

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 925**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2017** E 17191212 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** EP 3318636

54 Título: **ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones**

30 Prioridad:

**02.11.2016 TW 105135598**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.12.2019**

73 Titular/es:

**NATIONAL PINGTUNG UNIVERSITY OF SCIENCE  
AND TECHNOLOGY (100.0%)  
1, Hseuh Fu Road Neipu Hsiang  
Pingtung County 91201, TW**

72 Inventor/es:

**CHENG, WEN-TENG;  
CHANG, CHIN-CHYUAN y  
 TSAI, WAN-LIN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 733 925 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones

## 5 Antecedentes de la invención

## 1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a un ARN de doble cadena y, más particularmente, a un ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones.

## 2. Descripción de la técnica relacionada

15 Hoy en día, el cultivo de camarón está en auge en Taiwán. Los camarones de cultivo no solo pueden servir como fuente de alimento, sino que también pueden exportarse a países extranjeros para obtener beneficios económicos. Para reducir el coste, los camarones de cultivo generalmente se cultivan a densidades altas.

20 El cultivo a densidades altas puede deteriorar el entorno de la granja; y, por lo tanto, los camarones de cultivo tienen una mayor mortalidad debido a la infección cruzada. Si bien la adición de antibióticos puede reducir la mortalidad, el abuso de los antibióticos es la causa que desencadena reacciones alérgicas así como la causa de la resistencia a los medicamentos. RATCH- ANEEGORN MAPANAO ET AL. (2016) divulga la clonación preliminar y la caracterización de la tirosina hidroxilasa del camarón patiblanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* y el aumento de su expresión en respuesta a la exposición a patógenos y al estrés hipotérmico. Concluye diciendo que "se necesita más investigación para aclarar los mecanismos moleculares de la síntesis de catecolaminas en hemocitos de *L. vannamei*". CHENG WINTON Y AL. (2016) divulgan el efecto del silenciamiento génico por 3 ARNdc dirigidos al gen DBH en *L. vannamei*, lo que tiene como resultado una disminución de la síntesis de norepinefrina (NE) a partir de dopamina (DA) que podría hacer que los camarones sean más susceptibles a los patógenos.

30 A la luz de esto, es necesario proporcionar un ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en los camarones.

## Sumario de la invención

35 Por consiguiente, el objetivo de esta invención es proporcionar un ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones.

Una realización de la invención divulga un ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones, que es un ARN de doble cadena específico de tirosina hidroxilasa.

40 En la forma preferida que se muestra, el ARN de doble cadena tiene unas secuencias de ADN establecidas como SEQ ID NO: 1 y 2, o unas secuencias de ADN establecidas como SEQ ID NO: 3 y 4, o unas secuencias de ADN establecidas como SEQ ID NO: 5 y 6.

45 En una forma preferida que se muestra, el ARN de doble cadena se administra al cuerpo del camarón para mejorar la inmunidad del cuerpo del camarón. A modo de ejemplo, el ARN de doble cadena se administra al cuerpo del camarón por inyección, preferentemente por inyección en el seno ventral del cefalotórax.

50 En una forma preferida que se muestra, el cuerpo del camarón es de  $11,63 \pm 2,1$  g, y el ARN de doble cadena se administra al cuerpo de camarón en una dosis de 1-6  $\mu\text{g/g}$  del cuerpo de camarón, preferentemente en una dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  del cuerpo del camarón.

## Breve descripción de los dibujos

55 La presente invención se entenderá de manera más completa a partir de la descripción detallada que se proporciona a continuación y de los dibujos adjuntos que se proporcionan solo a modo de ilustración y, por lo tanto, no son limitativos de la presente invención, y en donde:

La FIG. 1a representa la actividad tirosina hidroxilasa de los camarones blancos de los grupos A1-A4 en el ensayo (A).

La FIG. 1b representa el nivel de dopamina de los camarones blancos de los grupos A1-A4 en el ensayo (A).

60 La FIG. 1c representa el nivel de norepinefrina de los camarones blancos de los grupos A1-A4 en el ensayo (A).

La FIG. 2a representa el recuento total de hemocitos de los camarones blancos de los grupos B1-B4 en el ensayo (B).

La FIG. 2b representa la actividad fenoloxidasa de los camarones blancos de los grupos B1-B4 en el ensayo (B).

La FIG. 3a representa la actividad fagocítica de los camarones blancos de los grupos C1-C4 en el ensayo (C).

65 La FIG. 3b representa la eficiencia de aclaramiento de los camarones blancos de los grupos C1-C4 en el ensayo (C).

La FIG. 4 representa la mortalidad de los camarones blancos de los grupos D0-D4 en el ensayo (D).

En las distintas figuras de las ilustraciones, los mismos números designan las mismas partes o partes similares. Además, cuando se utilizan los términos "primero", "segundo", "tercero" y términos similares a continuación, debe entenderse que estos términos se refieren solo a la estructura que se muestra en los dibujos, tal como se le presentaría a la persona que ve los dibujos, y se utilizan únicamente para facilitar la descripción de la invención.

Descripción detallada de la invención

El camarón de acuerdo con la presente invención se refiere al camarón de cultivo, que incluye, entre otros, camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), langostino tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón Kuruma (*Marsupenaeus japonicus*), camarón blanco chino (*Fenneropenaeus chinensis*), langostino indio (*Fenneropenaeus indicus*), camarón del fango (*Metapenaeus ensis barbata*), camarón de cola roja (*Penaeus penicillatus*) y langostinos gigantes de río (*Macrobrachium rosenbergii*).

