



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 306 592**

② Número de solicitud: 200700172

⑤ Int. Cl.:
A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C12N 1/10 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **12.01.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2008**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.11.2008

⑰ Solicitante/s:
**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
CLÚSTER DE LA ACUICULTURA DE GALICIA**

⑱ Inventor/es: **Leiro Vidal, José Manuel;
Sanmartín Durán, Manuel Luis;
Lamas Fernández, Jesús;
Barja Pérez, Juan Luís;
Vázquez Ruiz de Ocenda, María y
Cabaleiro Martínez, Santiago**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para la preparación de una vacuna frente a la escuticociliatosis en peces marinos en cultivo.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la preparación de una vacuna frente a la escuticociliatosis en peces marinos en cultivo. Procedimiento para la preparación de una vacuna frente a los principales ciliados patógenos productores de la escuticociliatosis (géneros *Philasterides/Miamiensis* y *Uronema*) en peces marinos en cultivo. La vacuna está compuesta por trofozoitos de los ciliados inactivados con formol y emulsionados en un adyuvante de base oleosa. La vacuna administrada a peces infectados experimentalmente con los ciliados a concentraciones entre 10^4 - 10^8 células por mililitro, inactivadas con una concentración de formol menor del 1% y emulsionadas en adyuvante a concentraciones entre un 10 y 90%, generaron un elevado grado de protección.

ES 2 306 592 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de una vacuna frente a la escuticociliatosis en peces marinos en cultivo.

5 El objeto de la invención se refiere a la preparación de una vacuna que elimine el riesgo de infección por parásitos ciliados responsables de infecciones en peces marinos. Específicamente, una vacuna para su uso en el control de una enfermedad sistémica provocada por protozoos ciliados del Orden Philasterida (según la clasificación del *Phylum Ciliophora* propuesta por Denis Lynn en 2002) responsables de grandes mortalidades en plantas de cultivos de peces.

10 Los ciliados son organismos de vida libre que viven en el agua, el suelo, y también en la superficie o el interior de hospedadores animales utilizando diferentes relaciones simbióticas. La escuticociliatosis, producida por ciliados histiófagos, es una enfermedad infecciosa emergente en el cultivo de peces marinos como, por ejemplo, la platija, *Paralichthys olivaceus*, en Corea (Dis. Aquat. Org. 62: 233-238, 2004; Dis. Aquat. Org. 62: 239-249, 2004; Dis. Aquat. Org. 47: 49-55, 2001); y en el rodaballo, *Scophthalmus maximus*, en Europa (Dis. Aquat. Org. 18: 5-9, 1994; J. Fish Dis. 23: 33-37, 2004; Dis. Aquat. Org. 46: 47-55, 2001). La especie de escuticociliado responsable de las infecciones en rodaballos cultivados en piscifactorías del noroeste de España, ha sido identificada como *Philasterides dicentrarchi* por Iglesias y colaboradores en el año 2001 (Dis. Aquat. Org. 46: 47-55).

20 El escuticociliado *P. dicentrarchi* es un parásito facultativo que produce una escuticociliatosis fatal en peces marinos en cultivo como la lubina *Dicentrarchus labrax* (Eur. J. Protistol. 31: 327-340, 1995), o el rodaballo. Los peces infectados muestran úlceras cutáneas, oscurecimiento de la piel, alteraciones en la natación, exoftalmia y distensión abdominal como resultado de la acumulación de líquido ascítico en la cavidad corporal. Los ciliados aparecen en todos los órganos y tejidos de los rodaballos infectados, incluyendo la sangre y el fluido ascítico. Los estudios histopatológicos demostraron la presencia de encefalitis severas y meningitis (asociadas con diferentes grados de licuefacción del cerebro), necrosis del parénquima hepático, edemas severos de la pared intestinal, degeneración de las fibras musculares, hiperplasia del epitelio branquial, e inflamación vascular y perivascular.

30 Varias investigaciones realizadas en otras áreas de España, Portugal, Francia y en Corea también han detectado la presencia de brotes de infección por escuticociliados (Fol. Parasitol. 51: 177-187, 2004) en el rodaballo producidas por especies, inicialmente encuadradas en los géneros *Philasterides/Miamiensis*; aunque, estudios recientes, han demostrado que ambas especies son sinónimas (Parasitology 132: 555-564, 2006).

35 Aunque los ciliados *Philasterides/Miamiensis* pueden ser destruidos por tratamientos con formalina cuando se encuentra en el medio externo (Aquaculture 217: 73-80, 2003), sin embargo, no existe hasta la fecha ningún tratamiento terapéutico eficaz cuando el parásito se localiza en el interior del pez produciendo la enfermedad sistémica.

40 Una alternativa atractiva para solucionar el problema de la inexistencia de tratamientos farmacológicos contra la infección sería el desarrollo de herramientas profilácticas capaces de prevenir la infección por estos patógenos. Tradicionalmente, el desarrollo de vacunas ha supuesto el principal medio preventivo para controlar muchas enfermedades infecciosas. Hasta la fecha, no existe disponible ninguna vacuna comercial para el control de estos ciliados, lo que unido a la falta de medidas terapéuticas eficaces frente a esta infección, hace que las pérdidas económicas ocasionadas por estos en la acuicultura de peces planos sean muy considerables. Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar vacunas eficaces capaces de prevenir infecciones por estos patógenos y superar los inconvenientes mencionados previamente.

