

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 189 608**

21 Número de solicitud: 200002846

51 Int. Cl.7: **C12N 15/25**
C07K 14/545
A61K 38/20

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **28.11.2000**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2003**

Fecha de la concesión: **24.11.2004**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2005**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.01.2005

73 Titular/es: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, 5
30003 Murcia, ES

72 Inventor/es: **Mulero Méndez, Victoriano;**
Pelegrín Vivancos, Pablo y
Meseguer Peñalver, José

74 Agente: **Dávila Baz, Ángel**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de la IL-1 β recombinante de dorada (*Sparus aurata L.*) y su uso como inmunoestimulante y adyuvante en peces objeto de cultivo industrial.**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de la IL-1 β recombinante de dorada (*Sparus aurata L.*) y su uso como inmunoestimulante y adyuvante en peces objeto de cultivo industrial. El procedimiento de obtención se realiza mediante la clonación molecular de la IL-1 β .

IL-1 β recombinante de dorada tiene utilidad como inmunoestimulante en peces objeto de cultivo industrial.

Asimismo, dicha interleuquina tiene utilidad como adyuvante de vacunas de los citados peces.

Aplicación de la IL-1 β recombinante de dorada en acuicultura.

ES 2 189 608 B1

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

DESCRIPCION

Procedimiento para la obtención de la IL-1 β recombinante de dorada (*Sparus aurata L.*) y su uso como inmunoestimulante y adyuvante en peces objeto de cultivo industrial

Campo de la invención

La presente invención está relacionada con la utilización de la IL-1BETA recombinante de dorada (*Sparus aurata L.*) como inmunoestimulante y adyuvante en vacunas de peces objeto de cultivo industrial y con el procedimiento por el cual se obtiene.

Estado de la técnica

La respuesta inmunitaria de los vertebrados está estrechamente regulada por una red de citoquinas. Es bien conocido que estas citoquinas pueden aplicarse como agentes terapéuticos para estimular la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa al ser administrados junto a vacunas(adyuvante). En peces, sin embargo, se desconoce la identidad molecular y funcional de la mayoría de citoquinas. En el caso de la IL-1 β , objeto de esta patente, se ha identificado en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y en carpa (*Cyprinus carpio*), pero sus propiedades funcionales y terapéuticas están por demostrar.

A continuación se detallan los documentos científicos relacionados con la IL-1 β de peces:

1. Hardie LH, Laing KJ, Daniels GD, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ (1998). Molecular cloning of interleukin 1-beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site. *Citokine* 8:552-560.
2. Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (1999). The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1beta gene has differ organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *Eur J Biochem* 259:901-908.
3. Engelsma MY, Stet RJM, Verburg-van Kemenade LBML (1999). The genomic organization of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1beta. *EMBL AJ245635*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tal y como indica su enunciado, se refiere a la aplicación de la IL-1 β recombinante de dorada(*Sparus aurata L.*) como inmunoestimulante y adyuvante en peces y al procedimiento para su obtención.

El cDNA de la IL-1 β de dorada ha sido clonado y secuenciado. La secuencia determina una proteína de 253 aminoácidos con un peso molecular de 29 KDa y que presenta las características de la familia de la IL-1. Es de destacar la gran conservación de las 12 hojas beta de su extremo C-terminal que le confieren una estructura secundaria típica denominada " β -trefoil" . Otra característica importante que confirma que se trata de una IL-1 β , es que carece de un péptido señal al igual que todas las IL- β s conocidas.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta su gran conservación con otras

IL-1 β conocidas(una identidad de aminoácidos del 30 al 53%) la convierte en una candidata idónea para ser utilizada como inmunoestimulante y adyuvante en diferentes peces objeto de cultivo industrial.

Los experimentos que a continuación se relacionan, se describen como soporte de aspectos particulares de la invención y en ningún caso para limitar el alcance de la misma.

Los experimentos se desarrollaron en varias etapas.

A. Clonación molecular de la IL-1 β de dorada(*Sparus aurata L.*)

A.1. Metodología concreta

La IL-1 β de dorada fue clonada mediante RT-PCR utilizando cebadores degenerados dirigidos contra secuencias conservadas de las IL-1 β s conocidas. Una vez identificada una secuencia interna se procedió a completar la clonación de los extremos 5' y 3' haciendo uso del sistema RACE(" Rapid Amplification of cDNA Ends") y cebadores específicos de la IL-1 β de dorada.

A.2. Resultados

Se clonó el cDNA completo de la IL-1 β de dorada que presentaba las siguientes características:

- Un extremo 5' de 67 pares de bases(pb)
- Un extremo 3' de 407 pb con 7 secuencias de inestabilidad de mRNA típicas de moléculas inflamatorias.
- Un marco abierto de lectura de 759 pb que determina una proteína de 253 aminoácidos, con un peso molecular de 29Kda, y que conserva los dominios típicos de las IL-1 β s(carencia de péptido señal y presencia de 12 hojas beta en extremo C-terminal que forman una estructura secundaria denominada " β -trefoil"). Además, carece de una secuencia de reconocimiento para la caspasa-1, al igual que las IL-1 β s de otros vertebrados inferiores.

