 Ala Ala Thr Leu Ser Pro Val Val Ser Ala Asp Glu His Asn Pro Glu
 20 25 30
 Val Thr Val Met Glu Thr Met Ile Val Glu Ala Thr Lys Gln Asn Ile
 35 40 45
 10 Ser Leu Gln Gln Val Asp Ser Ser Val Leu Ile Lys Thr Gly Lys Glu
 50 55 60
 Leu Glu Lys Ala Gly Ile His Glu Val Lys Asp Leu Glu Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Pro Gly Leu Met Ile Gln Thr Arg Gly Asn Arg Thr Tyr Ala Asn Thr
 85 90 95
 15 Thr Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp Tyr Tyr Ser Pro Thr Val Ser
 100 105 110
 Ile Tyr Val Asp Gly Val Leu Gln Asp Ser Ala Phe Leu Thr Gln Gln
 115 120 125
 20 Leu Leu Asn Val Glu Gln Val Glu Leu Leu Arg Gly Pro Gln Ala Thr
 130 135 140
 Leu Tyr Gly Gly Asn Ser Gln Gly Gly Ile Ile Asn Ile Ile Thr Lys
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Asp Gln Asn Leu Ala Ser Gly Gly Val Thr Tyr Ser Asp
 165 170 175
 25 Arg Ser Lys Gln Leu Asp Ala Ser Ala Ala Val Ala Ile Ser Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ala Asp Ile Ala Ile Arg Ser Leu Lys Asp Glu Gly Asn Ile
 195 200 205
 30 Arg His Ile Pro Ser Asn Thr Asp Asp Ala Asn Asp Ser Lys Asp Phe
 210 215 220
 Ser Gly Thr Ala Arg Phe His Tyr Leu Pro Gln Gln Ser Pro Leu Ala
 225 230 235 240
 Val Thr Phe Ser Val Ser Ser Ala His Leu Asp Ser His Glu Glu Trp
 245 250 255
 35 Tyr Leu Thr Gln Gln Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Thr Ser Gln Asp Ile
 260 265 270
 Pro Glu Leu Lys Arg Val Val Asn Ser Tyr Ala Leu His Ile Asp Tyr
 275 280 285
 40 Asp Leu Gly Ala Thr Gln Leu Thr Ser Ile Thr Ala Tyr Gln Asn Arg
 290 295 300
 Asn Val Asp Arg Glu Tyr Ile Gly Gly Lys Trp Val Glu Asp Gln Asn
 305 310 315 320
 Thr Phe Ser Gln Glu Val Arg Ala Asn Thr Gln Phe Ser Asp Asp Leu
 325 330 335
 45 Ser Ala Leu Val Gly Gly Tyr Tyr Glu His Arg Asn Phe Asp Val Ser
 340 345 350
 Ala Gly Ala Asn Asn Asp Ile Glu Thr Gln Thr Tyr Ala Leu Phe Gly
 355 360 365
 50 Gln Met Thr Tyr Ala Met Thr Asp Ser Ile Asp Leu Thr Gly Gly Leu
 370 375 380
 Arg Ala Ser Arg Phe Phe Ser Glu Ser Asp Phe Gly Gly Asn Ser Ala
 385 390 395 400
 Trp Arg Ile Asp Ser Tyr Gln Ser Asp Lys Ser Glu Asn Val Ile Ser
 405 410 415
 55 Pro Lys Ala Ala Ile Gly Trp Gln Ile Asn Pro Asp Ser Arg Val Phe
 420 425 430
 Ala Ser Leu Ala Ser Gly Tyr Arg Pro Gly Gly Phe Ser Pro Ala Pro

