

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 719**

21 Número de solicitud: 202131002

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.10.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.04.2023

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio Emprendia s/n
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**SANTOS RODRÍGUEZ, Ysabel y
TORRES CORRAL, Yolanda**

74 Agente/Representante:

CAMIÑA TATO, Montserrat

54 Título: **Composición inmunogénica para la prevención de la tenacibaculosis marina causada por *Tenacibaculum maritimum* y *Tenacibaculum soleae* en peces, procedimiento de obtención y uso**

57 Resumen:

La invención describe una composición inmunogénica para la prevención de la tenacibaculosis marina, enfermedad que afecta a peces marinos y anódromos de gran valor comercial, su procedimiento de obtención y su uso frente a dicha patología.

ES 2 939 719 A1

DESCRIPCIÓN

Composición inmunogénica para la prevención de la tenacibaculosis marina causada por *Tenacibaculum maritimum* y *Tenacibaculum soleae* en peces, procedimiento de obtención y uso

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con la industria acuícola y consiste en una composición inmunogénica bivalente, su procedimiento de obtención y su uso para prevenir la tenacibaculosis marina causada por *Tenacibaculum maritimum* y *Tenacibaculum soleae*.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La tenacibaculosis marina (sinónimo flexibacteriosis marina) es una de las enfermedades bacterianas más importantes que afecta fundamentalmente a peces marinos a nivel mundial. La enfermedad afecta a una gran variedad de peces marinos y anádromos de gran valor comercial como el salmón atlántico, rodaballo, lenguado, lubina europea, y dorada en Europa, América, Asia y Oceanía (Avendaño-Herrera y col., 2006; Fernández-Álvarez y Santos, 2018; Santos y col., 1999; Toranzo y col., 2005). Estudios recientes (LeBreton, 2019) han puesto de manifiesto que la tenacibaculosis es, junto con la vibriosis, una de las enfermedades más importantes que afecta a los cultivos de peces marinos en Europa. Esta patología causa mortalidades que pueden llegar a superar el 20%, en los cultivos de especies marinas de gran valor comercial como el rodaballo, lenguado, lubina, dorada, besugo y salmón del Atlántico, cuyo volumen de producción mundial en los últimos años ha ascendido a 1.985.165 t, con un valor comercial de 10.871 millones de euros (FAO, 2020), lo que ha generado gran alarma en el sector productivo.

Los signos característicos de la enfermedad son lesiones ulcerativas sobre la piel de los peces, hemorragias y degradación del tejido de las aletas, que acaban produciendo la muerte de los peces o el deterioro de su aspecto externo, imposibilitando su comercialización (Fernández-Álvarez y Santos, 2018a).

Tenacibaculum maritimum ha sido considerado hasta hace poco el principal agente causal de la tenacibaculosis (Avendaño- Herrera y col., 2006; Cepeda y Santos 2002; Fernández-Álvarez y Santos, 2018; Santos y col., 1999; Toranzo y col., 2005), en la mayor parte de

especies de peces en cultivo. Sin embargo, en la actualidad, *T. maritimum* representa sólo el 50% de las cepas aisladas de los casos clínicos (Arnaud y col., 2018). Desde el año 2008, se han descrito otras especies del género *Tenacibaculum* como *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum discolor*, *Tenacibaculum dicentrarchi* y *Tenacibaculum gallaicum*, como
 5 agentes causantes de mortalidad en rodaballo y lenguado cultivados en Galicia (Piñeiro-Vidal y col., 2007; Piñeiro-Vidal y col., 2008 a y b, Piñeiro-Vidal y col., 2012), y *Tenacibaculum finnmarkense* como agente causal de tenacibaculosis en salmones cultivados en Noruega (Småge y col., 2016). Desde entonces la especie *T. soleae* ha sido aislada a partir de otras especies de peces como lubina (Castro y col., 2014), salmón
 10 Atlántico, rombo y acedía (López y col., 2010) en diferentes áreas geográficas y de ostra del Pacífico en Italia (Burioli y col., 2018). Actualmente *T. maritimum* y *T. soleae* son las principales especies causantes de tenacibaculosis en peces de interés comercial (lubina, dorada, rodaballo y lenguado) en España. (Castro y col., 2014; Fernández-Álvarez y Santos, 2018; Toranzo y col, 2005).