B. Estudio filigenético de la IL-1 β de dorada

B.1. Metodología concreta

Se utilizaron diferentes paquetes estadísticos para comparar la secuencia de IL-1 β de dorada con otras IL- β s conocidas y construir un árbol filogenético que incluyen la IL-1 β de dorada. Podríamos destacar los siguientes: FASTA y BLAST (Baylor College of Medicine Search Launcher), y ClustalW (European Bioinformatics Institute)

B.2. Resultados

El estudio filogenético demuestra que la IL-1 β de dorada muestra una elevada homología a nivel de nucleótidos (48,1-61,7%) y de aminoácidos (identidad 30-53% y similitud 50-67%) con todas la IL-1 β s conocidas, especialmente con las dos IL-1 β s de trucha. Este hecho también se confirma en el árbol filogenético de la IL-1 β de dorada.

C. Estudio de la expresión in vitro e in vivo de la IL1 β de dorada

C.1. Metodología concreta

Para los estudios *in vivo*, varios ejemplares de dorada fueron inyectados intraperitonealmente con 5x10⁸ bacterias de una cepa no virulenta de *Vibrio anguillarum*, a continuación se aisló el mRNA de diferentes tejidos y se identificó el transcrito de la IL-1 β de dorada mediante RT-PCR usando cebadores específicos.

Para los estudios *in vitro*, macrófagos aislados del riñón cefálico de ejemplares de dorada fueron estimulados con lipopolisacárido (LPS) y/o factor activador de macrófagos (MAF).

C.2. Resultados

El transcrito de la IL-1 β de dorada es identificado por RT-PCR en cerebro, riñón cefálico, bazo, sangre, exudado peritoneal, branquia e hígado de animales inyectados con *V. Anguillarum*. La expresión más fuerte se detectó en exudado peritoneal, resultado de no extrañar teniendo en cuenta que la bacteria fue inyectada en la cavidad peritoneal de los animales. Es también interesante el hecho de que detectamos en varios tejidos de peces no inyectados (control) una señal muy débil mediante RT-PCR correspondiente al mRNA de la IL-1 β . Por último, macrófagos purificados y activados con LPS y MAF presentaban unos niveles de expresión de IL-1 β muy superiores a los obtenidos en leucocitos totales, in-

dicando que estas células podrían ser una de las principales productoras de IL1 β en peces.

D. Producción de la il-1 β recombinante de dorada

D.1. Metodología concreta

La IL-1 β de dorada ha sido clonada en un vector de expresión de células de mamífero (pcDNA4/HisMax, Invitrogen) y en uno de *Escherichia coli* (pET-15b).

Las proteínas recombinantes irán fusionadas a 6 histidinas para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC).

D.2. Resultados

Se están obteniendo diferentes clones que expresan de forma estable la IL- β de dorada para ser purificada y empleada como inmunoestimulante y adyuvante de vacunas en peces objeto de cultivo industrial.

Conclusiones

De los resultados anteriores se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. El cDNA completo de la IL-1 β de dorada ha sido clonado y secuenciado.
2. La secuencia de aminoácidos deducida de la IL- β de dorada está muy conservada y muestra todas las características estructurales de las IL-1 β s conocidas.
3. El mRNA de la IL-1 β de dorada aumenta mucho su expresión tras una infección experimental de los ejemplares, con la bacteria *Vibrio anguillarum*.
4. Los macrófagos de dorada son células capaces de producir IL-1 β tras ser estimulados con productos bacterianos (LPS) y citoquinas (MAF).
5. La IL-1 β recombinante de dorada está siendo producida para utilizarse como inmunoestimulante Y/O adyuvante de vacunas de peces objeto de cultivo industrial.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de IL-1 β recombinante de dorada, **caracterizada** por comprender las siguientes etapas:

- a) La IL-1 β es clonada mediante RT-PCR usando cebadores degenerados, dirigidos contra secuencias conservadas de las IL-1 β s conocidas.
- b) Una vez identificada la secuencia interna, se procede a completar la clonación de los extremos 3' y 5', mediante el sistema RACE y cebadores específicos de la IL-1 β recombinante de dorada.

2. IL-1 β recombinante de dorada obtenida mediante el procedimiento de la reivindicación 1, **caracterizada** porque su cDNA presenta:

- Un extremo 5' de 67 pb.

- Un extremo 3' de 407 pb con 7 secuencias de inestabilidad de mRNA.

- Un marco abierto de lectura de 759 pb que determinan una proteína de 253 aminoácidos con un peso molecular de 29KDa y que conserva los dominios típicos de las IL-1 β s conocidas.

- Además carece de una secuencia de reconocimiento para la caspasa I.

3. Uso de la IL-1 β recombinante de dorada obtenida según el procedimiento de la reivindicación 1 y que presenta las características según reivindicación 2, en la preparación de una composición alimenticia para la inmunoestimulación en peces objeto de cultivo industrial.

4. Uso de la IL-1 β según reivindicación anterior, como adyuvante de vacunas en peces objeto de cultivo industrial.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 189 608

② Nº de solicitud: 200002846

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.11.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/25, C07K 14/545, A61K 38/20

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PELEGRIN, P. et al. "Identification and preliminary characterisation of a gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i> L.) interleukin-1beta cDNA". DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, 2000, Vol. 24, Supl. 1, página S64. Todo el documento.	1
Y	Todo el documento.	1-4
Y	PLEGUEZUELOS, O. et al. Cloning, sequencing and analysis of expression of a second IL-1beta gene in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>). IMMUNOGENETICS, 2000, Vol. 51, Nº 12, páginas 1002-1011. Todo el documento.	1-4
A	YIN, Z. et al. Carp interleukin-1beta in the role of an immuno-adjuvant", FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY, 2000, Vol. 10, Nº 4, páginas 375-378. Todo el documento.	1-4

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

27.05.2003

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1