



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 221 766**

⑫ Número de solicitud: 200102360

⑮ Int. Cl.7: **C12N 15/31**
A61K 39/02

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **22.10.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2005**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.01.2005

⑰ Solicitante/s:
**Universidad de Oviedo y en su representación
D. Mario Díaz Fernández
Vicerrector de Investigación
Plaza del Riego 4, Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES**

⑰ Inventor/es: **Guijarro Atienza, José Agustín;
Márquez Llano-Ponte, Isabel;
López Fernández, José Ramón y
Secades Vázquez, Pablo**

⑰ Agente: **No consta**

⑮ Título: **Procedimiento de identificación y utilización como vacuna de la proteína Yrp1 de *Yersinia ruckeri*.**

⑮ Resumen:

Procedimiento de identificación y utilización como vacuna de la proteína Yrp1 de *Yersinia ruckeri*.

La invención consiste en la identificación, secuenciación y aplicación del gen yrp1 de *Yersinia ruckeri* que codifica para una metaloproteasa y su utilización como vacuna en la prevención del proceso patológico producido por esta bacteria en salmónidos conocido como "enfermedad de la boca roja". De aplicación en el campo de la acuicultura.

ES 2 221 766 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación y utilización como vacuna de la proteína Yrp1 de *Yersinia ruckeri*.

5 **Campo de la invención**

La invención se adscribe al campo de los procesos biológicos relacionados con la respuesta inmune de salmónidos y otros posibles organismos afectados por *Yersinia ruckeri* y la protección frente a la infección y desarrollo posterior del proceso patológico que esta produce. En concreto, la presente invención versa sobre una proteína de *Y. ruckeri* que
10 contiene dominios de metaloproteasa perteneciente a la subfamilia de las serralisinas sobre el gen que la codifica y sobre su propia actividad sobre diferentes sustratos sintéticos y naturales. Mas particularmente, la presente invención aborda la identificación de la proteasa de *Y. ruckeri* denominada Yrp1 (*Yersinia ruckeri* proteasa 1), el análisis de su estructura y de su utilización como inmunógeno por diferentes vías en la protección y prevención de las patologías producidas en salmónidos y otros organismos.

15 **Estado de la técnica**

Las metaloproteasas son un grupo de aproximadamente 30 familias (H. Maeda et al. Methods in Enzymology 248: 183-228 (1995)). Dentro de ellas la familia M10 o familia de las collagenasas intersticiales incluye una gran
20 variedad de enzimas de bacterias, plantas y animales. Esta familia comprende dos subfamilias, una que contiene a las enzimas bacterianas, denominada subfamilia de las serralisinas y otra que esta constituida por las metaloproteasas de la matriz denominadas subfamilia de las matrilisinas. Miembros de la subfamilia de las serralisinas se han encontrado en *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Escherichia*, *Serratia* etc.. Las serralisinas son proteínas exocelulares que contienen en su secuencia como característica mas relevante repeticiones de secuencias ricas en glicina en el carboxilo
25 terminal (GGXGXD), un motivo de unión a zinc (HEXXH) y un dominio en el carboxilo terminal (DXXX) esencial para la secreción por el sistema de transporte de proteínas a través de membranas denominado ABC (H. Maeda et al. Methods in Enzymology 248: 395-413 (1995)).

Las serralisinas intervienen como factores de virulencia en algunas de las patologías ocasionadas por los microor-
30 ganismos que las poseen. El modo en el cual actúan no es conocido y puede ir desde la degradación de los tejidos del huésped durante el proceso de infección hasta su mas especifica actuación en la activación o inactivación de factores del huésped que desencadenen alteraciones fisiológicas. Esta implicación en la patología ha hecho que se estimulase el estudio de este tipo de enzimas.

Por otro lado, la enfermedad clásica producida por *Y. ruckeri*, conocida como "Enfermedad de la Boca Roja", es una de las patologías mas abundantes en las piscifactorías de salmónidos en todo el mundo. Sus efectos son masivos una vez se ha instalado en un estanque y produce grandes pérdidas económicas en el sector. Aunque en la actuali-
35 dad existe una vacuna tradicional compuesta por la bacteria inactivada, se producen brotes con cierta frecuencia. A través de la aplicación de las nuevas tecnologías de DNA recombinante se están desarrollando nuevos métodos de vacunación que entre otras, permiten el desarrollo de vacunas polivalentes. Entre estas nuevas vacunas se encuentran la inmunización con plásmidos en la denominadas vacunas de DNA, la expresión de proteínas en plantas transgénicas para posteriormente poder ser utilizadas como vacunas comestibles y la utilización de vectores víricos como en este caso los Rabdovirus portando el DNA de interés.