15 El tratamiento de la tenacibaculosis se realiza mediante la administración de antimicrobianos en la dieta, generalmente en combinación con desinfectantes externos (Avendaño-Herrera y col., 2006b). No obstante, el uso de antimicrobianos para el control de enfermedades en peces se encuentra limitado por restricciones, cada vez más elevadas, sobre el empleo de
 20 antibióticos en la acuicultura, así como por la rápida adquisición de resistencias a los fármacos observada en estas bacterias (Santos y col., 1999; Avendaño-Herrera y col., 2008; Van Gelderen y col., 2009). La alternativa más prometedora al uso de antimicrobianos es la prevención de la enfermedad mediante el uso de vacunas eficaces.

25 Para la prevención de la tenacibaculosis marina en peces se han evaluado a nivel experimental varias vacunas monovalentes anti-*T. maritimum* (Pazos, 1997; Romalde y col., 2005; Van Gelderen y col., 2009). Sin embargo, sólo la vacuna Icthiovac-Tm (Laboratorios HIPRA), desarrollada por nuestro grupo de investigación (Santos y col., 1999; Santos y Pazos, 2000, patente ES 2 139 549 B1), está disponible comercialmente para la prevención
 30 de la enfermedad en rodaballo. La vacuna administrada por inyección intraperitoneal en rodaballos confiere niveles de protección frente a *T. maritimum*, expresados como porcentaje de supervivencia relativa (RPS) superiores al 90% (Santos Rodríguez and Pazos Álvarez, 2000). El uso rutinario de esta vacuna en piscifactorías de rodaballo ha reducido la incidencia de la tenacibaculosis causada por *T. maritimum* serotipo O2 (García-Carballas,
 35 2018). Sin embargo, no se ha evaluado la eficacia de esta vacuna en la prevención de la tenacibaculosis causada por *T. maritimum* en otras especies de peces de interés comercial

(dorada, lubina, lenguado o salmón) y se desconoce si dicha vacuna confiere protección cruzada frente a otros serotipos de *T. maritimum* o frente a las otras especies de *Tenacibaculum* patógenas para peces. Además, estudios serológicos previos (Piñeiro-Vidal, 2008) han demostrado la falta de relación antigénica entre cepas de *T. maritimum* de diferentes serotipos y entre *T. maritimum* y las especies *T. soleae*, *T. discolor* y *T. gallaicum* (Fernández-Álvarez y col, 2018; Piñeiro-Vidal y col., 2007; Piñeiro-Vidal, 2008), sugiriendo que la vacuna anti-*T.maritimum* (ICTHIOVAC-TM) no conferiría protección frente a dichas bacterias.

Todo lo expuesto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar una composición inmunogénica para la prevención eficaz de la tenacibaculosis marina causada por *T. maritimum* y *T. soleae*.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con la industria acuícola, particularmente se relaciona con una composición inmunogénica bivalente que comprende las cepas CECT 30394 de *T. maritimum* y CECT 30393 de *T. soleae*, depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), para el control y la prevención de la tenacibaculosis marina en peces, el procedimiento de producción y el uso de esta.

Las cepas depositadas presentan las características típicas de la especie *Tenacibaculum*, siendo bacilos filamentosos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos, reductores de nitratos, e incapaces de producir ácido sulfhídrico. Son además negativas para las pruebas del indol y Voges-Proskauer. La cepa de la especie *T. maritimum* presenta además actividades amilasa, tripsina y quimiotripsina que están ausentes en la cepa de *T. soleae*. Las especies *T. maritimum* y *T. soleae* son homogéneas a nivel fenotípico y presentan variabilidad serológica y genética (Fernández-Álvarez y Santos 2018; Fernández-Álvarez, 2019, Santos y col. 1999).