ES 2 549 702 B1

435 440 445
 Arg Ser Ser Gly Asp Lys Asn Gly Tyr Ser Pro Glu Lys Ser Phe Asn
 450 455 460
 5 Gly Glu Leu Gly Trp Arg Thr Asn Leu Ala Glu Asn Thr Val Arg Phe
 465 470 475 480
 Ser Gly Ala Leu Tyr Trp Ile Asp Thr Lys Asp Ile Gln Leu Tyr Thr
 485 490 495
 Gly Asn Pro Gly Ser Gln Val Leu Arg Asn Met Gly Asp Ala Gln Ser
 500 505 510
 10 Arg Gly Ile Glu Leu Asp Leu Ala Tyr Tyr Pro Thr Asp Asp Leu Thr
 515 520 525
 Leu Thr Leu Gly Ala Thr Phe Gly Gln Ser Thr Phe Glu Ser Gly Asn
 530 535 540
 15 Asp Gly Ile Glu Gly Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Pro Asp Thr Thr Val
 545 550 555 560
 Val Ala Gly Ile Glu Tyr Tyr Leu Pro Gln Ser Trp Leu Asp Gly Glu
 565 570 575
 Leu Ser Ile Ala Thr Asn Ala Arg Tyr Thr Ser Lys Ile Phe Phe Asp
 580 585 590
 20 Glu Ser Asn Thr Leu Ala Gln Asp Gly Tyr Thr Leu Ile Asp Leu Ala
 595 600 605
 Val Gln Tyr Ala Met Asn Asp Asn Ile Ser Phe Arg Val Phe Ser Asn
 610 615 620
 25 Asn Leu Thr Asp Lys Glu Tyr Thr Thr Tyr Ala Tyr Ser Phe Gly Asn
 625 630 635 640
 Thr Arg Phe Asn Asn Tyr Gly Ser Glu Arg Glu Val Gly Val Asn Met
 645 650 655
 Lys Leu Glu Trp
 660

30

<210> 3
 <211> 2001
 <212> DNA
 35 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..2001
 40 <223> /mol_type="DNA"
 /note=" FrpA recombinant gene pelB-10His-FrpA"
 /organism="Artificial Sequence"

<220>
 45 <221> CDS
 <222> 1..1998
 <223> /transl_table=2

50 /translation="MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAHHHHHHHHHHDEHNPEVTVMETMIVEATKQNI
 SLQQVDSSVLIKTGKELEKAGIHEVKDLEKAFPLMIQTRGNRTYANTTIRGVSSPDYYSPTVSIYVD
 GVLQDSAFLLTQQLLNVEQVELLRGPQATLYGGNSQGGIINIITKKATDQNLASGGVTYSRQKLDAS
 AAVAISDSTYADIAIRSLKDEGNIRHIPSNTDDANDSKDFSGTARFHYLPQQSPLAVTFVSSAHLDS
 HEEWYLTQQEYDKRATSQDIPELKRVVNSYALHIDYDLGATQLTSITAYQNRNVDREYIGGKVEDQN
 TFSQEVRRANTQFSDDLALVGGYYEHRNFDVSAGANNDIETQTYALFGQMTYAMTDSIDLTTGGLRASR
 55 FFSESDFFGGNSAWRIDSYQSDKSENVISPKAAIGWQINPDSRVFASLASGYRPGGFSPAPRSSGDKNG
 YSPEKSFNGELGWRNLAENTVRFSGALYWIDTKDIQLYTGNGPSQVLRNMGDAQSRGIELDLAYYPT
 DDLTLTLGATFGQSTFESGNDGIEGKTLPYAPDPTTVVAGIEYYLPQSWLDGELSIAATNARYTSKIFFD

ES 2 549 702 B1

ESNTLAQDGYTLIDLAVQYAMNDNISFRVFSNNLTDKEYTTYAYSFGNTRFNNGSEREVGVNMKLEW"