Una de las estrategias para determinar la implicación de una determinada proteína en la patología producida por un microorganismo, consiste en la clonación del gen codificante, su secuenciación y su posterior generación mediante la interrupción del gen, de un mutante carente de esa actividad. La comparación en experimentos de la dosis letal cincuenta (DL₅₀) entre el microorganismo parental y mutante definirá la implicación o no de la proteína en la patología. Además, y adicionalmente, la purificación de la proteína y su utilización en experimentos de vacunación permitirá
45 valorar su interés como inmunógeno y por tanto en prevención de la patología.

Breve descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es identificar el gen que codifica para la metaloproteasa Yrp1 de *Y. ruckeri*.
55

Un segundo objetivo de la invención es determinar la participación del gen y su proteína en la patología conocida como "Enfermedad de la Boca Roja".

Un tercer objetivo de la invención es la utilización de la proteína o alguna de sus secuencias como vacuna en la
60 prevención de la patología.

Descripción de las Figuras

Figura 1. Construcción de un mutante isogénico *yrp1* por mutagenesis insercional. A. Recombinación homóloga, que resulta en una mutación insercional del gen *yrp1*, entre el fragmento interno de 787 pares de bases del plásmido pLPY1 y el gen *yrp1* del cromosoma de *Y. ruckeri*. B. Análisis por Southern blot de la cepa mutada de *Y. ruckeri*. El ADN genómico de la cepa parental y mutada fue digerido con *Bam* HI e hibridada con el fragmento interno de 787
65

pares de bases del gen *yrp1* previamente marcado con digoxigenina. El tamaño de los fragmentos que hibridan se indica en kilobases.

Figura 2. Análisis de la producción de Yrp1 por las cepas parental y mutada de *Y. ruckeri*. A. Sobrenadantes de ambas cepas fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE (12%) y tras ello los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250. Línea 1, cepa parental. Línea 2, cepa mutada. Patrones de masa molecular se indican a la izquierda en kilodaltons. B. Después de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas por Western blot y analizadas con anticuerpos obtenidos frente a la proteína Yrp1. Línea 1, cepa parental. Línea 2, cepa mutada.

Descripción detallada de la invención

El primer objetivo de la invención consistió en la identificación del gen que codifica para la proteasa extracelular Yrp1 de *Y. ruckeri*. Para ello, se generó una genoteca de *Y. ruckeri* en *Escherichia coli* mediante la fragmentación parcial, con tamaño de fragmentos de entre 5 y 10 kilobases, del ADN de *Yersinia* con *Sau* 3AI, su ligación en el vector pUC19, previamente digerido con *Bam* HI y defosforilado, y la transformación de la cepa *E. coli* DH10B. La genoteca así obtenida, se sembró sobre agar nutritivo conteniendo 5 g/l de gelatina y 100 µg/ml de ampicilina. Se obtuvieron varios clones que originaban un halo de hidrólisis de la gelatina. El análisis y secuenciación del fragmento de uno de estos clones definió la secuencia que se presenta correspondiente al gen que codifica la proteasa Yrp1. El análisis informático de la secuencia obtenida reveló la existencia de una pauta abierta de lectura, que codifica una proteína de 477 aminoácidos a la que denominamos Yrp1. Cuando su secuencia de aminoácidos fue comparada con las existentes en los bancos de datos accesibles públicamente se demostró la existencia de un grado significativo de similitud con otras metaloproteasas de la subfamilia de las serralisinas. Así, la proteína presenta todos los motivos característicos de estas enzimas incluyendo el propéptido señal constituido por los primeros 14 aminoácidos, el dominio de zinc (H184 y H188), cuatro motivos característicos de probable unión de calcio (G341-D346; G359-D364; G368-D373; G377-D382) y un motivo final relacionado con la secreción de la proteína (D474-V477). Tanto el ADN aislado como el polipéptido codificado, representados en la secuencia *yrp1*, como secuencias parciales obtenidos de ambos, pueden sintetizarse también químicamente.