La administración por inmersión de los peces en la composición diluida 1:1000 en agua de mar (2 baños de 2 minutos, separados por un intervalo de cuatro semanas) o por inyección (dosis de 0,1 mL/pez) confiere a los peces niveles de protección elevados (RPS=70-100%) frente a la tenacibaculosis marina causada por ambas especies patógenas

Esta composición inmunogénica desarrollada supone una ventaja con respecto a las vacunas monovalentes experimentales descritas o la vacuna comercial ICTHIOVAC-TM ya que permite:

5 1) Mejorar la cobertura antigénica al incluir cepas de las especies *T. maritimum* y *T. soleae*, principales causantes de tenacibaculosis a nivel mundial.

2) Proteger frente a la tenacibaculosis causada por *T. maritimum* y *T. soleae* a especies de peces de gran interés comercial.

10

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a las cepas *T. maritimum* y *T. soleae* depositadas en la CECT con número de registro 30394 y 30393, respectivamente.

15 En un segundo aspecto, esta invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende las cepas CECT 30394 y CECT 30393 inactivadas. Por cepas inactivadas se entienden aquellas cepas que han sido sometidas a un tratamiento físico o químico que las transforma en una forma incapaz de replicarse.

20 En una realización preferida, la composición inmunogénica tiene una concentración de las cepas inactivadas de entre 5×10^9 y 5×10^{10} células/mL de composición final. Preferentemente, la composición inmunogénica comprende células bacterianas de las cepas inactivas a una concentración de 3×10^{10} células/mL.

25 Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende las cepas CECT 30394 y CECT 30393 inactivadas y, adicionalmente, al menos, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente un adyuvante, que se puede seleccionar de entre cualquiera de los siguientes: compuestos oleosos como el adyuvante de Freund completo (FCA), adyuvante de Freund incompleto (FIA), Eolane 130, Montanide ISA y Titermax, compuesto inorgánicos como alginatos, sales de aluminio y potasio (fosfato de aluminio y potasio e hidróxido de aluminio), nanopartículas PLGA, liposomas, microesferas biodegradables, complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) como saponinas, fosfolípidos, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como oligodeoxinucleótidos CpG ODN, flagelina, polisacáridos bacterianos (LPS) y otros agentes moduladores de la respuesta inmune como levamisol, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium*
35 *butyricum*, *Mycobacterium chelonae*, paredes celulares de micobacteria, quimiocinas,

quitosano, sesquioleato de sorbitano, vitamina C, vitamina E, o cualquier combinación de los mismos.

En esta memoria descriptiva se entiende por adyuvante cualquier agente que incorporado a una vacuna estimula el sistema inmunitario, aumentando la magnitud, amplitud y duración de la respuesta inmunitaria.

La composición se puede presentar bajo cualquier forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. Preferentemente, la administración se realiza por inmersión o inyección. La cantidad terapéuticamente efectiva administrada por inyección oscila entre 0,05 y 0,2 mL por pez. Preferentemente, la cantidad terapéutica efectiva es de 0,1 mL por pez. La dilución terapéuticamente efectiva administrada por inmersión oscila entre 1:500 y 1:1000. Preferentemente, la dilución terapéutica efectiva es 1:1000.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a la composición inmunogénica de la presente invención para su uso en animales, específicamente en peces. Preferiblemente en salmón atlántico (*Salmo salar*), salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lenguado (*Solea solea* y *Solea senegalensis*), lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), bacalao (*Gadus morhua*), rombo (*Scophthalmus rhombus*) y/o acedía (*Dicologlossa cuneata*).

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a las cepas CECT 30394 y CECT 30393 en una composición farmacéutica de la presente invención o en una composición veterinaria de la presente invención para su uso como vacuna en la prevención y el control de la tenacibaculosis marina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a las cepas CECT 30394 y CECT 30393 en una composición farmacéutica de la presente invención o en una composición veterinaria de la presente invención para su uso en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o control de la tenacibaculosis marina.