45 La invención describe un método eficaz para controlar las infecciones por protozoos escuticociliados a falta de otros recursos farmacológicos para paliar la infección sistémica una vez establecida en el pez. La solución proporcionada se basa en el desarrollo de una vacuna capaz de inducir una protección eficaz incrementando la resistencia a la infección sobre todo en peces predispuestos, como son los peces en cultivo intensivo.

50 Modo de realización

55 Para la preparación de la vacuna se han empleado aislamientos de *Philasterides/Miamiensis/Uronema* a partir de peces infectados naturalmente que han sido identificados en base a sus características morfológicas y biométricas. Esta identificación se confirmó posteriormente en base a la caracterización genética basada en el análisis de la secuencia nucleotídica del ADN genómico correspondiente al gen que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosómico (Parasitology 132: 555-564, 2006).

60 Los ciliados fueron aislados bajo condiciones asépticas de fluido ascítico, obtenido mediante abdominocentesis, de peces marinos con escuticociliatosis. Los ciliados fueron concentrados por centrifugación del fluido ascítico a 1000 g durante 5 minutos, lavados dos veces por resuspensión/centrifugación en medio L-15 incompleto preparado como se indica a continuación. El medio L-15 (Leibovitz) conteniendo L-glutamina fue obtenido de Sigma-Aldrich Chimie (Alemania) y fue preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, fue esterilizado mediante filtración por 0.22 μm . y se ajustó el pH a 7,2. Para preparar 1 litro de medio L-15 completo se disolvió cada vial de medio L-15 concentrado en 640 mL de agua bidestilada, se añadió 90 mg de adenosina, histidina y uridina, 150 mg de guanosina, 5 g de glucosa, 250 mL de una solución de lípidos (la solución de lípidos se preparó disolviendo 1.6 mg/mL de L- α -lecitina y 0.8 mg/mL de Tween 80 en agua bidestilada, calentándose la disolución a 80°C durante 1 hora), el pH final del medio fue ajustado a 7,2 y se esterilizó por filtración por 0.22 μm . Bajo condiciones estériles, este medio fue suplementado con 100 mL de suero sintético (concentración final del 10%), previamente inactivado por incubación

ES 2 306 592 A1

durante 30 minutos a 56°C y se le añadió una solución antibiótica estéril compuesta de 100 unidades de penicilina G, 0.1 mg/mL de sulfato de estreptomycin y 0.25 mg/mL de anfotericina B. Una alícuota de la suspensión resultante fue fijada con glutaraldehído (concentración final 0.25%), y el recuento de ciliados se realizó en un hemocitómetro. Tras el recuento, la densidad de la suspensión se ajustó a 10^6 trofozoitos/mL con medio L-15 incompleto y esta suspensión se empleó para las infecciones experimentales.

Peces de 50-100 g fueron inoculados intraperitonealmente con 10^3 ciliados/g de pez y se mantuvieron a una temperatura constante de 17-18°C. Tras 10 - 15 días o, alternativamente, cuando se observó la presencia de síntomas de la infección, se procedió al aislamiento de los ciliados a partir del fluido ascítico y los trofozoitos se cultivaron en el laboratorio para la producción de la vacuna o para su mantenimiento a largo plazo.

A continuación, y previamente a la preparación de la vacuna, se realizó un control de contaminación por otros microorganismos. Para ello, se procedió al cultivo del líquido ascítico conteniendo los ciliados en frascos de cultivo de 25 cm² en medio L-15 completo durante 24 horas a 23°C. Una vez comprobado que el cultivo era axénico, se procedió a la inoculación en frascos de cultivo de 250 cm² conteniendo 150 mL de medio L-15 completo, para mantenimiento en el laboratorio, y para la preparación de la vacuna, en matraces de 500 mL conteniendo 150 mL de medio L-15 completo y una suspensión 1/100 de un stock de células obtenidas de tejidos de animales que, una vez disgregadas y filtradas por mallas de 100 μ m, se sometieron a un ciclo de autoclave a 121°C durante 20 minutos. Para el mantenimiento en el laboratorio de los ciliados, los cultivos se incubaron a 18°C, mientras que para la producción de la vacuna, la temperatura de incubación de los cultivos fue de 23°C. La ventaja de la adición de células de animales y del incremento de la temperatura a 23°C está relacionada con un aumento muy significativo en la cinética de crecimiento de los ciliados. Además, la adición al cultivo de tejidos de animales inactivados por calor, presenta indudables ventajas tanto desde un punto de vista económico como de seguridad alimentaria. Tras una semana en cultivo y, después de comprobar al microscopio la inexistencia de las células utilizadas como suplemento en el medio de cultivo, se aislaron los ciliados para la producción de la vacuna. Bajo estas condiciones de cultivo, la densidad de ciliados suele alcanzar valores de alrededor de 10^6 trofozoitos/mL. En este momento, se centrifugó el contenido de los matraces en botellas de 250 mL a 1000 g durante 15 minutos y el precipitado se lavó una vez con medio L-15 incompleto, realizándose el recuento de ciliados del precipitado que se resuspendieron en el mismo medio a una concentración de 2×10^7 ciliados/mL. Los ciliados se lavaron una vez más a 1000 g durante 5 minutos y se resuspendieron finalmente en PBS conteniendo formalina a una concentración inferior al 1%, incubándose durante 1 hora a 4°C. Tras la inactivación se procedió a la emulsión con el adyuvante de base oleosa. Se añadió a 1 volumen de adyuvante, 1 volumen de una solución de ciliados inactivados a una concentración entre 10^8 y 10^4 células/mL en PBS. La emulsión se realizó en tubos de ensayo de 15 mL de polipropileno o vidrio mediante agitación suave hasta formarse una emulsión estable que se almacenó a 4°C hasta su uso.