El ARN de doble cadena específico de la tirosina hidroxilasa, ARNdc TH para abreviar, de acuerdo con la presente memoria descriptiva, indica el ARN de doble cadena tiene las secuencias de ácido nucleico que corresponden a las secuencias de la tirosina hidroxilasa, de manera que al administrar el ARNdc TH a un cuerpo de camarón, el ARNdc TH es capaz de bloquear la actividad de la tirosina hidroxilasa, lo que puede ser apreciado por una persona con experiencia en la materia. Por ejemplo, el ARNdc TH puede tener, pero no se limita a, las secuencias de ADN establecidas como SEQ ID NO: 1 y 2, las secuencias de ADN establecidas como SEQ ID NO: 3 y 4, o las secuencias de ADN establecidas como SEQ ID NO: 5 y 6.

El ARNdc TH puede usarse para bloquear la actividad de la tirosina hidroxilasa; y, por lo tanto, el ARNdc TH puede administrarse al cuerpo del camarón en una dosis eficaz para mejorar la inmunidad en los camarones.

A modo de ejemplo, el ARNdc TH puede administrarse al cuerpo del camarón mediante inyección, preferiblemente mediante inyección en el seno ventral del cefalotórax. El seno ventral cerca del corazón es el estigma central de la hemolinfa en los camarones, de modo que el ARNdc TH puede fluir hacia los tejidos a lo largo de la hemolinfa. En esta realización, se usa el cuerpo de camarón con un peso de 11,63±2,1 gramos, y la dosis eficaz es de 1-6 µg/g, preferentemente es de 5 µg/g.

Para evaluar si el ARNdc TH muestra un efecto sobre la mejora de la inmunidad en camarones, así como en la disminución de la mortalidad causada por el ataque de patógenos, se realizan los siguientes ensayos.

Ensayo (A)

Se obtienen camarones blancos, *Litopenaeus vannamei*, de una granja comercial en Pingtung, Taiwán. Los camarones blancos se aclimatan en el laboratorio (agua dulce; salinidad 20 ppt; temperatura 27±1 °C; valor de pH 8,2-8,7) durante 2 semanas antes de la experimentación.

Haciendo referencia a la TABLA 1, el ARNdc TH (SEQ ID NO: 1 y 2) se administra a los camarones blancos del grupo A2 mediante inyección, y los ARNdc de control de exposición que no son específicos de la tirosina hidroxilasa se administran a los camarones blancos de los grupos A3 y A4 mediante inyección. La dosis para cada ARNdc es de 5 µg/g. Como control, se utilizan camarones blancos del grupo A1 sin administración de ARNdc. La actividad de la tirosina hidroxilasa se mide 3 días después.

TABLA 1

Grupo	ARN de doble cadena
A1	DEPC-H <sub>2</sub> O
A2	ARNdc específico de la tirosina hidroxilasa (SEQ ID NO: 1 y 2)
A3	ARNdc específico de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (SEQ ID NO: 7 y 8)
A4	ARNdc específico de un gen no específico de gusano (SEQ ID NO: 9 y 10)

Haciendo referencia a la FIG. 1a, la actividad de la tirosina hidroxilasa en los camarones blancos del grupo A2 es significativamente menor que la de los camarones blancos de los grupos A1 y A3-A4.

Además, la tirosina hidroxilasa es conocida como una enzima importante para formar dopamina y epinefrina, y la sobreexpresión tanto de dopamina como de epinefrina puede reducir la inmunidad de los camarones blancos.

Por lo tanto, para demostrar si el ARNdc TH mejora la inmunidad al inhibir tanto la dopamina como la epinefrina, se miden el nivel de dopamina y el nivel de epinefrina de los camarones blancos de los grupos A1-A4. En lo referido a las FIGS. 1b y 1c, no se observan diferencias significativas en los niveles de dopamina y epinefrina entre los camarones blancos de los grupos A1-A4.

## Ensayo (B)

El ARNdc que se muestra en la TABLA 2 se administra a los camarones blancos de los grupos B2-B4 (dosis: 5 µg/g). Después de 3 días, se extrae hemolinfa del seno ventral de cada camarón. Se miden los parámetros inmunitarios, como el recuento total de hemocitos (THC) y la actividad de fenoloxidasa (PO) en los hemocitos, de camarones blancos de los grupos B1-B4.

TABLA 2

Grupo	ARN de doble cadena
B1	DEPC-H <sub>2</sub> O
B2	ARNdc específico de la tirosina hidroxilasa (SEQ ID NO: 1 y 2)
B3	ARNdc específico de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (SEQ ID NO: 7 y 8)
B4	ARNdc específico de un gen no específico de gusano (SEQ ID NO: 9 y 10)

Haciendo referencia a las FIGS. 2a y 2b, los parámetros inmunitarios de los camarones blancos del grupo B2 son más altos en comparación con los de los camarones blancos de los grupos B1 y B3-B4, lo que indica que la administración del ARNdc TH mejora la inmunidad de los camarones blancos.

## Ensayo (C)

El ARNdc que se muestra en la TABLA 3 se administra a camarones blancos de los grupos C2-C4 (dosis: 5 µg/g). Después de 3 días, se usa la suspensión bacteriana de *V. alginolyticus* para poner a prueba a los camarones blancos de los grupos C1-C4 (dosis: 2\*10<sup>5</sup> UFC/camarón) durante 1,5 horas. Se extrae hemolinfa del seno ventral de cada camarón. Para la susceptibilidad de los camarones blancos que recibieron ARNdc TH contra la infección por *V. alginolyticus*, se midieron la actividad fagocítica y la eficacia de aclaramiento de los camarones blancos de los grupos C1-C4.

TABLA 3

Grupo	ARN de doble cadena
C1	DEPC-H <sub>2</sub> O
C2	ARNdc específico de la tirosina hidroxilasa (SEQ ID NO: 1 y 2)
C3	ARNdc específico de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (SEQ ID NO: 7 y 8)
C4	ARNdc específico de un gen no específico de gusano (SEQ ID NO: 9 y 10)

Haciendo referencia a las FIGS. 3a y 3b, la actividad fagocítica y la eficacia de aclaramiento son significativamente mayores en los camarones blancos del grupo C2 que en los camarones blancos de los grupos C1 y C3-C4, lo que indica que la administración del ARNdc TH es útil para reducir el *V. alginolyticus* en la hemolinfa.

