



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 221 766**

② Número de solicitud: 200102360

⑤ Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **22.10.2001**

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

Fecha de la concesión: **23.02.2006**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2006**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.04.2006

⑰ Titular/es: **Universidad de Oviedo**
Plaza del Riego, 4 - Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑱ Inventor/es: **Guijarro Atienza, José Agustín;**
Márquez Llano-Ponte, Isabel;
López Fernández, José Ramón y
Secades Vázquez, Pablo

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Procedimiento de identificación y utilización como vacuna de la proteína Yrp1 de *Yersinia ruckeri*.**

㉒ 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 B1

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

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 colagenasas 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
35 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 actualidad 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
40 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
45 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
50 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 mutagenésis insercional. A. Recombinación homóloga,
65 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

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.

10 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.

65

ES 2 221 766 B1

REIVINDICACIONES

- 5 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.
 - 10 c) Aislamiento y secuenciación completa de nucleótidos del gen *yrp1*.
- 15 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.
- 20 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.
 - 25 7. Secuencia de aminoácidos completa o partes de la misma reflejadas en SEQ ID NO: 1.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

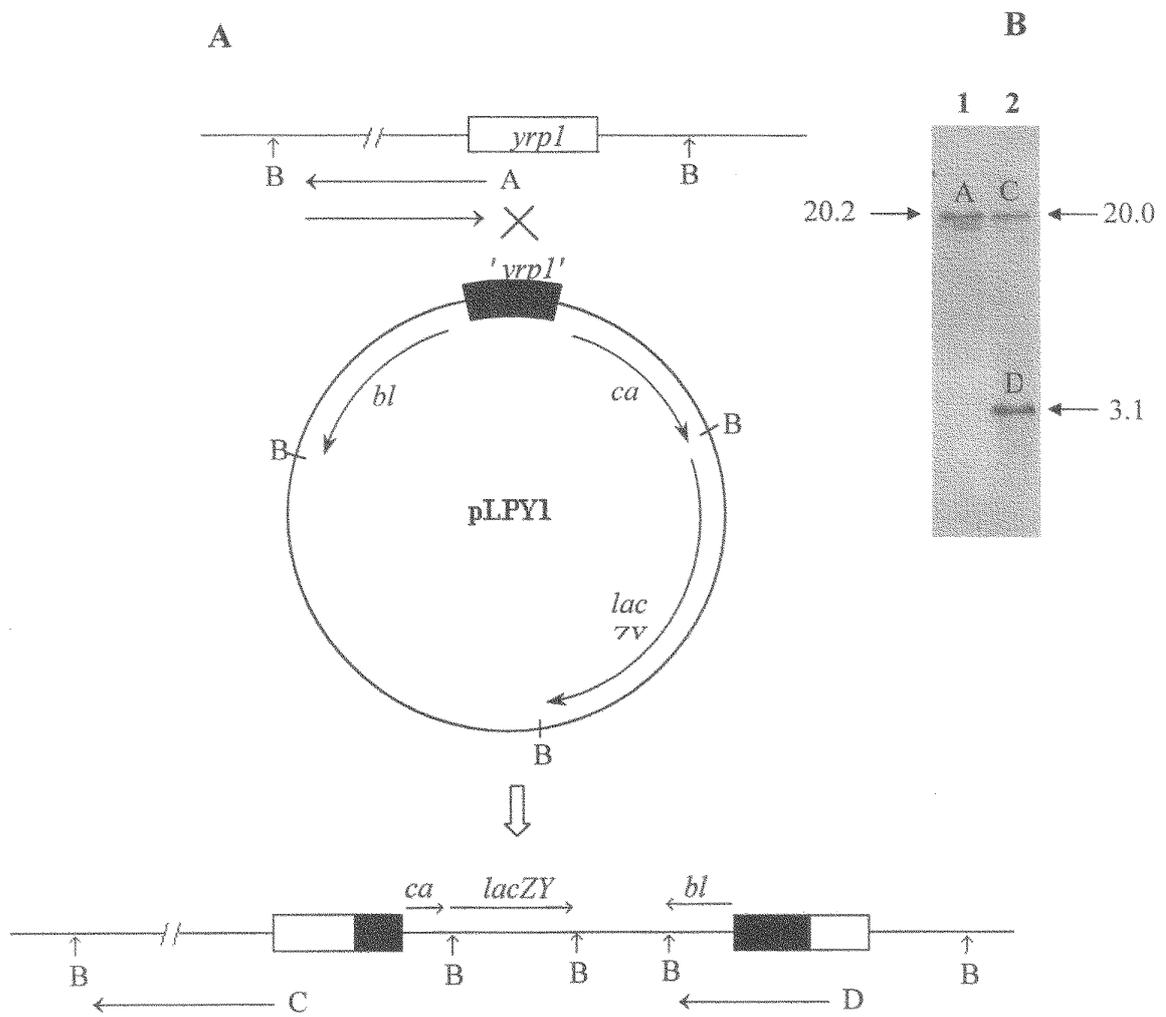


Figura 1

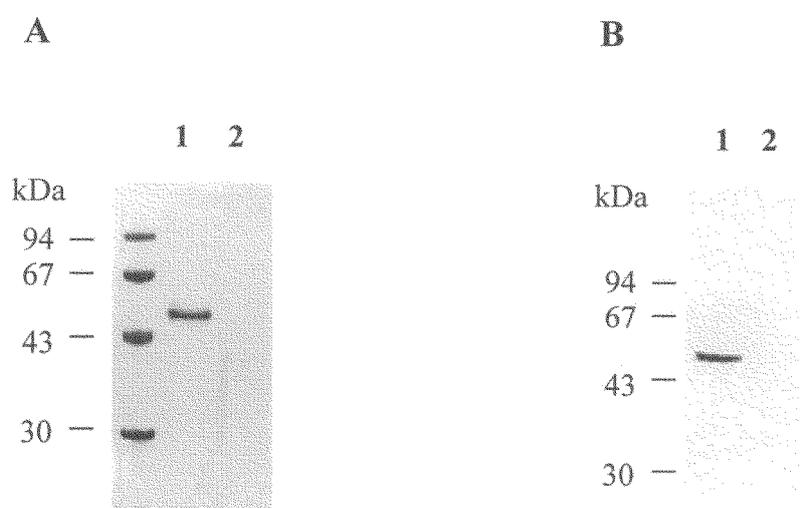


Figura 2

ES 2 221 766 B1

LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN GENERAL:

5 SOLICITANTE:
NOMBRE: Universidad de Oviedo
CALLE: San Francisco, 3
10 CIUDAD: Oviedo
PAÍS: España
CÓDIGO POSTAL: 33003
TELÉFONO: 34 (9) 8 510 4058
15 FACSIMIL: 34 (9) 8 522 7126

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

20 NÚMERO DE SECUENCIAS : 1

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

30 DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL
NÚMERO DE LA SOLICITUD:

DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR
35 NÚMERO DE LA SOLICITUD:
FECHA DE PRESENTACIÓN:

INFORMACIÓN CONCERNIENTE A YRP1 NO: 1

40 CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