<400> 3

5	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg	60
	atggcccatc accatcacca ccaccatcat catcatgatg aacataatcc agaagttacg	120
	gttatggaaa ccatgattgt cgaagcaacc aagcagaaca tttcattaca acaggttgat	180
10	agctcagtgc tcatcaaaac aggaaaagag cttgagaaaag caggaatcca tgaagttaag	240
	gacttagaaa aagccttccc tggcctaata attcaaaccg gaggtaaccg tacgtatgcc	300
15	aacaccacta tacgtggcgt gagttcacct gattactatt ctctaccgt cagcatctat	360
	gtcgatggtg tattgcaaga cagtgcattt ctaaccgagc agttactcaa cgtagaacag	420
	gtagagctgc ttcgagggcc gcaagctacg ctatatggtg gcaattotca gggaggtatc	480
20	atcaatatca tcaccaagaa ggcgactgat caaaacctag cgtctgggtg tgtcacttac	540
	agcgatcgaa gcaaacaact tgatgcttca gcggcagttg cgataagcga ttcaacttac	600
25	gctgatatag cgattcgatc attaaaagac gaaggtaata ttcgtcacat tcctagcaac	660
	accgatgacg ctaacgacag taaagacttt agcggtagac ctcgattcca ctatctacct	720
	cagcagtccc ctctcgctgt gacgttttct gtctcttctg cacatctaga tagccatgaa	780
30	gagtggattt tgaccaaca agaatatgat aagcgagcca ccagccaaga catacctgaa	840
	cttaagcgcg tcgtcaatag ctatgcactg catattgact acgacctagg cgcaacccaa	900
35	ttaaccagta ttaccgctta caaaaccgt aatgtggatc gtgaatatat cggcggtaaa	960
	tgggttgaag atcagaacac cttcagtcag gaagtgcgcg ctaacaccca attcagtgat	1020
	gatctttccg ctttggttgg cgggtactat gagcatcgaa actttgatgt cagtgcgggt	1080
40	gcgaacaacg atattgagac caaacttat gccttgtttg gtcaaatgac ttatgccatg	1140
	accgatagta tcgatttaac cgggtgggttgc gcgcacatcac gttttttctc tgaatcagat	1200
45	tttggcggca actcagcatg gaggattgac agctatcaat cagataagtc cgaaaacggt	1260
	atctctccta aagcggcaat aggttggcaa attaaccag attcaagagt atttgcctca	1320
	ctagccagcg gctaccgacc tggcggtttt agcccggcac cacgaagttc tggcgataaa	1380
50	aatggctatt caccagaaaa gtctttcaat ggtgaattgg gatggcgaac taacttagct	1440
	gaaaacacgg ttcgcttcag tggggctctg tactggatcg aactaaaga tattcagctc	1500
55	tacaccggaa atccaggtag ccaagttctt agaaacatgg gcgatgccca aagccgaggc	1560
	attgagcttg atctcgcata ctaccctacc gacgatttga ctctgacact gggcgcaaca	1620

ES 2 549 702 B1

```

tttggccagt ctacgttcga atcgggcaat gatgggattg aaggtaaac actaccctat 1680
gcaccggata caacagtagt ggcaggtatc gaatactacc taccacaatc atggctagat 1740
5 ggagagttgt ctatcgccac caatgcacgc tacacatcta aaatattctt tgacgaaagc 1800
aatactctgg cgcaagacgg ttacacactt atcgacttag cagttcaata tgcgatgaat 1860
gacaacatct ctttccgagt gtttagcaac aacctaacg acaaagagta taccacctat 1920
10 gcctacagct ttggtaacac gcgtttcaac aactatgggt cagaacgcga ggtgggtgtg 1980
aatatgaagc tagagtggta a 2001

15 <210> 4
    <211> 666
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

20 <220>
    <221> SOURCE
    <222> 1..666
    <223> /mol_type="protein"
        /note="FrpA recombinant protein pelB-10His-FrpA"
25     /organism="Artificial Sequence"

<400> 4
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
30 1          5          10          15
Ala Gln Pro Ala Met Ala His His His His His His His His His His
   20          25          30
Asp Glu His Asn Pro Glu Val Thr Val Met Glu Thr Met Ile Val Glu
   35          40          45
35 Ala Thr Lys Gln Asn Ile Ser Leu Gln Gln Val Asp Ser Ser Val Leu
   50          55          60
Ile Lys Thr Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ala Gly Ile His Glu Val Lys
   65          70          75          80
Asp Leu Glu Lys Ala Phe Pro Gly Leu Met Ile Gln Thr Arg Gly Asn
40          85          90          95
Arg Thr Tyr Ala Asn Thr Thr Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp Tyr
   100          105          110
Tyr Ser Pro Thr Val Ser Ile Tyr Val Asp Gly Val Leu Gln Asp Ser
   115          120          125
45 Ala Phe Leu Thr Gln Gln Leu Leu Asn Val Glu Gln Val Glu Leu Leu
   130          135          140
Arg Gly Pro Gln Ala Thr Leu Tyr Gly Gly Asn Ser Gln Gly Gly Ile
   145          150          155          160
Ile Asn Ile Ile Thr Lys Lys Ala Thr Asp Gln Asn Leu Ala Ser Gly
50          165          170          175
Gly Val Thr Tyr Ser Asp Arg Ser Lys Gln Leu Asp Ala Ser Ala Ala
   180          185          190
Val Ala Ile Ser Asp Ser Thr Tyr Ala Asp Ile Ala Ile Arg Ser Leu
   195          200          205
55 Lys Asp Glu Gly Asn Ile Arg His Ile Pro Ser Asn Thr Asp Asp Ala
   210          215          220
Asn Asp Ser Lys Asp Phe Ser Gly Thr Ala Arg Phe His Tyr Leu Pro