## Ensayo (D)

Para la susceptibilidad de los camarones blancos que recibieron ARNdc TH contra la infección por *V. alginolyticus*, se administran los ARNdc que se muestran en la TABLA 4 a los camarones blancos de los grupos D2-D4 (dosis: 5 µg/g). Después de 3 días, se usa la suspensión bacteriana de *V. alginolyticus* para poner a prueba a los camarones blancos de los grupos D1-D4 (dosis: 2\*10<sup>5</sup> UFC/camarón). La mortalidad se registra a las 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas.

TABLA 4

Grupo	<i>V. alginolyticus</i>	ARN de doble cadena
D0	-	depc-h <sub>2</sub> o
D1	+	depc-h <sub>2</sub> o
D2	+	ARNdc específico de la tirosina hidroxilasa (SEQ ID NO: 1 y 2)
D3	+	ARNdc específico de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (SEQ ID NO: 7 y 8)
D4	+	ARNdc específico de un gen no específico de gusano (SEQ ID NO: 9 y 10)

Haciendo referencia a la FIG. 4, 168 horas después de la exposición bacteriana, la mortalidad acumulada de los camarones blancos del grupo D0 es 0, y la mortalidad acumulada de los camarones blancos de los grupos D1, D3-D4 es aproximadamente del 70-80%. Sin embargo, la mortalidad acumulada de los camarones blancos del grupo D2 disminuye (aproximadamente un 50%), lo que indica que la administración del ARNdc TH efectivamente reduce el riesgo de muerte debido a la infección de *V. alginolyticus* en los camarones blancos.

Por consiguiente, al administrar el ARN de doble cadena específico de la tirosina hidroxilasa (ARNdc TH) al cuerpo del camarón, se mejoran parámetros inmunitarios tales como el recuento total de hemocitos y la actividad fenoloxidasa, aumentan la actividad fagocítica y la eficacia de aclaramiento, y se reduce la mortalidad causada por el ataque de

patógenos. Con tal rendimiento, los granjeros pueden disminuir el uso de antibióticos.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Universidad Nacional de Ciencia y Tecnología de Pingtung  
 <120> Método para mejorar la inmunidad en camarones  
 <130> PK14577US  
 10 <150> 105135598  
 <151> 02/11/2016  
 <160> 10  
 15 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNdc LvTH  
 25 <400> 1  
 gcaucacucu ucgaucaaat t 21  
 <210> 2  
 <211> 21  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ARNdc LvTH  
 35 <400> 2  
 uuugaucgaa gagugaugct t 21  
 40 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> ARNdc LvTH  
 <400> 3  
 50 ccaaguucga gagcaccat t 21  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> ARNdc LvTH  
 <400> 4  
 60 auggugcucu cgaacuuggt t 21  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ARNdc LvTH  
  
 5 <400> 5  
 ccaggagauc gagaaguut t 21  
  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> ARNdc LvTH  
  
 15 <400> 6  
 aaacuucucg aucuccuggt t 21  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> ARNdc GAPDH  
  
 25 <400> 7  
 ugaccucaac uacaugguut t 21  
  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> ARNdc GAPDH  
  
 35 <400> 8  
 aaccauguag uugaggucat t 21  
  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> ARNdc de gusano  
  
 <400> 9  
 uucuccgaac gugucacgt t 21  
  
 50 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> ARNdc de gusano  
  
 <400> 10  
 60 acgugacacg uucggagaat t 21

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones, que se caracteriza por que el ARN de doble cadena es un ARN de doble cadena específico de la tirosina hidroxilasa.
2. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el ARN de doble cadena tiene secuencias de ADN establecidas como SEC ID NOS: 1 y 2.
- 10 3. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el ARN de doble cadena tiene secuencias de ADN establecidas como SEC ID NOS: 3 y 4.
4. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el ARN de doble cadena tiene secuencias de ADN establecidas como SEC ID NOS: 5 y 6.
- 15 5. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por que el ARN de doble cadena se administra al cuerpo de camarón para mejorar la inmunidad en el cuerpo de camarón.
- 20 6. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el ARN de doble cadena se administra al cuerpo del camarón mediante inyección.
7. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en los camarones de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el ARN de doble cadena se administra al cuerpo del camarón mediante inyección en el seno ventral del cefalotórax.
- 25 8. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en los camarones de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el cuerpo del camarón es de  $11,63 \pm 2,1$  g.
- 30 9. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el ARN de doble cadena se administra al cuerpo de camarón en una dosis de 1-6  $\mu\text{g/g}$  del cuerpo de camarón.
10. El ARN de doble cadena para mejorar la inmunidad en camarones de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el ARN de doble cadena se administra al cuerpo de camarón en una dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  del cuerpo de camarón.