Otro aspecto de la invención se refiere al anticuerpo obtenido tras la inmunización de un animal con esta composición inmunogénica para su uso en la prevención y/o control de la tenacibaculosis marina. Preferentemente el animal empleado para la inmunización es un

pez, que se puede seleccionar de entre cualquiera de los siguientes: salmón atlántico (*Salmo salar*), salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lenguado (*Solea solea* y *Solea senegalensis*), lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), besugo (*Pagellus bogaraveo*),
 5 bacalao (*Gadus morhua*), rombo (*Scophthalmus rhombus*) y/o acedía (*Dicologlossa cuneata*).

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento de producción de la composición inmunogénica que comprende el cultivo de células bacterianas de las cepas *T. maritimum* y
 10 *T. soleae* según se describe en el presente documento, la inactivación de las células bacterianas, la recuperación de las células bacterianas mediante centrifugación o filtración y la suspensión de las células bacterianas.

El medio de cultivo utilizado para el cultivo de las células bacterianas CECT 30394 y CECT
 15 30393 se puede seleccionar de cualquiera de los siguientes: caldo Luria Bertani (LB) y caldo Mueller Hinton (MH) diluidos con agua de mar sintética, caldo marino (CM), caldo FMM, caldo FMM con 0,5% de glucosa, caldo FMM con 0,5% de sacarosa (FMM-S). Preferiblemente el medio utilizado será FMM-S.

La inactivación de las células bacterianas CECT 30394 y CECT 30393 se realiza por
 20 cualquiera tratamiento físico o químico que transforme las cepas en una forma incapaz de replicarse. Preferiblemente la inactivación se realizará mediante el uso de formaldehído y/o calor. Preferiblemente la concentración de formaldehído estará entre 0,30% – 0.35%. Más preferiblemente la concentración será de 0,35%. El tiempo para conseguir la inactivación
 25 mediante el uso de formaldehído es de entre 120 y 180 minutos. Preferiblemente el tiempo para conseguir la inactivación será de 180 minutos. La temperatura para conseguir la inactivación será de entre 20 y 25 grados centígrados. Siendo, preferiblemente, la temperatura de inactivación de 25 grados centígrados.

En el caso del uso de calor para la inactivación preferiblemente las temperaturas estarán
 30 entre 80 y 100 grados centígrados. Siendo, preferiblemente, la temperatura de inactivación de 100 grados centígrados. El tiempo para conseguir la inactivación mediante el uso de calor es de entre 45 y 60 minutos. Preferiblemente el tiempo para conseguir la inactivación será de 60 minutos.

La recuperación de las células bacterianas CECT 30394 y CECT 30393 se puede realizar por centrifugación, microfiltración o ultrafiltración. Preferiblemente la recuperación se realizará por centrifugación.

- 5 La velocidad de centrifugación para la recuperación estará entre 10000 y 12000 rpm. Siendo, preferiblemente, la velocidad de centrifugación de 10000 rpm.

Los métodos de filtración pueden elegirse entre microfiltración y filtración tangencial. Siendo, preferible, la filtración tangencial.

10

La suspensión de las células recuperadas se realizará en cualquier medio líquido que permita su conservación. Preferentemente los medios elegidos serán solución salina (0,9% NaCl) y tampón fosfato salino (PBS) con formaldehído. Más preferentemente el medio elegido será tampón fosfato con formaldehído. La densidad óptica de la suspensión medida a 620 nm será de entre 0,5 y 0,8. Siendo, preferiblemente A_{620} de 0,7.

15

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para uso en la inducción de una respuesta inmune en peces, que comprende la composición inmunogénica antes descrita y, opcionalmente, instrucciones relacionadas con la administración.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG 1. Crecimiento de *Tenacibaculum maritimum* CECT 30394 y *Tenacibaculum soleae* CECT 30393 en el medio FMM con y sin suplemento de los azúcares glucosa (FMM-G) y sacarosa (FMM-S), que muestra un mejor crecimiento en el medio FMM-S. Los resultados se expresan como la masa celular determinada mediante espectrofotometría (A_{620}) y como células totales/mL.