```

ES 2 549 702 B1

	225					230					235					240
	Gln	Gln	Ser	Pro	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Ala	His	Leu
					245					250					255	
5	Asp	Ser	His	Glu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gln	Gln	Glu	Tyr	Asp	Lys	Arg
				260					265					270		
	Ala	Thr	Ser	Gln	Asp	Ile	Pro	Glu	Leu	Lys	Arg	Val	Val	Asn	Ser	Tyr
			275					280					285			
	Ala	Leu	His	Ile	Asp	Tyr	Asp	Leu	Gly	Ala	Thr	Gln	Leu	Thr	Ser	Ile
		290					295					300				
10	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Arg	Asn	Val	Asp	Arg	Glu	Tyr	Ile	Gly	Gly	Lys
	305					310						315				320
	Trp	Val	Glu	Asp	Gln	Asn	Thr	Phe	Ser	Gln	Glu	Val	Arg	Ala	Asn	Thr
					325					330					335	
15	Gln	Phe	Ser	Asp	Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Glu	His
				340					345					350		
	Arg	Asn	Phe	Asp	Val	Ser	Ala	Gly	Ala	Asn	Asn	Asp	Ile	Glu	Thr	Gln
			355					360					365			
	Thr	Tyr	Ala	Leu	Phe	Gly	Gln	Met	Thr	Tyr	Ala	Met	Thr	Asp	Ser	Ile
		370					375					380				
20	Asp	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Arg	Ala	Ser	Arg	Phe	Phe	Ser	Glu	Ser	Asp
	385					390					395					400
	Phe	Gly	Gly	Asn	Ser	Ala	Trp	Arg	Ile	Asp	Ser	Tyr	Gln	Ser	Asp	Lys
				405						410					415	
25	Ser	Glu	Asn	Val	Ile	Ser	Pro	Lys	Ala	Ala	Ile	Gly	Trp	Gln	Ile	Asn
				420					425					430		
	Pro	Asp	Ser	Arg	Val	Phe	Ala	Ser	Leu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Arg	Pro	Gly
			435				440						445			
	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Ser	Ser	Gly	Asp	Lys	Asn	Gly	Tyr	Ser
		450					455					460				
30	Pro	Glu	Lys	Ser	Phe	Asn	Gly	Glu	Leu	Gly	Trp	Arg	Thr	Asn	Leu	Ala
	465					470					475					480
	Glu	Asn	Thr	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ala	Leu	Tyr	Trp	Ile	Asp	Thr	Lys
					485					490					495	
35	Asp	Ile	Gln	Leu	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Gly	Ser	Gln	Val	Leu	Arg	Asn
				500					505					510		
	Met	Gly	Asp	Ala	Gln	Ser	Arg	Gly	Ile	Glu	Leu	Asp	Leu	Ala	Tyr	Tyr
			515					520					525			
	Pro	Thr	Asp	Asp	Leu	Thr	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala	Thr	Phe	Gly	Gln	Ser
		530					535						540			
40	Thr	Phe	Glu	Ser	Gly	Asn	Asp	Gly	Ile	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Tyr
	545					550						555				560
	Ala	Pro	Asp	Thr	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Ile	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Gln
						565					570				575	
45	Ser	Trp	Leu	Asp	Gly	Glu	Leu	Ser	Ile	Ala	Thr	Asn	Ala	Arg	Tyr	Thr
				580					585					590		
	Ser	Lys	Ile	Phe	Phe	Asp	Glu	Ser	Asn	Thr	Leu	Ala	Gln	Asp	Gly	Tyr
			595					600					605			
	Thr	Leu	Ile	Asp	Leu	Ala	Val	Gln	Tyr	Ala	Met	Asn	Asp	Asn	Ile	Ser
		610					615						620			
50	Phe	Arg	Val	Phe	Ser	Asn	Asn	Leu	Thr	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Thr	Tyr
	625					630						635				640
	Ala	Tyr	Ser	Phe	Gly	Asn	Thr	Arg	Phe	Asn	Asn	Tyr	Gly	Ser	Glu	Arg
					645					650					655	
55	Glu	Val	Gly	Val	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Trp						
				660					665							