La vacuna debe administrarse por inyección a los siguientes peces: rodaballo, platija, lenguado, dorada, lubina, parracho e hiramí. Los peces, de un peso entre 5-100 g, se inoculan con una carga antigénica de 10^4 - 10^8 ciliados/pez. La vacunación se administra en dos dosis, administrándose la segunda dosis entre 30-90 días tras la primera dosis.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Esquema del protocolo de vacunación empleado en el ejemplo 1.

Figura 2. Gráfico de Pareto para la variable supervivencia. La línea discontinua representa el valor de $\alpha = 0,05$. Las barras sólidas representan los factores analizados con efectos positivos y las barras vacías representan los factores con efectos negativos sobre la variable supervivencia. A: concentración de antígeno; B: concentración de formalina; C: concentración de adyuvante.

Figura 3.- Superficies de respuesta estimadas fijando el factor adyuvante (a), la concentración de ciliados (b) y la concentración de formaldehído en el centro del dominio experimental (0,0).

Figura 4. Esquema del protocolo de vacunación empleado en el ejemplo 2.

Figura 5. Efecto sobre los niveles de protección, determinados mediante la mortalidad acumulada en peces infectados experimentalmente, tras la vacunación con una única dosis antigénica.

Figura 6. Efecto sobre los niveles de protección, determinados mediante la mortalidad acumulada en peces infectados experimentalmente, tras la vacunación con dos dosis de vacuna.

Figura 7.- Duración de la protección tras la vacunación realizada según el protocolo descrito en la figura 4.

Figura 8.- Niveles de anticuerpos determinados mediante un ensayo ELISA doble indirecto obtenidos en los sueros de los peces tras la administración de la vacuna. Los resultados expuestos indican los valores medios \pm la desviación típica (n = 20).

Figura 9.- Efecto de la vacunación sobre el crecimiento de los peces.

ES 2 306 592 A1

Ejemplo 1

Para la optimización de la vacuna hemos realizado un diseño factorial completo 2x3 analizando la influencia de tres factores experimentales incluidos en la producción de la vacuna como son: a) el número de ciliados/mL; b) el porcentaje de formaldehído utilizado para la inactivación; c) el porcentaje de adyuvante empleado para la emulsión de la vacuna sobre la variable experimental supervivencia (porcentaje de mortalidad acumulado tras 18 días después de la infección experimental), Tabla 1. El protocolo de vacunación y determinación de eficacia (mortalidad) empleado está esquematizado en la Figura 1 y los efectos observados y modelizados de los factores analizados sobre la variable experimental estudiada (tasa de mortalidad acumulada) se muestran en la Tabla 2.

Los resultados presentados en la Tabla 2 indican que el test estadístico R^2 explica el 94,7946% de la variabilidad en la mortalidad. El test R^2 ajustado que estaría más indicado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, explicaría el 84,383% de la variabilidad de la mortalidad. El error absoluto medio de 3,16 indica el valor medio de los residuales.

TABLA 1

Resumen del sistema codificado utilizado en el diseño factorial para investigar los efectos de la concentración de ciliados (A), formaldehído (B) y adyuvante (C) empleados en la preparación de la vacuna

FACTORES	VALORES CODIFICADOS		
	-1,0	0,0	1,0
A: Concentración de parásitos (trofozoítos/mL)	10^4	10^5	10^6
B: Concentración de formol (%)	0,05	0,1	0,2
C: Concentración de adyuvante (proporción adyuvante/fase acuosa) (%)	50	70	90

ES 2 306 592 A1

TABLA 2

Valores de predicción de protección para la vacuna anti-*Philasterides/Miamiensis/Uronema* generados empleando el modelo experimental y el análisis de varianza ANOVA. La tabla incluye: (1) los valores experimentales observados; (2) la predicción para los valores esperados; (3) los valores residuales studentizados; (4) los coeficientes de regresión; (5) los valores de significación con una probabilidad menor del 90% ($P < 0.1$)

A	B	C	Observados	Estimados	Residuales studentizados	Término	Coficiente	Valor de P
1	1	1	0	-0,825	0,137888	Constante	18,8	
-1	1	1	56	54,175	0,307309	A	-19,625	0,079
1	1	-1	0	-0,825	0,13788	B	1,625	0,6359
-1	-1	-1	16	22,675	-1,28407	C	7,875	0,0843
0	0	0	17	18,8	-0,230556	AB	-2,625	0,4586
0	0	0	6	18,8	-2,38379	AC	-7,875	0,0843
1	-1	1	2	-0,825	0,482097	BC	-2,125	0,5416
-1	-1	1	56	54,175	0,307309			
-1	1	-1	33	22,675	2,70102			
1	-1	-1	2	-0,825	0,482097			