25

FIG 2. Eficacia de la vacuna bivalente administrada por inmersión en rodaballo, lenguado, dorada y lubina, expresada como porcentaje relativo de supervivencia (RPS).

30

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

El propósito de los ejemplos indicados a continuación es ilustrar la invención sin por ello limitar el alcance de esta.

35

Ejemplo 1. Optimización de las condiciones para el cultivo de *Tenacibaculum maritimum* y *Tenacibaculum soleae*.

Para seleccionar las condiciones óptimas para el cultivo de *T. maritimum* y *T. soleae*, se valoró si la incorporación de azúcares (glucosa o sacarosa) a los medios mejora el crecimiento de las cepas CECT30394 y CECT 30393. Para ello, se utilizaron inóculos diluidos 1/100, para iniciar los cultivos de *T. maritimum* CECT30394 y *T. soleae* CECT 30393 en el medio de cultivo FMM y en el medio FMM suplementado con glucosa (0,5 g/L) (FMM-G) o con sacarosa (0,5 g/L) (FMM-S). Todas las pruebas de crecimiento se realizaron por triplicado. En el momento de inicio del estudio ($t=0$) y a intervalos regulares se tomaron muestras de los cultivos (5mL) durante las 48 horas posteriores a la inoculación. Estas muestras del cultivo se utilizaron para evaluar el pH y determinar la masa celular mediante espectrofotometría (A_{620}), el número de células viables por el método de siembra en placa y el número de células totales mediante recuento microscópico con cámara Neubauer (Brand™ Bürker). Los resultados fueron analizados utilizando los programas estadístico Excel y SPSS V. 22 (IBM).

Los resultados de este ensayo mostraron que las condiciones óptimas de cultivo de las cepas de *T. maritimum* CECT 30394 y *T. soleae* CECT 30393 eran la incubación a 25°C durante 48 horas en el medio FMM (Laboratorio Conda SA, Madrid, España) suplementado con 0,5 g/L de sacarosa (Sigma Aldrich, España) (FMM-S). En estas condiciones, los cultivos de *T. maritimum* CECT 30394 alcanzan una densidad celular $8,5 \times 10^{10}$ células totales por mililitro (A_{620} : 0,715) (Figura 1), mientras que cultivos de *T. soleae* CECT 30393 alcanzan una densidad celular de $5,6 \times 10^{10}$ células totales por mililitro (A_{620} : 0,576) (Figura 1). Los resultados concordantes entre ambas bacterias demuestran que las condiciones y medio de cultivo descritas son las idóneas para el desarrollo de la vacuna.

Ejemplo 2. Procedimiento para la obtención e inactivación de los cultivos bacterianos de las cepas de *T. maritimum* y *T. soleae* constituyentes de la vacuna que comprende las siguientes etapas:

- a) Obtención de un inóculo en fase logarítmica de crecimiento (24 h de incubación a 25°C con agitación orbital 100 rpm) de las cepas de *T. maritimum* CECT 30394 y *T. soleae* CECT30393 mediante cultivo en caldo FMM-S.
- b) Inoculación de matraces de 6 litros, conteniendo tres litros del caldo FMM-S, con 30 mL de los inóculos de las cepas de *T. maritimum* CECT 30394 y de *T. soleae* CECT

30393 e incubación a 25°C con agitación orbital (100 rpm) en condiciones aeróbicas (0,25 L/min) durante 48h.