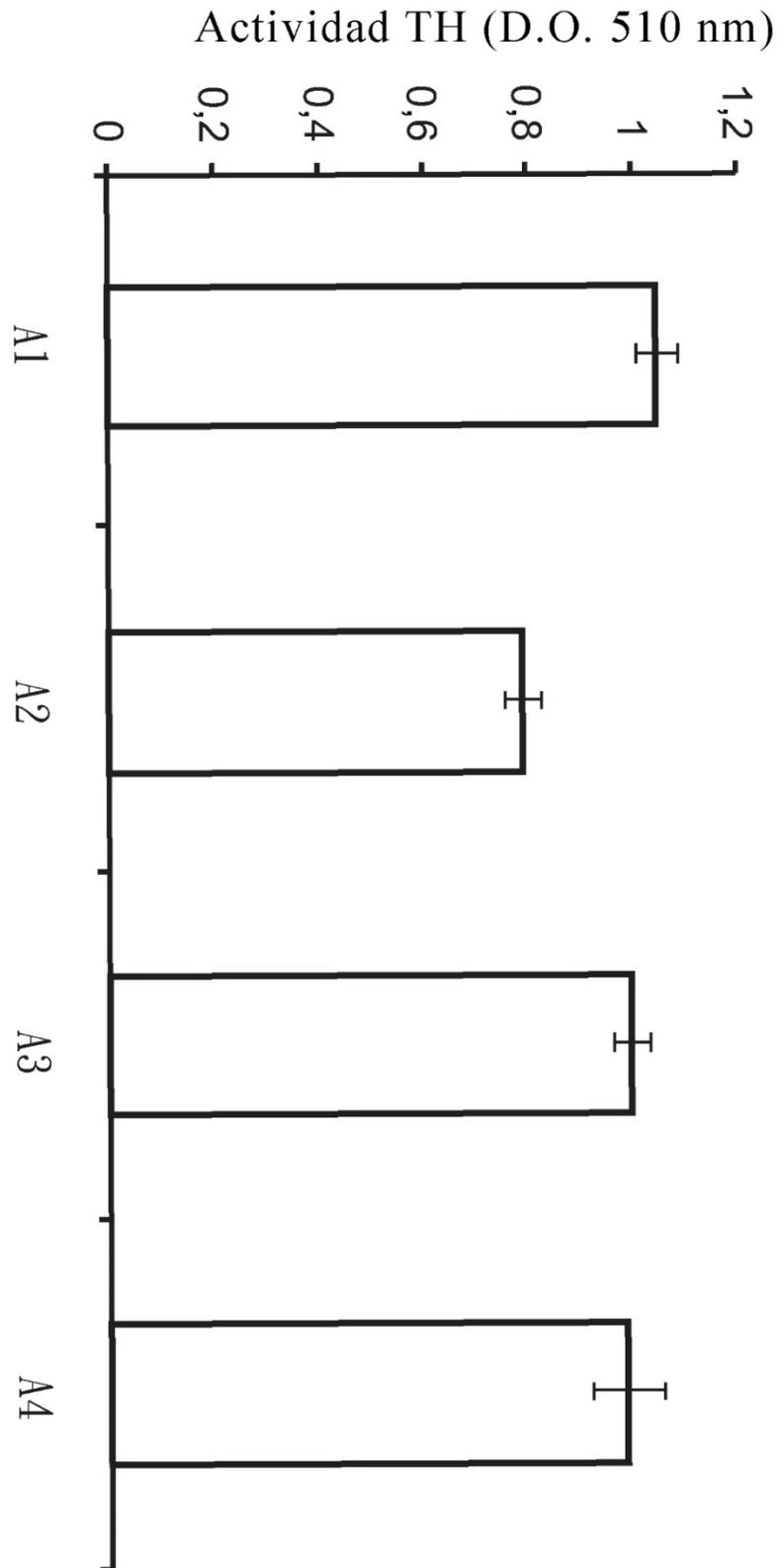


FIG. 1a

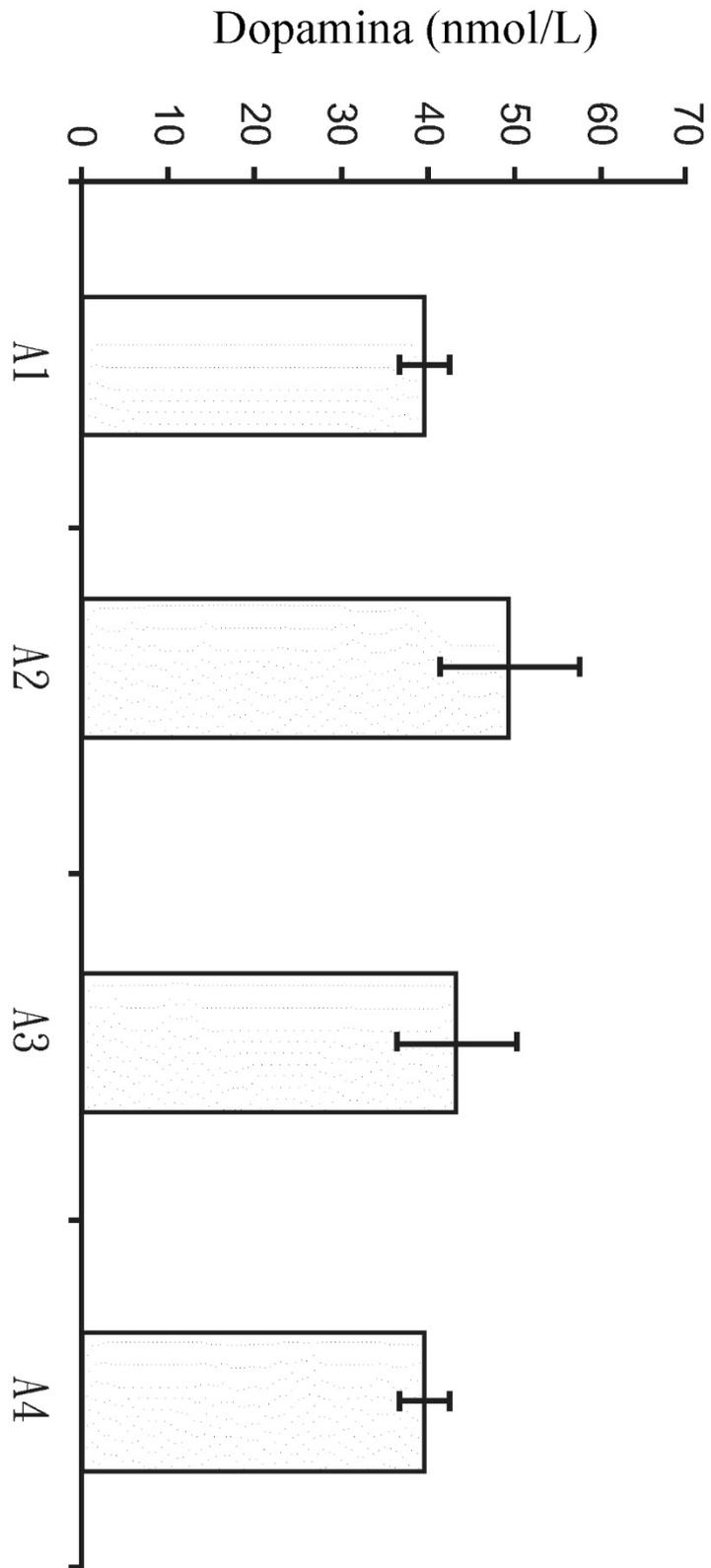