LONGITUD: 1.434
TIPO: ácido nucleico
45 NÚMERO DE HEBRAS: doble
CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADN

50 FUENTE DE ORIGEN:
ORGANISMO: *Yersinia ruckeri*
TIPO DE CÉLULA: procariota
FUENTE INMEDIATA :
55 GENOTECA: *Yersinia ruckeri*
CLON:

CARACTERÍSTICAS:
60 NOMBRE/CLAVE: codón de iniciación
LOCALIZACIÓN: 1.3

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

ES 2 221 766 B1

CARACTERÍSTICAS:

NOMBRE/CLAVE: codón de parada

LOCALIZACIÓN: 1.432..1.434

5

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN *ypr1*:

ATG AAA GCA AGT AGT AAT AAA GCT GAT GTT CAG TTT GAT TCT GCT ATA GCA
51
10 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
15 102
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 GGC
20 153
Asp Gly Leu Ile Ile Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Pro Glu Glu Ala Gly
35 40 45 50
25 TTA CAA ATT ACC CGC ACC AAC CAA ACC TGG AAT GGG AAA AAT GTG TTT GAC
204
Leu Gln Ile Thr Arg Thr Asn Gln Thr Trp Asn Gly Lys Asn Val Phe Asp
55 60 65
30 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
35 AGT GGC GAC AAG GGG TTT GTT AAG TTT AAC CCT GCA CAA ATT GAA GTG GCC
306
Ser Gly Asp Lys Gly Phe Val Lys Phe Asn Pro Ala Gln Ile Glu Val Ala
40 90 95 100
45 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

50

55

60

65

ES 2 221 766 B1

	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	GCC 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 B1

```

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
      360                      365                      370

20 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
      375                      380                      385                      390

25 TCT ACA CCT GCC AGT CCT GAC TGG ATA ATG GAT TTT GAA AGC GGT ATC GAT
   1224
   Ser Thr Pro Ala Ser Pro Asp Trp Ile Met Asp Phe Glu Ser Gly Ile Asp
      395                      400                      405

30 AAA ATC GAT TTA TCC ATA TTT AAC TCG GGC AAT AAA GGT ATT CAC TTT GTC
   1275
   Lys Ile Asp Leu Ser Ile Phe Asn Ser Gly Asn Lys Gly Ile His Phe Val
      410                      415                      420                      425

35 GAT CAC TTT ACC GGT TCA GCG GGT GAA GCC TTA CTC ACC TAC GAT GCG CAA
   1326
   Asp His Phe Thr Gly Ser Ala Gly Glu Ala Leu Leu Thr Tyr Asp Ala Gln
      430                      435                      440

40 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

45 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
   1434
   Val *
                                     TGA

60

65

```



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 221 766

② Nº de solicitud: 200102360

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.10.2001**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **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