- 5 c) Inactivación de los cultivos bacterianos por adición de formaldehído a una concentración final de 0,35 % e incubación a 25°C con agitación durante 180 minutos, al cabo de las cuales se transfieren los cultivos a 4°C. Después de 24h a 4°C, se centrifugan los cultivos (10.000 rpm durante 30 min), se desecha el sobrenadante, y el precipitado celular se suspende en tampón fosfato salino (PBS, cloruro sódico, 8 g/L; cloruro potásico 0,3 g/L; fosfato sódico 0,73 g/L; fosfato mono potásico 0,2 g/L; pH 7,4) con formol a una concentración final del 0,15% (v/v) (PBS-0,15).
- 10 d) La vacuna bivalente anti-*T. maritimum*-*T. soleae* se prepara mezclando volúmenes iguales de las suspensiones en PBS-0,15 de las cepas *T. maritimum* CECT 30394 y de *T. soleae* CECT30393. La mezcla vacunal se ajusta a una densidad óptica de 0,7 a una longitud de onda de 620 nm (Absorbancia a 620 nm, A_{620}). La solución vacunal resultante contiene aproximadamente 3×10^{10} células/mL.
- 15 e) El control de esterilidad de las vacunas se lleva a cabo sembrando la mezcla vacunal en placas de agar FMM-S, placas de agar marino (AM) y placas de agar triptona de soja (TSA) con NaCl a una concentración final de 1% (TSA-1) y en tubos de caldo tioglicolato, e incubando durante 72 horas a 25 y 37°C. La vacuna se conserva a 4°C hasta su utilización. El control de especificidad se realiza mediante aglutinación en portaobjetos, utilizando el anti-suero obtenido en conejo frente a las cepas CECT 20 30394 y CECT 30393 y como antígeno las células bacterianas inactivadas empleadas en la fabricación de la vacuna.
- 25 f) La inocuidad de la vacuna se evalúa en peces mediante inyección intraperitoneal (i.p.) (0,2 mL) o inmersión (dilución 1:500) de una dosis doble de las vacunas y evaluación de su efecto durante 21 días.

Ejemplo 3. Evaluación de la eficacia de la vacuna bivalente elaborada con las cepas de *Tenacibaculum maritimum* CECT 30394 y *Tenacibaculum soleae* CECT 30393 en modelos animales.

- 30 La eficacia de la vacuna se evaluó mediante ensayo experimental utilizando como modelos peces planos (rodaballo y lenguado) y fusiformes (dorada y lubina). En los ensayos de vacunación se utilizaron rodaballos (peso medio 3.06 ± 0.78 g), lenguados (peso medio 0.71 ± 0.17 g), doradas (peso medio 7.58 ± 2.26 g) y lubinas (peso medio 3.17 ± 0.96 g). Para

estos estudios se utilizaron el número de peces recomendados por la European Pharmacopoeia 7.0, 2010.

Los peces se vacunaron por inmersión o inyección y posteriormente se llevó a cabo una infección experimental utilizando cepas heterólogas de *T. maritimum* y *T. soleae*.

5 **a) Administración por inmersión.** Para ello, los peces se sumergen durante 2 minutos en la vacuna diluida 1:1000 en agua de mar con fuerte aireación y se devuelven a continuación al tanque de cultivo. Transcurridas cuatro semanas se administra una dosis de recuerdo utilizando el mismo procedimiento.

10 **b) Administración por inyección.** Para ello, se anestesian los peces con el anestésico Tricaina metanosulfonato (MS-222, Sigma) a una concentración de 60 mg/L y se inoculan por vía intraperitoneal con una dosis de 0,1 mL/pez de la vacuna sin diluir.

La eficacia de la vacuna administrada por baño se evaluó mediante infección por baño, sumergiendo los peces (vacunados o control) durante 1 h en una suspensión bacteriana de la bacteria a evaluar (*T. maritimum* o *T. soleae*).

15 La eficacia de la vacuna administrada por inyección se evaluó mediante inyección de 0,1 mL de una suspensión de la especie bacteriana a evaluar (*T. maritimum* o *T. soleae*). Para este ensayo, los peces se anestesiaron previamente con tricaína (MS-222 Sigma Aldrich).