El segundo objetivo de la invención es determinar la implicación del gen y la proteína en la patología conocida como "Enfermedad de la Boca Roja". Con este fin, se generó un fragmento interno del gen *yrp1* de 787 pares de bases mediante PCR. Este fragmento fue diseñado de forma que en sus extremos tenía un lugar *Bgl* II que permitía así insertarlo en el único lugar *Bgl* II del plásmido suicida denominado pIVET8 (Proceeding National Academic Science USA: 92: 669-673 (1995) que contiene determinantes de resistencia para el cloranfenicol y la ampicilina. Se genera así el plásmido denominado pLPY1 (figura 1 A). Este plásmido fue introducido por transformación en la cepa de *E. coli* SM10 λ pir donde puede replicarse y a la vez ser transferido por conjugación a una cepa de *Y. ruckeri* resistente a rifampicina. En esta última no puede replicarse por carecer de la proteína Pi necesaria para ello, de forma que la selección en un medio conteniendo rifampicina y ampicilina permitirá la obtención de aquellas células de *Y. ruckeri* que hayan recibido el plásmido y que se hayan integrado por recombinación homóloga entre el fragmento interno del gen *yrp1* del plásmido pLPY1 y el gen presente en el cromosoma de la cepa receptora. Esta recombinación produce la interrupción del gen *yrp1* generándose así un mutante insercional (figura 1 A). La generación del mutante fue confirmada por Southern blot de acuerdo a la figura 1 B. Este mutante denominado *Y. ruckeri* 150RI4 careció, como era previsible, de la proteína Yrp1 (figura 2 A y B).

Para valorar la implicación del gen en el desarrollo de la patología, se llevaron a cabo experimentos de DL₅₀ inyectando grupos de 10 peces de 8 a 10 cm de longitud con dosis crecientes de bacterias entre 10² a 10⁶ células en 100 µl. Cuando la cepa utilizada fue la parental la DL₅₀ fue de 10², mientras que con el mutante insercional u otro mutante químicamente obtenido denominado E1, el resultado fue que la DL₅₀ se incrementó 100 veces. Esto demuestra la implicación del gen y su proteína en el desarrollo del proceso infeccioso producido por *Y. ruckeri*.

El tercer objetivo es la utilización de la proteína Yrp1 o alguna de sus péptidos para la inmunización y prevención de la patología producida por esta bacteria.

Para ello se purificó la proteína Yrp1 a partir de sobrenadantes del cultivo mediante precipitación con sulfato amónico y cromatografía en DEAE Sepharosa (Applied Environmental Microbiology 65: 3969-3975 (1999)). La proteína así obtenida, fue electroforeticamente pura, y fue utilizada como toxoide en la vacunación de truchas. Para ello, se establecieron 3 grupos de 20 truchas cada uno de entre 8 a 10 cm de longitud. A un grupo se le inyectó a cada trucha 100 µl de tampón fosfato salino (PBS), a otro 100 µl de una suspensión de células de *Y. ruckeri* en PBS inactivadas por calor durante 20 minutos a 100°C y, a un tercero, 100 µl conteniendo entre 4 a 8 µg de proteína pura Yrp1 en PBS, previamente inactivada por calor durante 3 minutos a 100°C. Después de 25 días de mantenimiento de los peces a 18°C, se inyectaron a cada pez de cada grupo dosis letales de la bacteria. El resultado fue la muerte dentro de los tres primeros días de todos los peces tratados con tampón PBS, mientras que no hubo ninguna muerte ni diferencias, al menos durante los 15 días siguientes en los que se siguió el experimento, entre los animales vacunados con la bacteria inactivada y la proteína pura Yrp1. Ello demuestra que la proteína Yrp1 puede ser utilizada en la vacunación contra esta patología.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de la proteasa Yrp1 de *Y. ruckeri* **caracterizado** porque comprende las siguientes fases:

a) Generación de una genoteca de *Y. ruckeri* en *E. coli*.

b) Identificación sobre un medio conteniendo gelatina (5 g/l) de los clones con actividad proteolítica.

c) Aislamiento y secuenciación completa de nucleótidos del gen *yrp1*.

2. Procedimiento de identificación, según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque la secuencia genética identificada codifica una proteína extracelular celular de *Yersinia ruckeri* denominada Yrp1.