<210> 5

ES 2 549 702 B1

```

<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
  <221> SOURCE
  <222>1..62
  <223> /mol_type="DNA"
      /note="Fwd-frpA-pBAD"
10      /organism="Artificial Sequence"

  <400> 5
  cccgtttttt tgggctaaca ggaggaatta accatgtaca ggaacagttt ctcgctctct      60

15 cc                                                                                      62

  <210> 6
  <211> 55
20 <212> DNA
  <213> Artificial Sequence

  <220>
  <221> SOURCE
25 <222>1..55
  <223> /mol_type="DNA"
      /note="Rev-frpA-pBAD"
      /organism="Artificial Sequence"

30

  <400> 6
  cgaattccaa tgacaactcc gtcttcctta ccaactctagc ttcattattca caccc      55

  <210> 7
35 <211> 88
  <212> DNA
  <213> Artificial Sequence

  <220>
40 <221> SOURCE
  <222>1..88
  <223> /mol_type="DNA"
      /note="F-pBAD-pelB"
      /organism="Artificial Sequence"

45

  <400> 7
  gggctaacag gaggaattaa ccatgaaata cctgctgccg accgctgctg ctggtctgct      60

50 gctcctcgct gccagccgg cgatggcc                                                                 88

  <210> 8
  <211> 76
  <212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

  <220>

```

ES 2 549 702 B1

```
<221> SOURCE
<222>1..76
<223> /mol_type="DNA"
      /note="pelB-His-FrpA-R"
5     /organism="Artificial Sequence"
<400> 8
ccgtaacttc tggattatgt tcatcatgat gatgatggtg gtggtgatgg tgatgggcca      60
tcgccggctg ggcagc                                                                76
10
```



- ②① N.º solicitud: 201531020
②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	OSORIO, C.R. et al., 'A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen Photobacterium damsela subsp. piscicida is structurally and functionally related to the Yersinia high-pathogenicity island', MICROBIOLOGY, 2006, Vol. 152, No 11, Págs 3327- 3341, ISSN: 1350-0872, Materiales y Métodos, Resultados, Figura 1, Tabla 2.	1-5, 20-23
Y	Tabla 2	6-19, 24, 25
X	Base de Datos GENBANK [on line], 31.10.2006 [recuperado el 06.10.2015], "Photobacterium damsela subsp. piscicida siderophore biosynthesis and transport gene cluster", Recuperado de GENBANK en NCBI ('The National Center for Biotechnology Information'): Código de acceso (ID): AJ699306.2	1-5, 20-23
X	Base de Datos GENBANK [on line], 31.10.2006 [recuperado el 06.10.2015], "outer membrane ferrisiderophore receptor [Photobacterium damsela subsp. piscicida]", Recuperado de GENBANK en NCBI ('The National Center for Biotechnology Information'): Código de acceso (ID): CAG27872.1	1-5, 20-23