Finalizados los retos infecciosos se determinó el porcentaje relativo de supervivencia (Amend, 1981; European Pharmacopoeia 7.0, 2010). Para ello, se trazaron curvas de mortalidad específicas en función del tiempo transcurrido desde la infección experimental tanto para el grupo vacunado como para el grupo de control. Estas curvas se utilizaron para interpolar el porcentaje de mortalidad específica en el grupo vacunado en el tiempo en el cual se alcanza el 60% de mortalidad específica en el grupo control (M) y calcular el porcentaje relativo de supervivencia (RPS) utilizando la siguiente expresión (European Pharmacopoeia 7.0, 2010):

$$\text{RPS} = (1 - M/60) \times 100$$

Además, la existencia de diferencias significativas en la supervivencia entre los grupos vacunados y los grupos control expuestos a una infección experimental, se verificó mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2 , $p < 0,05$).

La vacuna administrada por inmersión (2 baños de 2 min, separados por un intervalo de cuatro semanas) (Figura 2) o por inyección (dosis de 0,1 mL) confiere a los peces niveles de

protección elevados (RPS=70-100%) frente a la tenacibaculosis marina causada por ambas especies patógenas.

BIBLIOGRAFÍA

- 5 Arnaud M, Moalic PY, Bourgeois F, Carpentier R, Le Breton A. 2018. AQUA 2018, 25– 29 August, Montpellier, France.
- Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Magariños B. 2006a. Dis Aquat Org 71:255–266
- Avendaño-Herrera R, Magariños B, Irgang R, Toranzo AE. 2006b. Dis Aquat Org 71:255–266
- 10 Avendaño-Herrera R, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE. 2008. Aquac Int 16(1):1–11
- Burioli E, Varello K, Trancart S, Bozzetta E, Gorla A, Prearo M, Houssin M. 2017. Journal of Fish Diseases. 41. 10.1111/jfd.12698.
- Castro N, Balboa S, Núñez S, Toranzo AE, Magariños B. 2014. Fish Pathol 49(1):16–22
- Cepeda C, Santos Y. 2002. Bull Eur Assoc Fish Pathol 22(6):388–392
- 15 FAO. 2020. Roma 348 pp. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9692es>.
- Fernández-Álvarez C, Santos Y. 2018. Appl Microbiol Biotechnol 102: 9973–9989
- Fernández-Álvarez C, González SF, Santos Y. 2019. Aquaculture 498(1):289–296
- García-Carballas, 2018. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela)
- 20 Le Breton A. 2019. <http://www.medaaid-h2020.eu/index.php/2019/02/05/tenacibaculosis/>
- López JR, Piñeiro-Vidal M, García-Lamas N, De La Herran R, Navas JI, Hachero-Cruzado I, Santos Y. 2010. J Fish Dis 33(3):273–278.
- Pazos F. 1997. Tesis doctoral, Universidad Santiago de Compostela (Santiago de Compostela)
- 25 Piñeiro-Vidal M 2008. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela).
- Piñeiro-Vidal M, Centeno-Sestelo G, Riaza A, Santos Y.2007. Bull Eur Assoc Fish Pathol 27(1):29–35
- Piñeiro-Vidal M, Riaza A, Santos Y.2008a. Int J Syst Evol Microbiol 58(1):21–25
- 30 Piñeiro-Vidal M, Carballas CG, Gómez-Barreiro O, Riaza A, Santos Y.2008b. Int J Syst Evol Microbiol 58(4):881–885
- Piñeiro-Vidal M, Gijón D, Zarza C, Santos Y.2012. Int J Syst Evol Microbiol 62(2):425–429
- Romalde J, Ravelo C, López-Romalde S, Avendaño-Herrera R, Magarinos B, Toranzo A. 2005. Developments in biologicals. 121. 85-95.
- 35 Santos Y, Pazos F, Barja JL.1999. In: ICES identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish N° 55, International Council for the Exploration of the Sea. ICES, Denmark,

pp 1–6

Småge SB, Brevik ØJ, Duesund H, Ottem KF, Watanabe K, Nylund A. 2016. Antonie Van Leeuwenhoek. 2016 Feb;109(2):273-85. doi: 10.1007/s10482-015-0630-0. Epub 2015 Dec 11.