FIG. 1b

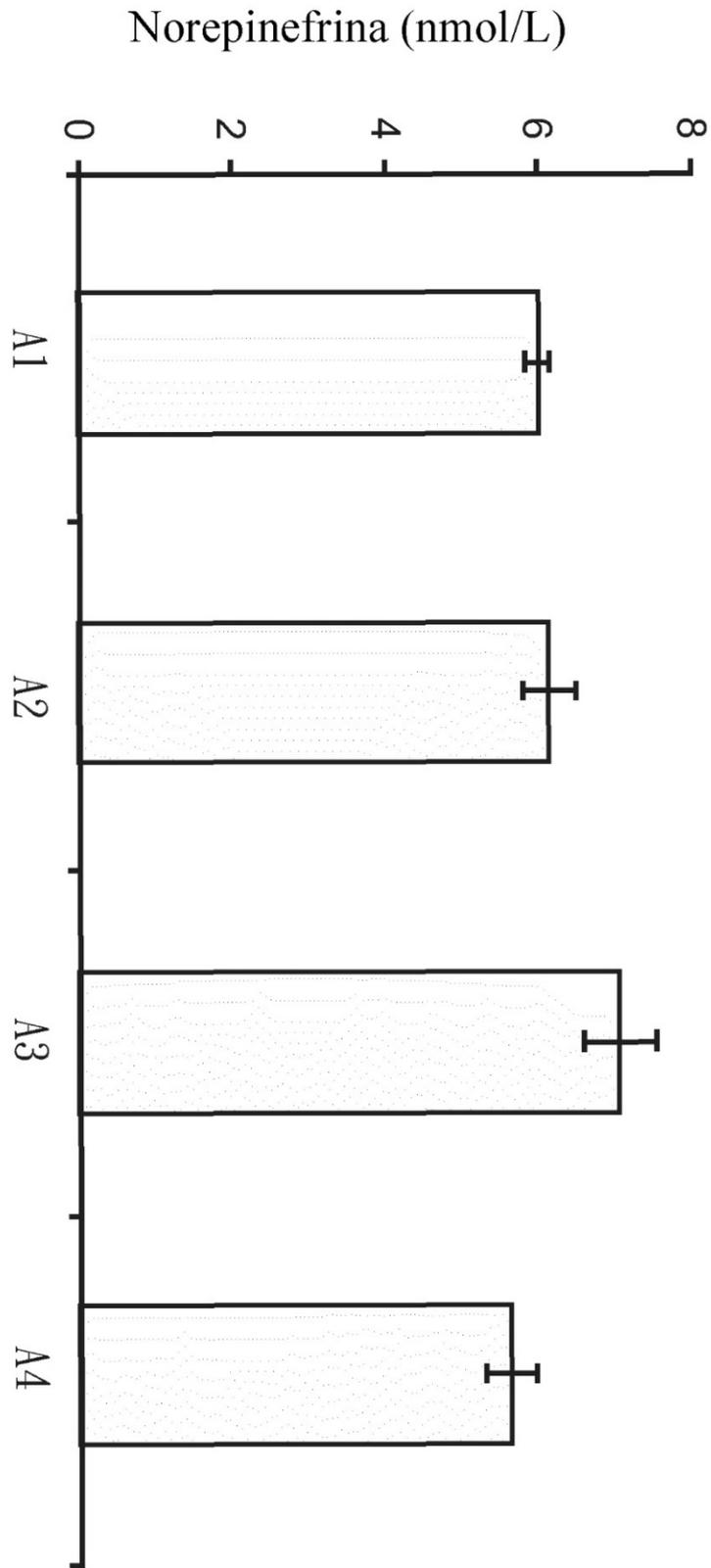


FIG. 1c