R2 = 94,7946%

R2 (ajustado para los grados de libertad) = 84,3838%

Error estándar de los estimados = 8,75309

Error absoluto medio = 3,16

Estadístico Durbin-Watson = 1,37318

A: concentración de ciliados/mL; B: formol (%); C: adyuvante (%)

El test estadístico Durbin-Watson compara los valores residuales para analizar la existencia de una correlación significativa basada en el orden en el cual están indicados los valores: valores inferiores a 1,4 indican que no existe ninguna influencia en el orden. Tras el análisis de varianza (ANOVA) se observa que 3 factores presentan valores de $P < 0.1$, indicando que son significativamente diferentes de 0 con un 90% de nivel de confianza.

La Tabla 3 indica la influencia de los datos en base a la existencia de valores experimentales mayores que 3 veces el valor medio de la observación, o que tienen un valor inusualmente elevado en el estadístico DFITS. En este caso, ningún dato medio posee un valor de influencia igual o inferior a 0.4 lo que indica que no existe ningún valor con 3 veces el valor medio de la observación; sin embargo existe un dato con un valor muy elevado de DFITS lo que indica que puede ser un punto de influencia en el modelo.

TABLA 3

Influencia de los datos sobre el modelo experimental

Fila	Influencia	Distancia Mehalanobis	DFITS
9	0,475	6,34921	2,56918
Influencia media de un único dato = 0,4			

ES 2 306 592 A1

En la Figura 2 se representa el histograma de frecuencia indicando la influencia de cada factor sobre la respuesta (mortalidad; M). La línea discontinua indica el nivel de significación del 90%. Factor A: concentración de ciliados/mL; Factor B: concentración de formaldehído (%); Factor C: Concentración de adyuvante (%). En el histograma se observa que el factor que mayor influencia posee a la hora de la protección de la vacuna es la concentración de parásitos (Factor A). La concentración de adyuvante y la combinación de la concentración de ciliados y la concentración del agente inactivador (AC) también poseen una influencia significativa, pero de mucha menor relevancia.

La influencia de los factores analizados sobre la protección de la vacuna se puede analizar gráficamente en las siguientes curvas de respuesta construidas con los coeficientes de regresión significativos. En la figura 3 (a, b y c) se representan las “superficies de respuesta derivadas del análisis de regresión de los datos obtenidos en el diseño factorial para investigar el efecto combinado de los factores concentración de ciliados/mL, porcentaje de formaldehído y porcentaje de adyuvante sobre la mortalidad (M en porcentaje) de peces vacunados e infectados experimentalmente”, utilizando la siguiente ecuación: $M (\%) = 18,8 + 19,625A + 7,875C - 7.875A$. Se puede observar que, a medida que se incrementa la concentración de ciliados en la vacuna (figura 3a), se obtiene una mayor protección frente a la infección. Esta protección también se incrementa cuando se disminuye la concentración de adyuvante (figura 3b), y es independiente de la concentración de formaldehído que se emplea para inactivar los ciliados (por lo menos en el rango de agente inactivador utilizado) (figura 3a, b).

Ejemplo 2

Se vacunaron peces siguiendo el esquema experimental indicado en la figura 4; determinándose los niveles de protección y la producción de anticuerpos.

Inicialmente no se observó mortalidad en los peces infectados con los ciliados en los 6 primeros días, pero a partir de este día comenzó a producirse la muerte de los peces. En el día 18 post-infección en los peces vacunados con una única dosis antigénica en adyuvante se obtuvo la máxima protección del 57% frente a los peces no vacunados (con una mortalidad acumulada del 80%). Sin embargo, no existieron diferencias significativas en los niveles de protección respecto a otros grupos de peces vacunados únicamente con el antígeno o en peces inmunizados exclusivamente con el adyuvante (figura 5).

Cuando se administró una segunda dosis de vacuna se observó que los niveles de mortalidad disminuyeron muy significativamente en los peces vacunados con la preparación antigénica emulsionada en adyuvante con respecto a los peces vacunados con una única dosis, obteniéndose un porcentaje de supervivencia del 77%, significativamente mayor que la presentada en los peces vacunados exclusivamente con adyuvante o con antígeno (figura 6).

Cuando se evaluó el tiempo de eficacia de la vacuna en los peces vacunados con dos dosis antigénicas se observó que los peces vacunados con los ciliados emulsionados en adyuvantes, presentaban un mayor grado de protección que los peces vacunados exclusivamente con adyuvante o que los peces no vacunados. (figura 7).

Los niveles de anticuerpos obtenidos en los peces se incrementaron muy significativamente en los peces vacunados con dos dosis antigénicas en combinación con el adyuvante respecto a los vacunados con una única dosis (figura 8).