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
20.10.2015

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/7



- ②① N.º solicitud: 201531020
②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	OSORIO, C.R. et al., 'A Transmissible Plasmid-Borne Pathogenicity Island Confers Piscibactin Biosynthesis in the Fish Pathogen Photobacterium damsela subsp. Piscicida' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2015 Sep 1, Vol. 81, No. 17, Págs 5867-5879, ISSN: 1098-5336 (Electronic), doi: 10.1128/AEM.01580-15, Epub: 19-06-2015, Resultados, Figuras 1-3.	1-5, 20-23
X	BALADO, M. et al., 'Genetic characterization of pPHDP60, a novel conjugative plasmid from the marine fish pathogen Photobacterium damsela subsp. Piscicida', PLASMID, 2013, Vol. 70, No. 1, Págs. 154-159, ISSN: 0147-619X (print), ISSN: 1095-9890 (electronic), doi: 10.1016/j.plasmid.2013.02.004, Figuras 1-2.	1-5, 20-23
Y	HU, Y.H. et al., 'A TonB-dependent outer membrane receptor of Pseudomonas fluorescens: virulence and vaccine potential', ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, 2012, Vol.194, No. 9, Págs.795-802, ISSN: 0302-8933(print), ISSN: 1432-072X(electronic), doi: 10.1007/s00203-012-0812-3, Resultados.	6-19, 24, 25

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
20.10.2015

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/7



21 N.º solicitud: 201531020

22 Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.2015

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	BRUMBAUGH, A.R. et al., 'Immunization with the yersiniabactin receptor, FyuA, protects against pyelonephritis in a murine model of urinary tract infection', INFECTION AND IMMUNITY, 2013, Vol. 81, No. 9, Págs 3309-3316, ISSN: 1098-5522 (Electronic), doi: 10.1128/IAI.00470-13, Resultados.	6-19, 24, 25
A	WO 2005014629 A2 (NOVARTIS AG.) 17-02-2005, todo el documento.	1-25
A	KATO, G. et al., 'Protective efficacy and immune responses induced by a DNA vaccine encoding codon-optimized PPA1 against Photobacterium damsela subsp. Piscicida in Japanese flounder', VACCINE, 2015 Feb, Vol. 33, No. 8, Págs 1040-1045, ISSN: 0264-410X (print), ISSN: 1873-2518 (electronic), doi: 10.1016/j.vaccine.2015.01.011. Epub: 14-01-2015, todo el documento.	1-25
A	ANDREONI, F. et al., 'Isolation of a novel gene from Photobacterium damsela subsp. piscicida and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate', VACCINE, Vol. 31, No. 5, Págs 820-826, ISSN: 0264-410X (print), ISSN: 1873-2518 (electronic), doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.064, todo el documento.	1-25

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
20.10.2015

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
3/7

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/285 (2006.01)

C12N15/31 (2006.01)

A61K39/102 (2006.01)

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

C07K, C12N, A61K

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.10.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 6-19, 24, 25	SI
	Reivindicaciones 1-5, 20-23	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 6-19, 24, 25	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 se publica.

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	Osorio, C.R. et al., <i>Microbiology</i> , (2006), 152(Pt 11): 3327-41	2006
D02	Base de Datos GENBANK [on line], 31.10.2006 [recuperado el 06.10.2015], "Photobacterium damsela subsp. piscicida siderophore biosynthesis and transport gene cluster", Recuperado de GENBANK en NCBI ('The National Center for Biotechnology Information'): Código de acceso (ID): AJ699306.2	31.10.2006
D03	Base de Datos GENBANK [on line], 31.10.2006 [recuperado el 06.10.2015], "outer membrane ferrisiderophore receptor [Photobacterium damsela subsp. piscicida]", Recuperado de GENBANK en NCBI ('The National Center for Biotechnology Information'): Código de acceso (ID): CAG27872.1	31.10.2006
D04	Osorio, C.R. et al., <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , (2015 Sep), 81(17): 5867-79	19-06-2015
D05	Balado, M. et al., <i>Plasmid</i> , (2013), 70(1): 154-9.	2013
D06	Hu, Y.H. et al., <i>Arch. Microbiol.</i> , (2012), 194(9):795-802.	2012
D07	Brumbaugh, A.R. et al., <i>Infect. Immun.</i> , (2013), 81(9): 3309-16.	2013
D08	WO 2005014629 A2 (NOVARTIS AG.)	17.02.2005
D09	Kato, G. et al., <i>Vaccine</i> , (2015 Feb), 33(8): 1040-5.	2015 Feb
D10	Andreoni, F. et al., <i>Vaccine</i> , (2013), 31(5): 820-6.	2013