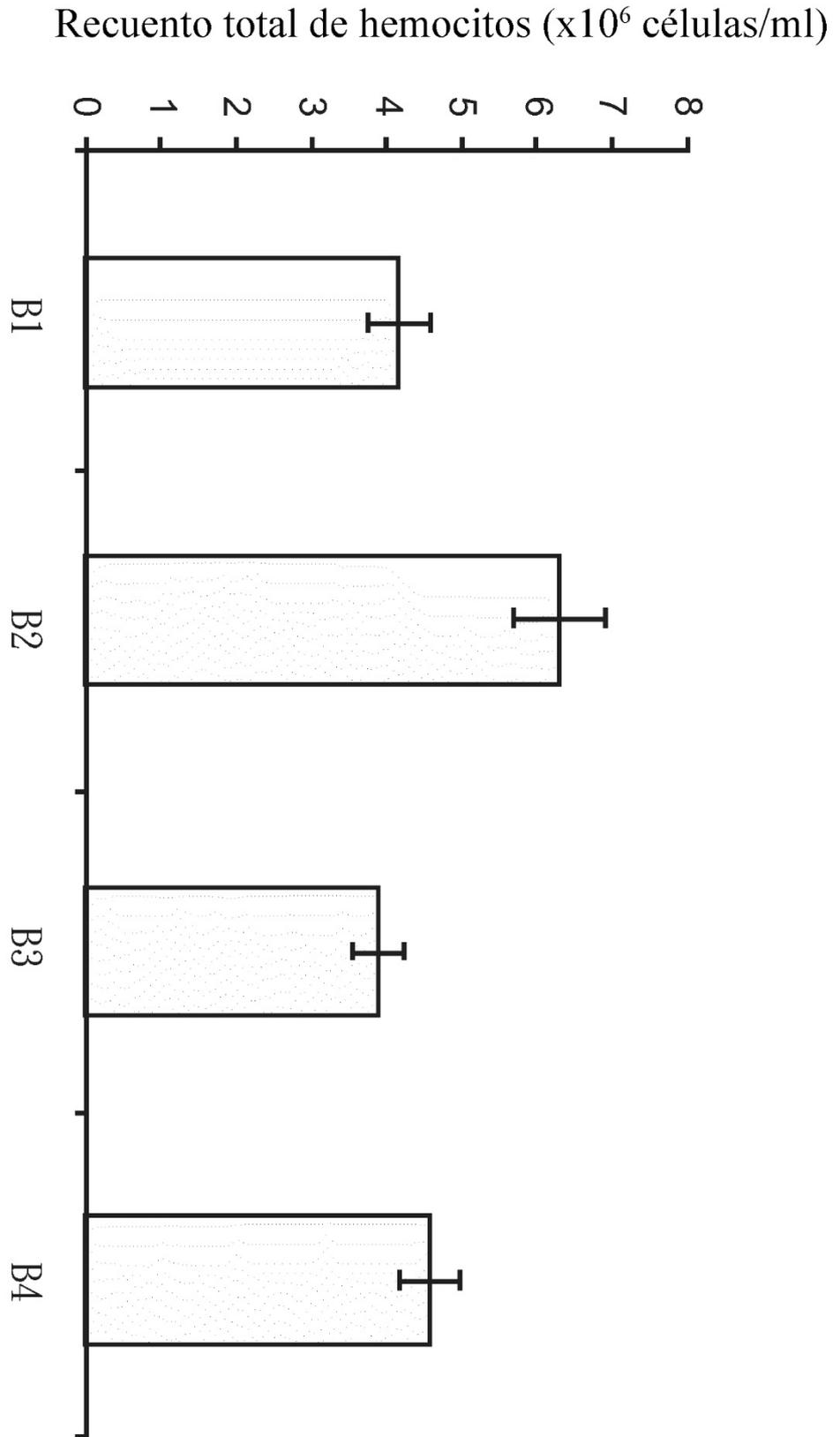


FIG. 2a

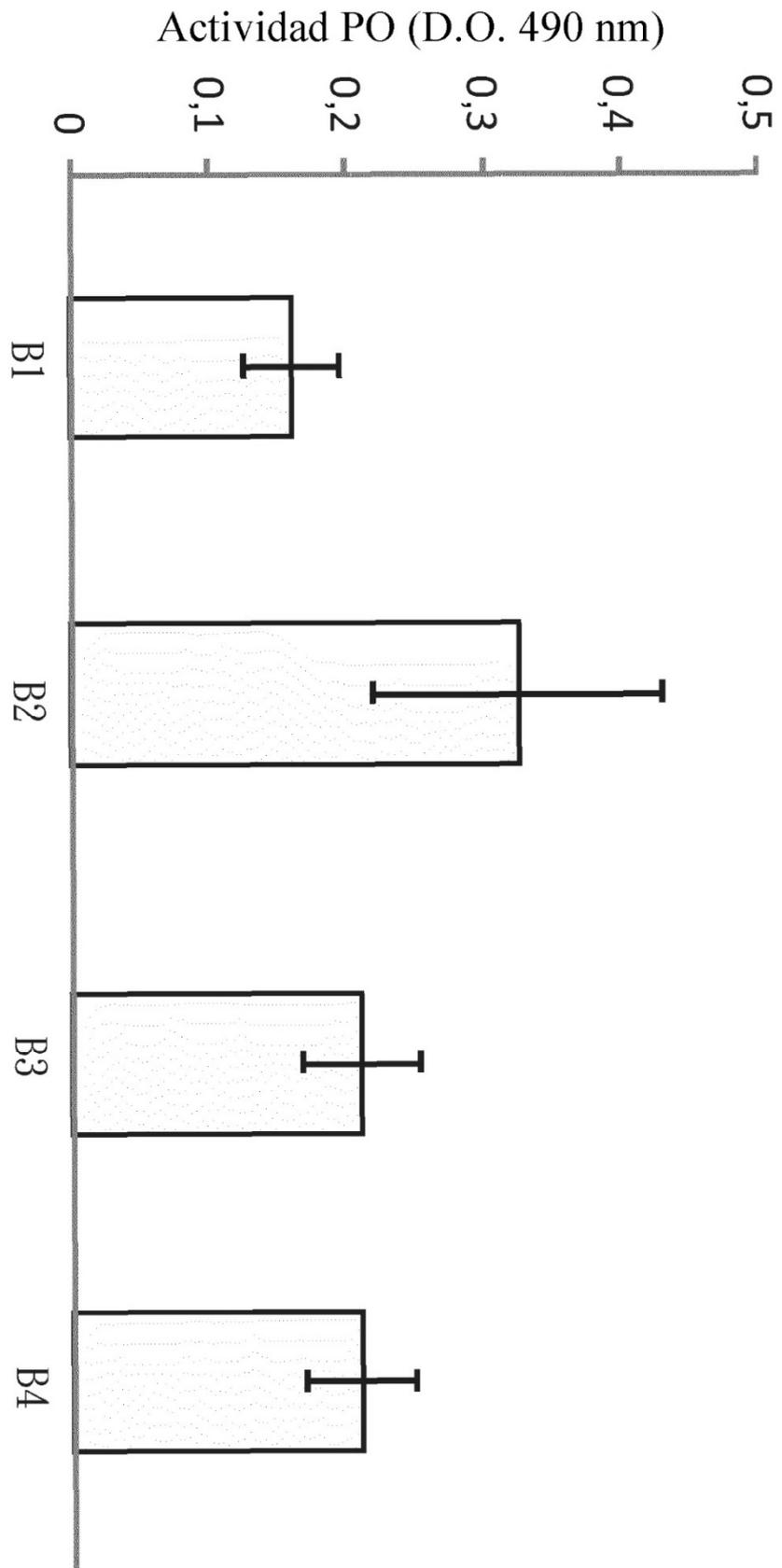