Finalmente se analizó la influencia de la vacunación sobre el crecimiento de los peces. Como se observa en la figura 9, no existen diferencias en el crecimiento de los peces vacunados respecto a los no vacunados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de una vacuna anti-*Philasterides/Miamiensis/Uronema*, que comprende a) utilizar trofozoitos de los ciliados; b) inactivarlos con formol; y c) emulsionar la mezcla resultante en adyuvantes de base oleosa.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los ciliados de *Philasterides/Miamiensis/Uronema*, son previamente cultivados en medio Leibovitz L-15 suplementado con células de tejidos animales.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la concentración ciliados en la preparación vacunal es de entre 10^4 - 10^8 trofozoitos por mililitro de vacuna.
- 20 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la concentración del agente inactivador formol en la vacuna es menor del 1%.
- 25 5. Procedimiento según las reivindicación 1, **caracterizado** porque los ciliados inactivados se emulsionan en un adyuvante oleoso a una concentración de entre el 50-90%.
- 30 6. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 5, **caracterizado** porque se obtiene una emulsión estable adyuvante/preparación acuosa mediante agitación.
- 35 7. Vacuna, preparada según el procedimiento de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en la prevención de la escuticociliatosis de peces de cultivo marinos como, por ejemplo: rodaballo, platija, lenguado, dorada, lubina, parracho, hirami.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIGURA 1