3. Procedimiento de identificación, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la secuencia genética identificada y su respectiva secuencia de aminoácidos son SEQ ID NO: 1.

4. Secuencia genética de SEQ ID NO: 1 y sus mutaciones, derivados o secuencias parciales, que codifiquen una enzima con actividad proteolítica.

5. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en la producción de proteínas recombinantes o sintéticas.

6. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en la producción de anticuerpos.

7. Secuencia de aminoácidos completa o partes de la misma reflejadas en SEQ ID NO: 1.

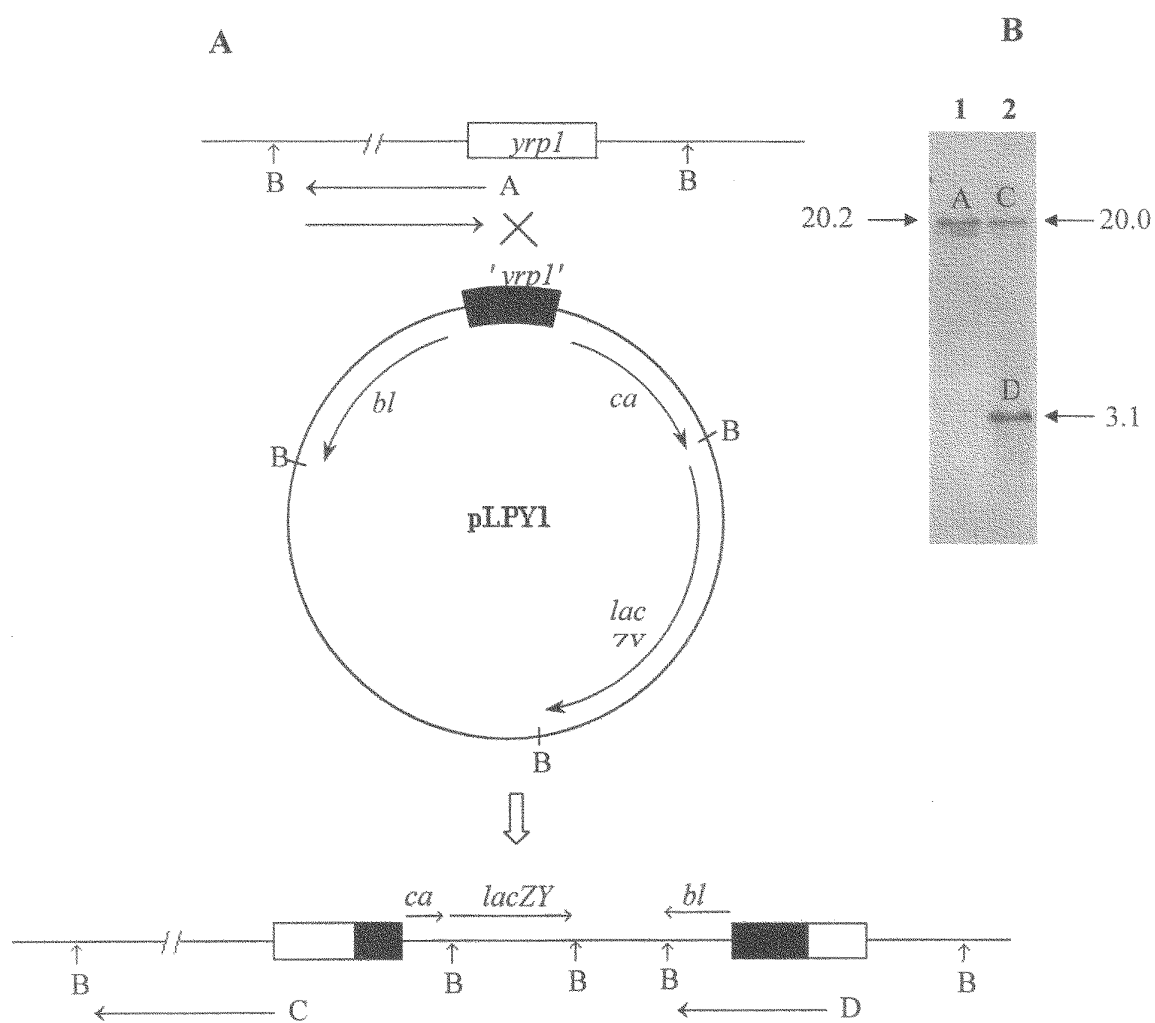


Figura 1

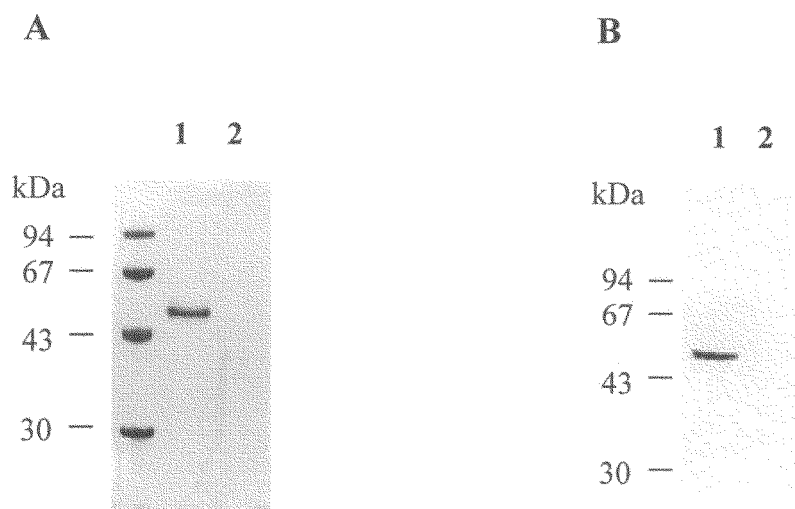


Figura 2

LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN GENERAL:

SOLICITANTE:

5 NOMBRE: Universidad de Oviedo
 CALLE: San Francisco, 3
 CIUDAD: Oviedo
 PAIS: España
 CODIGO POSTAL: 33003
 10 TELEFONO: 34 (9) 8 510 4058
 FACSÍMIL: 34 (9) 8 522 7126

TITULO DE LA INVENCION: Procedimiento de identificación y utilización como vacuna de la proteína Yrp1 de *Yersinia ruckeri*

NÚMERO DE SECUENCIAS : 1