FIG. 2b

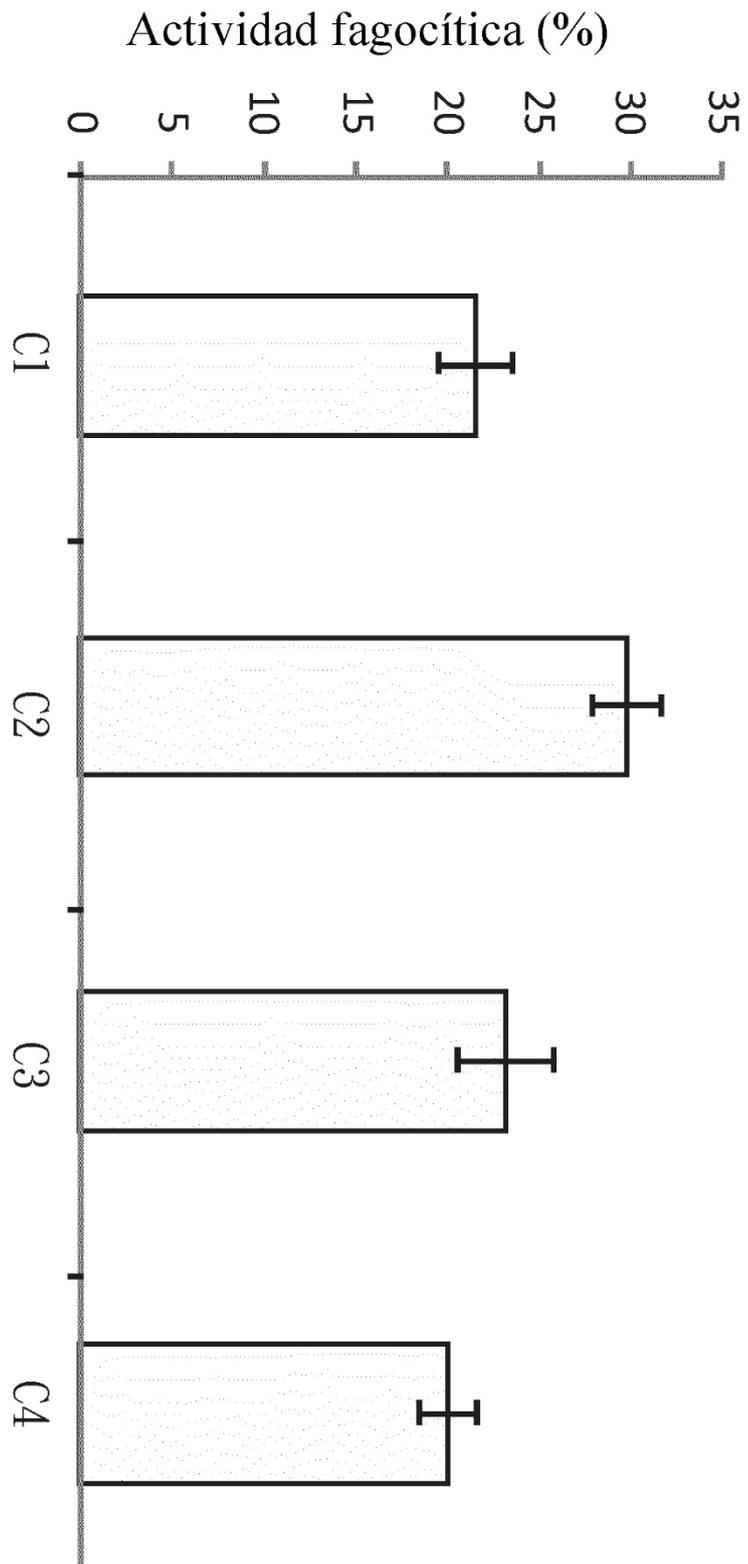


FIG. 3a