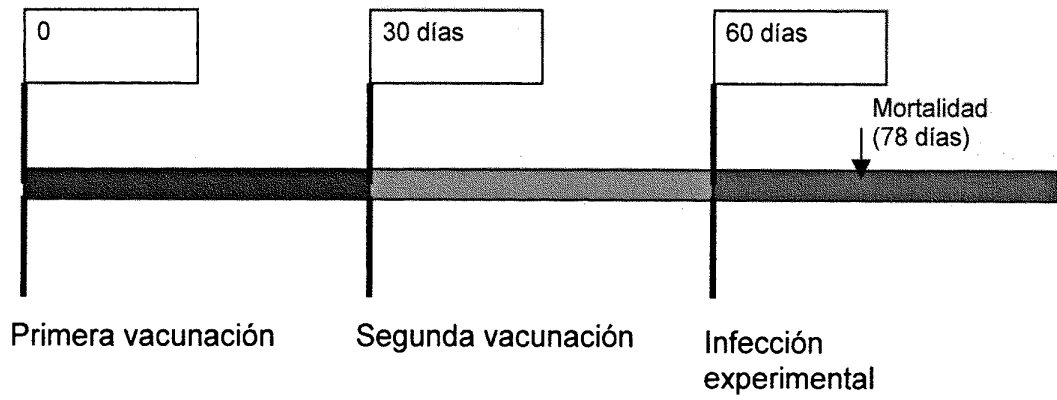


FIGURA 2

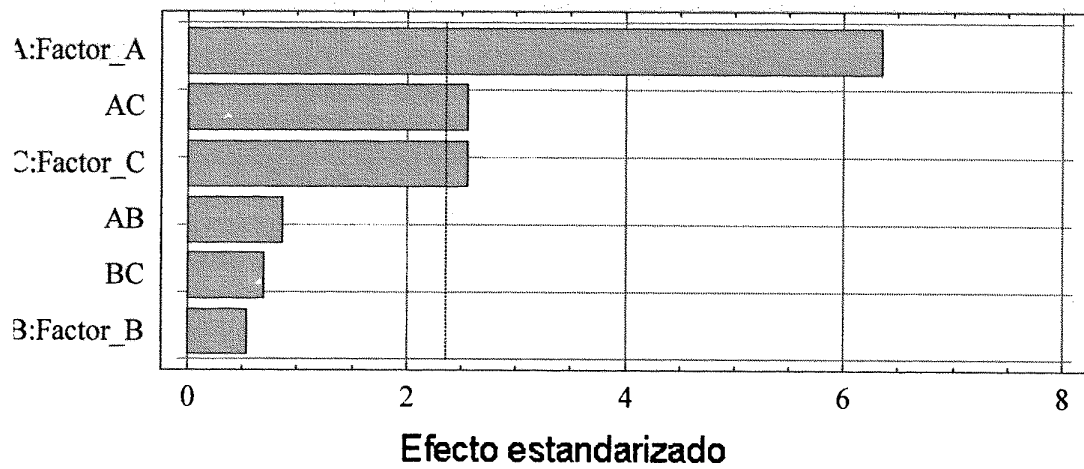


FIGURA 3

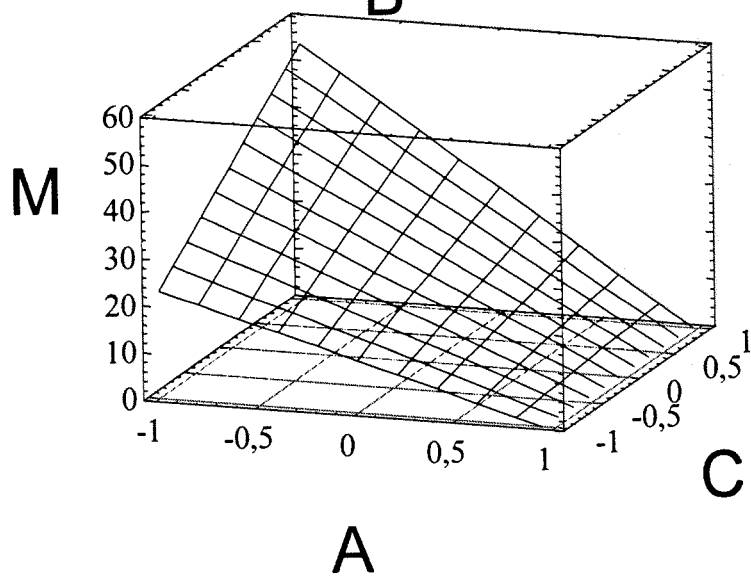
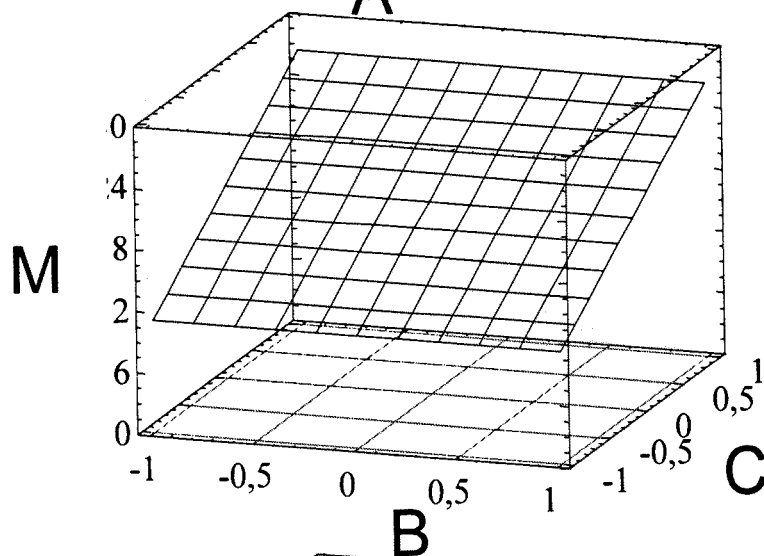
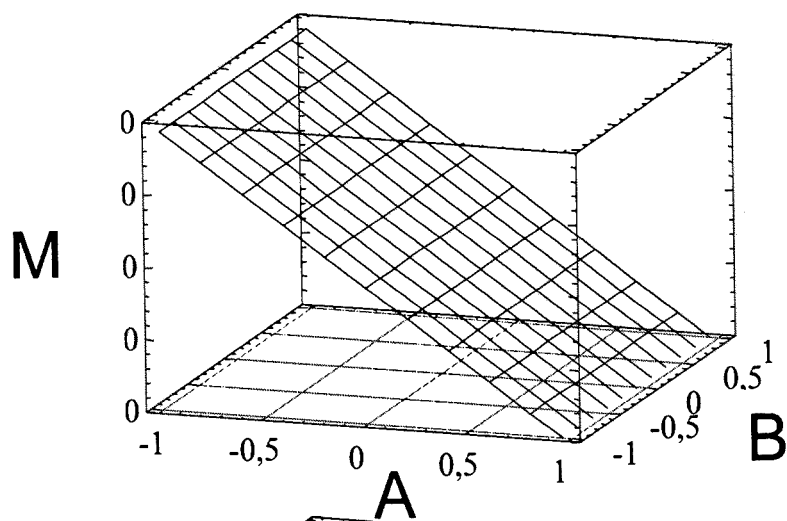