15 **FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:**
 TIPO DE MEDIO: Disco flexible
 ORDENADOR: PC IBM compatible
 SISTEMA OPERATIVO: Windows 97
 SOPORTE LÓGICO: Microsoft Word 7.0

20 **DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL**
 NÚMERO DE LA SOLICITUD:
 DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR
 NÚMERO DE LA SOLICITUD:
 FECHA DE PRESENTACIÓN:

25 **INFORMACIÓN CONCERNIENTE A YRP1 NO: 1**

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 LONGITUD: 1.434
 TIPO: ácido nucleico
 NÚMERO DE HEBRAS: doble
 30 CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADN

FUENTE DE ORIGEN:

 ORGANISMO: *Yersinia ruckeri*
 TIPO DE CÉLULA: procariota
 35 FUENTE INMEDIATA :
 GENOTECA: *Yersinia ruckeri*
 CLON:

CARACTERÍSTICAS:

 NOMBRE/CLAVE: codón de iniciación
 40 LOCALIZACIÓN: 1.3

CARACTERÍSTICAS:

 NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante
 LOCALIZACIÓN: 1..1.431

CARACTERÍSTICAS:

45 NOMBRE/CLAVE: codón de parada
 LOCALIZACIÓN: 1.432..1.434

50

55

60

65

ES 2 221 766 A1

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN *yrp1*:

	ATG	AAA	GCA	AGT	AGT	AAT	AAA	GCT	GAT	GTT	CAG	TTT	GAT	TCT	GCT	ATA	GCA
	51																
5	Met	Lys	Ala	Ser	Ser	Asn	Lys	Ala	Asp	Val	Gln	Phe	Asp	Ser	Ala	Ile	Ala
	1				5					10				15			
	CGT	AGT	GGC	TAT	GAC	ACG	GTG	ATT	GAG	TTT	TTG	AAC	TAT	CAT	GCG	CGT	GGC
	102																
10	Arg	Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Leu	Asn	Tyr	His	Ala	Arg	Gly
			20					25					30				
	GAT	GGT	TTA	ATC	ATT	CAA	GGT	AAG	CCT	TCT	TAC	ACA	CCT	GAA	GAG	GCG	GGG
	153																
15	Asp	Gly	Leu	Ile	Ile	Gln	Gly	Lys	Pro	Ser	Tyr	Thr	Pro	Glu	Glu	Ala	Gly
	35					40					45				50		
	TTA	CAA	ATT	ACC	CGC	ACC	AAC	CAA	ACC	TGG	AAT	GGG	AAA	AAT	GTG	TTT	GAC
	204																
20	Leu	Gln	Ile	Thr	Arg	Thr	Asn	Gln	Thr	Trp	Asn	Gly	Lys	Asn	Val	Phe	Asp
				55				60					65				
	CAA	CCG	GTC	AAA	TTA	ACT	TAT	TCA	TTC	CTG	GAT	CAG	GTC	AGC	AGA	ATA	CCG
	255																
	Gln	Pro	Val	Lys	Leu	Thr	Tyr	Ser	Phe	Leu	Asp	Gln	Val	Ser	Arg	Ile	Pro
		70					75					80				85	
	AGT	GGC	GAC	AAG	GGG	TTT	GTT	AAG	TTT	AAC	CCT	GCA	CAA	ATT	GAA	GTG	GCC
	306																
30	Ser	Gly	Asp	Lys	Gly	Phe	Val	Lys	Phe	Asn	Pro	Ala	Gln	Ile	Glu	Val	Ala
				90						95					100		
	AAG	TTG	TCA	TTA	CAA	TCT	TGG	GCA	GAT	GCG	GCC	AAT	ATT	GCT	TTC	ACA	GAA
	357																
	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Ser	Trp	Ala	Asp	Ala	Ala	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr	Glu

ES 2 221 766 A1

	105	110	115
5	ATT ACC TCG AGC CAA AGT GCC AAT ATC ACA TTT GGT AAC TAT ACG CTG TCA 408		
	Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ala Asn Ile Thr Phe Gly Asn Tyr Thr Leu Ser 120 125 130 135		
10	TGG AAC GGC AAA CCT GCC GAT TCA CAG GCT TAT GCG TAC TTA CCG GGC AGT 459		
	Trp Asn Gly Lys Pro Ala Asp Ser Gln Ala Tyr Ala Tyr Leu Pro Gly Ser 140 145 150		
15	GGC AGC CCA TCG GGT TCA ACT TGG TAT AAC TAC AAC GTC GAT AAT ATT CGT 510		
	Gly Ser Pro Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Asn Tyr Asn Val Asp Asn Ile Arg 155 160 165 170		
20	AAT CCT GAT GTG ATG GAA TAT GGT CGT CAG ACG TTT ACC CAT GAG ATT GGA 561		
	Asn Pro Asp Val Met Glu Tyr Gly Arg Gln Thr Phe Thr His Glu Ile Gly 175 180 185		
25	CAT GCA TTA GGA TTG AGC CAT CCG GGT AAT TAC AAT GCC GGG CAG GGT GAT 612		
	His Ala Leu Gly Leu Ser His Pro Gly Asn Tyr Asn Ala Gly Gln Gly Asp 190 195 200		
30	CCG TCT TAT AAA GAT GTC ACC TAT GCG GAA GAT ACC CGT CAG TTC AGT ATT 663		
	Pro Ser Tyr Lys Asp Val Thr Tyr Ala Glu Asp Thr Arg Gln Phe Ser Ile 205 210 215 220		
35	ATG AGC TAT TGG AGT GAA AAA AAT ACC GGT GGG GAT AAC AAA GGG CAT TAT 714		
	Met Ser Tyr Trp Ser Glu Lys Asn Thr Gly Gly Asp Asn Lys Gly His Tyr 225 230 235		
40	GCC TCA GCA CCA TTG CTA GAT GAT ATT AGT GCC ATC CAG CAT TTG TAC GGG 765		
	Ala Ser Ala Pro Leu Leu Asp Asp Ile Ser Ala Ile Gln His Leu Tyr Gly 240 245 250 255		
45	GGC AAT ATG ACT ACG CGT ACT GGC GAC ACC ATT TAC GGT TTT AAC TCC AAT 816		
	Ala Asn Met Thr Thr Arg Thr Gly Asp Thr Ile Tyr Gly Phe Asn Ser Asn 260 265 270		
50	ACC GAA CGC GAT TAT TAC ACG GCG ATA AAC AGC AGT AAG GCA CTG ATA TTT 867		
	Thr Glu Arg Asp Tyr Tyr Thr Ala Ile Asn Ser Ser Lys Ala Leu Ile Phe 275 280 285		
55	TCT GTT TGG GAT GCC GAT GGT AAT GAT ACA TTC GAC TTC TCT GGT TAC AGT 918		
	Ser Val Trp Asp Ala Asp Gly Asn Asp Thr Phe Asp Phe Ser Gly Tyr Ser 290 295 300 305		
60	AAT AAC CAG CGT ATT AAT CTG TAT GAG CAA TCT TTC TCT GAT GTC GGT GGC 969		
65			