En D01-D05 se describen el conjunto de genes implicados en la biosíntesis y el transporte del sideróforo piscibactina de *Photobacterium damsela subsp piscicida* (PhDP).

En D06-D07 se describen receptores de membrana externa específicos de sideróforos.

En D08-D10 se divulgan vacunas contra el patógeno PhDP.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicaciones independientes 1 y 2.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en una molécula de ácido nucleico caracterizada por la secuencia SEQ ID NO: 1 o con, al menos, un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 que codifica la proteína FrpA (SEQ ID NO: 2) de *Photobacterium damsela subsp piscicida* (PhDP) o un polipéptido con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2 y con las propiedades antigénicas de FrpA. El objeto de la reivindicación 2 consiste en una molécula peptídica caracterizada por la secuencia SEQ ID NO: 2 (Proteína; FrpA), o la secuencia SEQ ID NO: 4 (Proteína recombinante rFrpA), o una secuencia con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2 y con las propiedades antigénicas de FrpA.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D05, se ha descrito y secuenciado la región del ADN de PhDP que contiene los genes implicados en la biosíntesis y el transporte del sideróforo piscibactina. En particular, se ha determinado la secuencia del gen *frpA* y de la proteína codifica FrpA de 660 aminoácidos que constituye el receptor de membrana externa de la ferri-piscibactina (cf. D01: Resultados, Figura 1, Tabla 2. D02: Secuencia del gen *frpA* de PhDP. D03: Secuencia de la proteína FrpA de PhDP. D04: Resultados, Figuras 1-3. D05: Figuras 1-2).

Por consiguiente, se considera que el objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 2, y el de las dependientes 3-5, 20-23 no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D01-D05.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-5, 20-23 no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.

2.1. Reivindicación independiente 6.

2.1.1. El objeto de la reivindicación 6 consiste en una composición inmunogénica caracterizada por que comprende, al menos, una de las moléculas de ácido nucleico o proteína definidas en las reivindicaciones 1-3, así como vectores, células u organismos que contengan a dichas moléculas.

El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 6 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de una nueva composición inmunogénica.

En los documentos D01-D05, mencionados anteriormente, se divulgan las secuencias del gen *frpA* y de la proteína FrpA, un receptor de membrana externa, que constituye el sistema del transporte de la ferri-piscibactina. Por consiguiente, el carácter inventivo de la composición reivindicada podría radicar en la utilización de receptores de membrana específicos de sideróforos por sus propiedades inmunogénicas. Sin embargo, en el estado de la técnica ya se ha descrito la utilización de dichos receptores para la elaboración de vacunas (cf. D06-D07). En particular, los receptores de quinolobactina de *Pseudomonas fluorescens* y de yersiniabactina, FyuA, de *Yersinia enterocolitica* cuyas secuencias presentan homología significativa con FrpA (cf. D01: Tabla 2).

Por consiguiente, se considera que las soluciones propuestas en las reivindicaciones 6, y en la 7-19, 24, 25 no son inventivas, pues se estima que, ante el problema técnico planteado en dichas reivindicaciones, el experto en la materia combinaría las enseñanzas divulgadas en D01 con las de D06-D07 llegando a la solución propuesta o a una equivalente.

2.2. La presente invención no satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en la reivindicación 6-19, 24 25, pues no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.