FIGURA 4

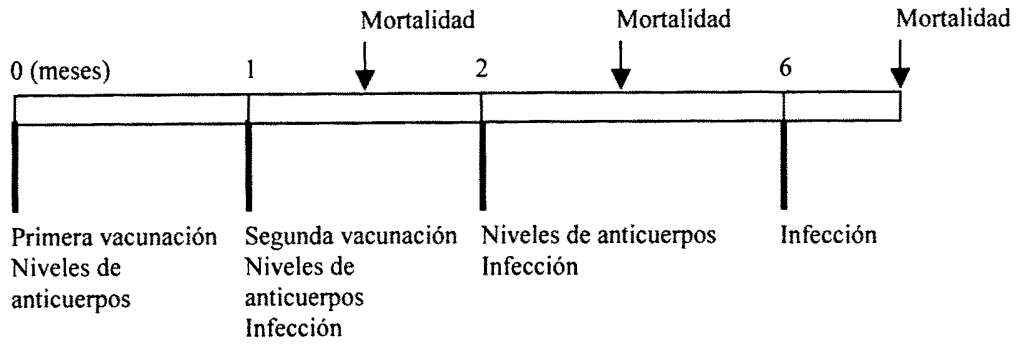


FIGURA 5

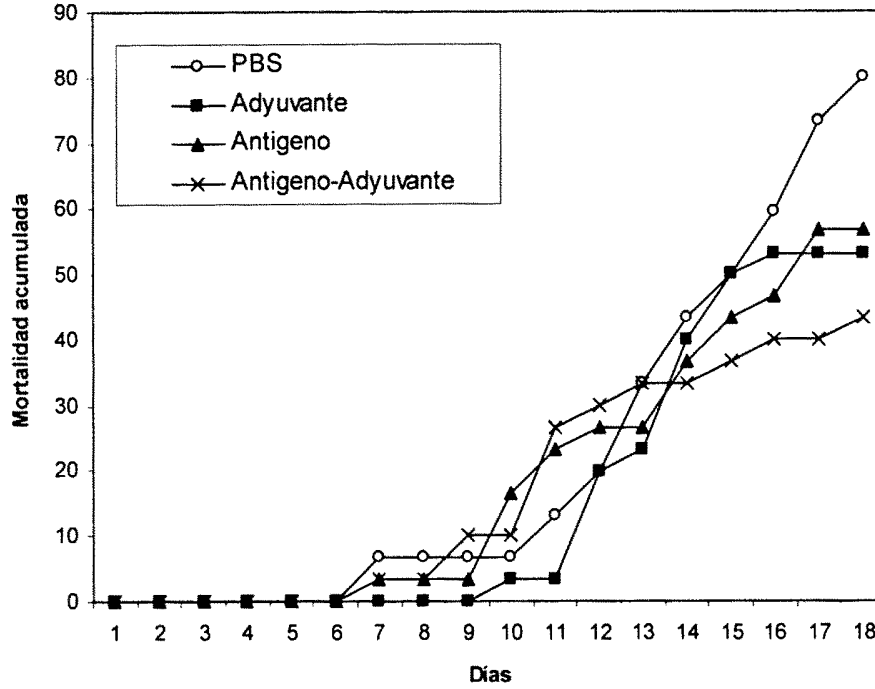


FIGURA 6

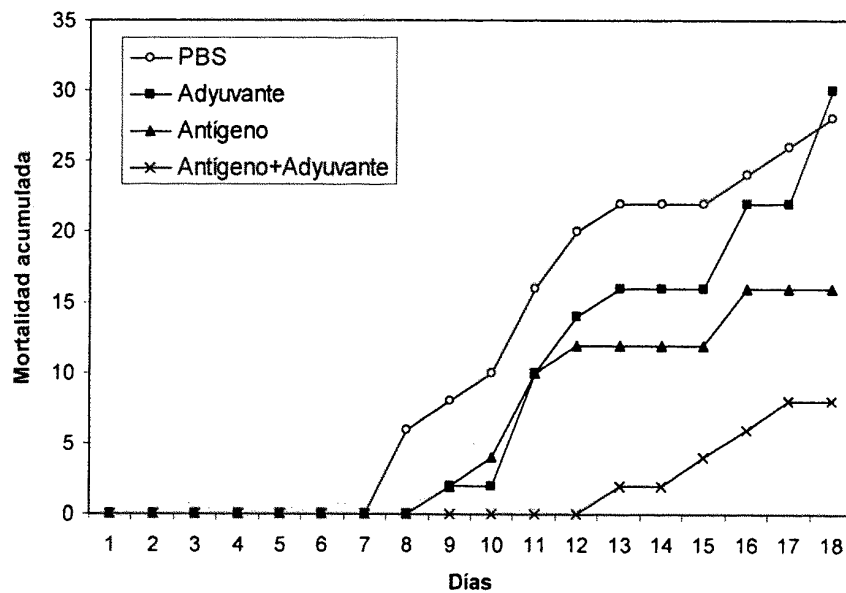


FIGURA 7

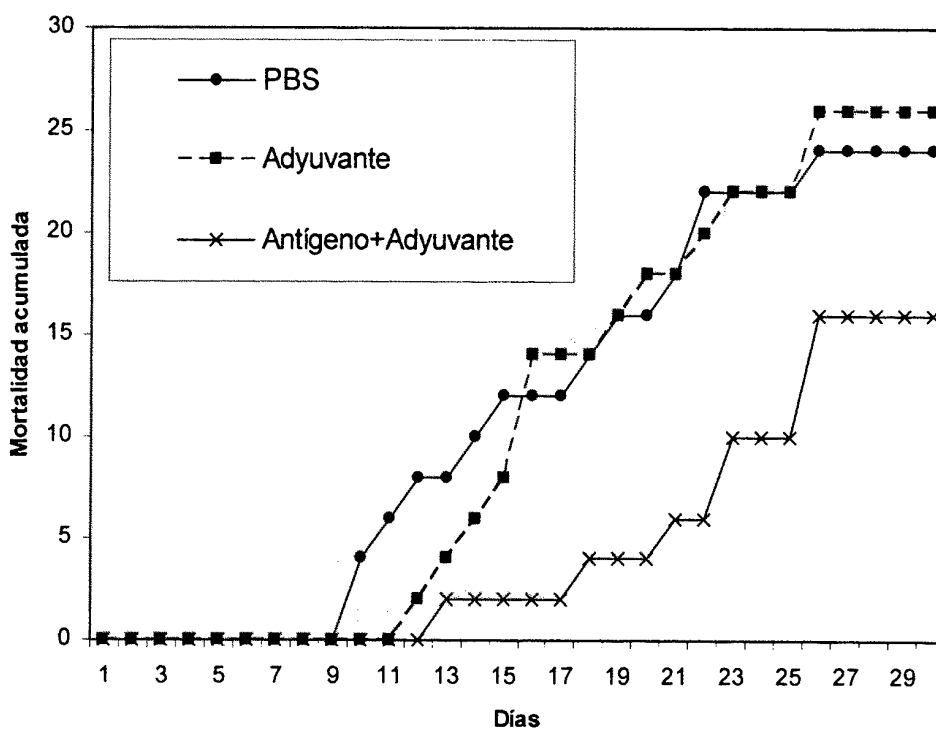


FIGURA 8

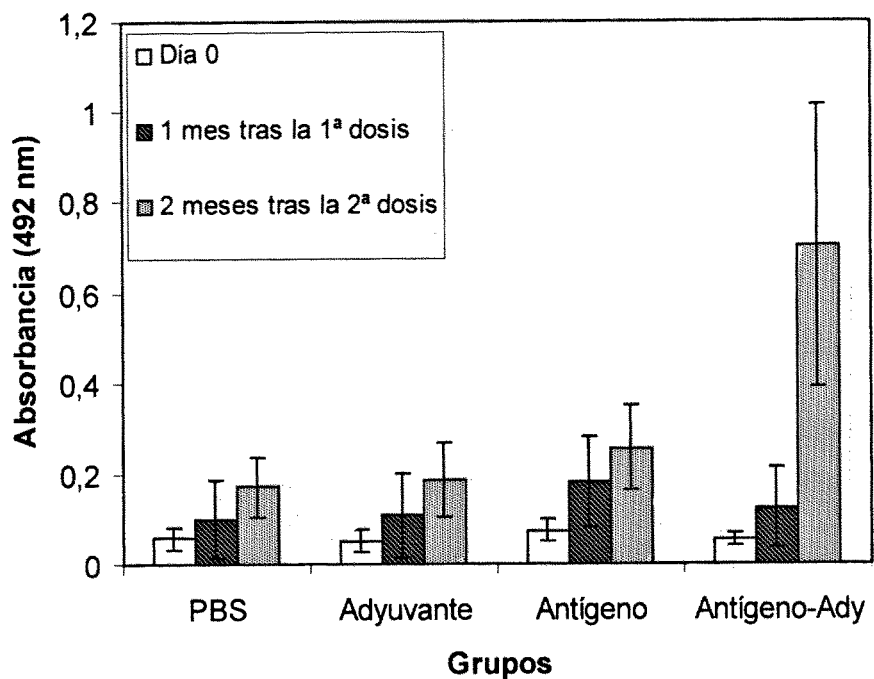
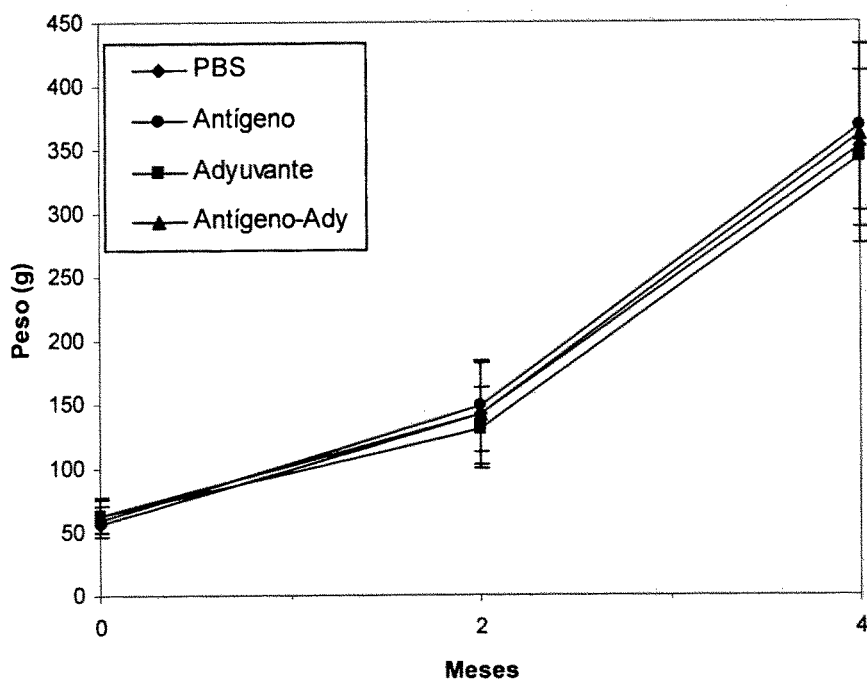


FIGURA 9





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 306 592

② Nº de solicitud: 200700172

③ Fecha de presentación de la solicitud: 12.01.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	IGLESIAS R. et al. Philasterides dicentrarchi (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune response in turbot. Parasitology, 2003, vol. 126, páginas 125-134.	1,3-7
Y		2
Y	ALVAREZ-PELLITERO, P. et al. Histophagous scuticociliatids (Ciliophora) parasitizing turbot Scophthalmus maximus: morphology, in vitro culture and virulence. Folia Parasitologica, 2004, vol. 51, páginas 177-187.	2
A	KR 20040039938 A (JUNG SUNG JU y OH MYUNG JOO) 12.05.2004, (resumen) [en línea] [recuperado el 20.05.2008] Recuperado de: EPOQUE Database.	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
08.10.2008

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 39/002 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C12N 1/10 (2006.01)