ES 2 221 766 A1

	Asn	Asn	Gln	Arg	Ile	Asn	Leu	Tyr	Glu	Gln	Ser	Phe	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	
				310					315					320				
5	CTG	AAA	GGC	AAC	GTT	TCC	ATT	GCC	GCT	GGC	GTA	ACT	ATT	GAA	AAT	GCT	ATT	
	1020																	
	Leu	Lys	Gly	Asn	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	Gly	Val	Thr	Ile	Glu	Asn	Ala	Ile	
		325					330					335				340		
10	GGT	GGT	TCC	GGT	AAT	GAT	GTA	TTA	GTT	GGT	AAC	GAT	ATT	GCT	AAT	GAA	TTA	
	1071																	
	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Asp	Val	Leu	Val	Gly	Asn	Asp	Ile	Ala	Asn	Glu	Leu	
					345					350					355			
15	CAT	GGT	GCG	GCG	GGT	AAC	GAC	GTT	CTG	TTT	GGC	TGC	GGT	GGT	GCG	GAT	AAA	
	1122																	
	His	Gly	Ala	Ala	Gly	Asn	Asp	Val	Leu	Phe	Gly	Cys	Gly	Gly	Ala	Asp	Lys	
20			360					365				370						
	CTT	TGG	GGC	GGT	AGC	GGC	AGT	GAT	ATT	TTT	GTC	TAT	GGG	GAA	GCC	ATG	GAT	
	1173																	
	Leu	Trp	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Ile	Phe	Val	Tyr	Gly	Glu	Ala	Met	Asp	
25		375				380				385						390		
	TCT	ACA	CCT	GCC	AGT	CCT	GAC	TGG	ATA	ATG	GAT	TTT	GAA	AGC	GGT	ATC	GAT	
	1224																	
30	Ser	Thr	Pro	Ala	Ser	Pro	Asp	Trp	Ile	Met	Asp	Phe	Glu	Ser	Gly	Ile	Asp	
				395				400						405				
	AAA	ATC	GAT	TTA	TCC	ATA	TTT	AAC	TCG	GGC	AAT	AAA	GGT	ATT	CAC	TTT	GTC	
	1275																	
35	Lys	Ile	Asp	Leu	Ser	Ile	Phe	Asn	Ser	Gly	Asn	Lys	Gly	Ile	His	Phe	Val	
		410					415					420				425		
	GAT	CAC	TTT	ACC	GGT	TCA	GCG	GGT	GAA	GCC	TTA	CTC	ACC	TAC	GAT	GCG	CAA	
40		1326																
	Asp	His	Phe	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Tyr	Asp	Ala	Gln	
				430				435						440				
45	ACC	AAT	ATC	AGC	GAT	TTG	GTA	TTA	AAT	GTT	AAC	GGT	GGT	CAG	GCA	TTC	CCC	
	1377																	
	Thr	Asn	Ile	Ser	Asp	Leu	Val	Leu	Asn	Val	Asn	Gly	Gly	Gln	Ala	Phe	Pro	
			445				450					455						
50	GAC	TTC	TTG	GTT	AAA	ATT	GTC	GGG	CAA	CCG	ATG	CAG	GCA	ACA	GAT	TTT	ATT	
	1428																	
	Asp	Phe	Leu	Val	Lys	Ile	Val	Gly	Gln	Pro	Met	Gln	Ala	Thr	Asp	Phe	Ile	
		460				465				470					475			
55	GTT																TGA	
	1434																	
	Val	*																



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 221 766

⑫ Nº de solicitud: 200102360

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 22.10.2001

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12N 15/31, A61K 39/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SECADES et al. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen <i>Yersinia ruckeri</i> and effect of culture conditions on production. Appl. Environ. Microbiol., Sep 1999, Vol. 65, Nº 9, páginas 3969-3975.	1-7

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

25.11.2004

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1