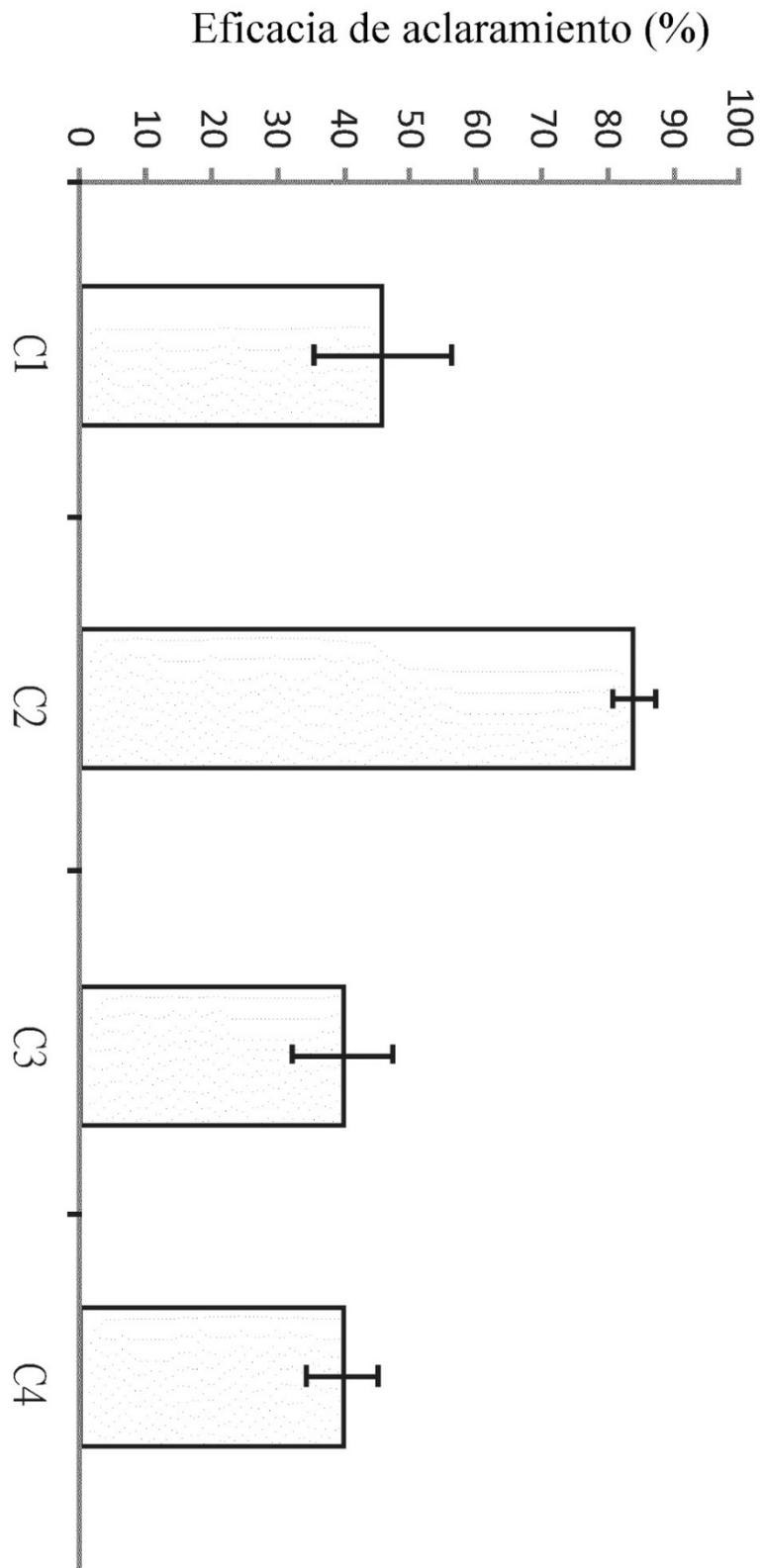


FIG. 3b

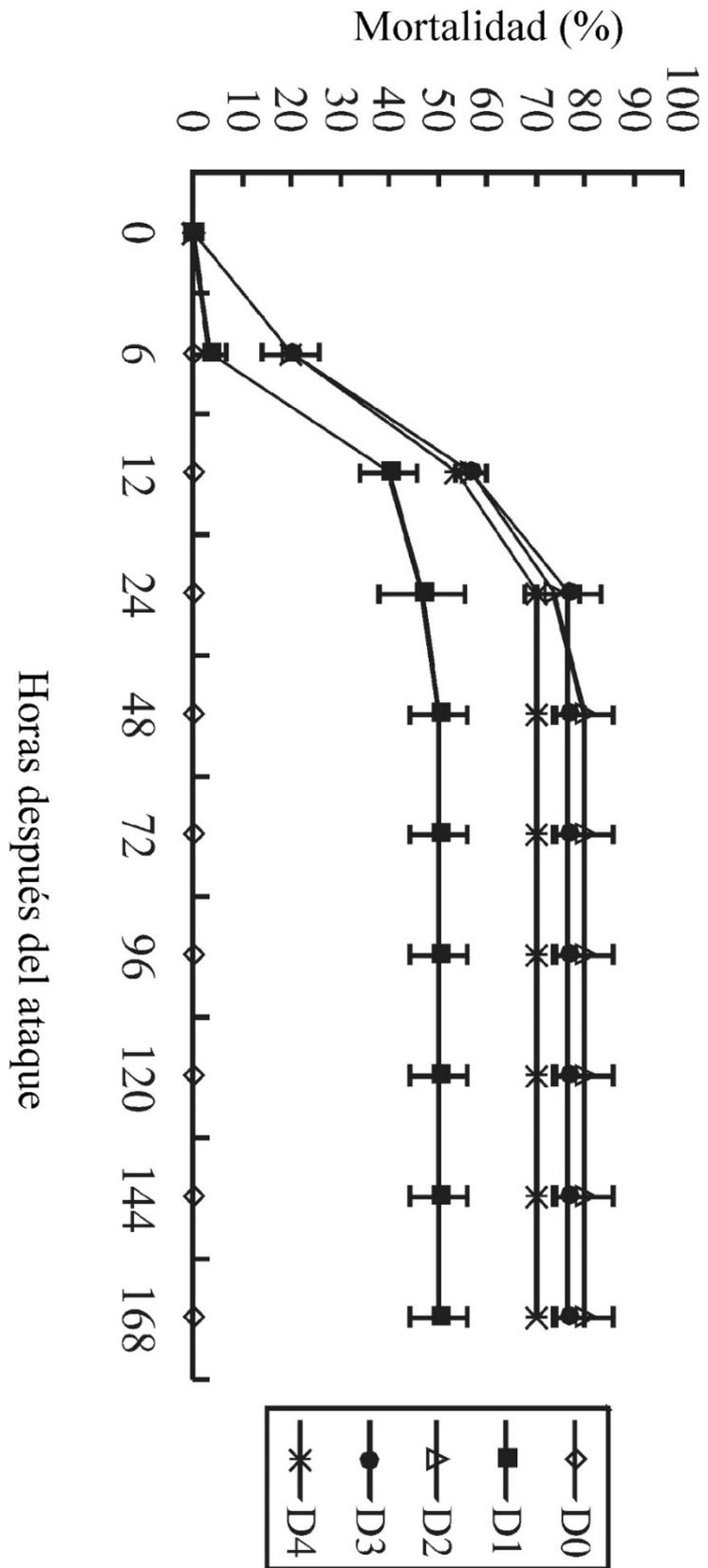


FIG. 4