- 5 Santos y Pazos, 2000. Patente nº ES 2 139 549 B1, Universidade de Santiago de Compostela. <https://consultas2.oepm.es/InvenesWeb/detalle?referencia=P9801549>.

Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL. 2005. Aquaculture 246, 37–61.

Van Gelderen R, Carson J, Gudkovs N, Nowak B. 2010. J Appl Microbiol 109(5):1668–1676.

European Pharmacopoeia Commission Monograph, 7.0 2010

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición inmunogénica caracterizada porque comprende una combinación de células bacterianas de las cepas CECT 30394 de *T. maritimum* y CECT 30393 de *T. soleae* y una solución tampón.
- 10 2. Composición inmunogénica, según reivindicación 1, donde las células bacterianas CECT 30394 de *T. maritimum* y CECT 30393 de *T. soleae* se encuentran a una concentración entre $5 \cdot 10^9$ y $5 \cdot 10^{10}$ células/mL.
- 15 3. Composición inmunogénica, según reivindicaciones 1 y 2, donde las células bacterianas de CECT 30394 y CECT 30393 se encuentran a una concentración de $3 \cdot 10^{10}$ células/mL.
4. Composición inmunogénica, según reivindicaciones 1 a 3, donde las células bacterianas son inactivadas con formaldehído y/o calor.
- 20 5. Composición inmunogénica, según reivindicación 4, donde las células bacterianas son inactivadas con formaldehído.
6. Composición inmunogénica, según la reivindicación 1 a 5, donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es un adyuvante.
- 25 7. Composición inmunogénica, según reivindicación 6, en donde el adyuvante se selecciona de la lista que consiste en: compuestos oleosos como adyuvante de Freund completo (FCA), adyuvante de Freund incompleto (FIA), Eolane 130, Montanide ISA y Titermax, compuestos inorgánicos como alginatos, sales de aluminio y potasio (fosfato de aluminio y potasio e hidróxido de aluminio), nanopartículas PLGA, liposomas, microesferas biodegradables, complejos immunoestimulantes (ISCOMs) como saponinas, fosfolípidos, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como oligodeoxinucleótidos CpG ODN, flagelina, polisacáridos bacterianos (LPS) y otros agentes moduladores de la respuesta inmune como levamisol, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium*
- 30 *butyricum*, *Mycobacterium chelonae*, paredes celulares de micobacteria,
- 35

quimiocinas, quitosano, sesquioleato de sorbitano, vitamina C, vitamina E, o cualquier combinación de los mismos.

- 5 8. Composición inmunogénica, según reivindicación 7, en la que el adyuvante es un compuesto oleoso
9. Anticuerpo obtenible tras la inmunización de un animal con la composición inmunogénica según reivindicaciones 1 a 8.
- 10 10. Anticuerpo obtenible, según la reivindicación 9, donde el animal empleado para la inmunización es un pez.
11. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
15 i. Cultivar células bacterianas de las cepas CECT 30394 y CECT 30393 en un medio de cultivo que permita su crecimiento.
 ii. Inactivación de las células bacterianas
 iii. Recuperación de las células bacterianas
 iv. Suspensión de las células bacterianas
20
12. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 11, donde el medio de cultivo se selecciona de la lista consistente en: caldo Luria Bertani (LB) y caldo Mueller Hinton (MH) diluidos con agua de mar sintética, caldo marino (CM), caldo FMM, caldo FMM con 0,5% de glucosa (FMM-G),
25 caldo FMM con 0,5% de sacarosa (FMM-S).
13. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 12, donde el medio de cultivo es caldo FMM con 0,5% de sacarosa (FMM-S).
- 30 14. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según las reivindicaciones 11 a la 13, donde la inactivación de las células bacterianas se produce por formaldehído y/o calor

15. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 14, donde la inactivación de las células bacterianas se produce por formaldehído
- 5 16. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 15, donde la concentración del formaldehído está entre 0,30 y 0,35%.
- 10 17. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 16, donde la concentración del formaldehído es de 0,35%.
- 15 18. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según reivindicaciones 14 a 17, donde el tiempo para la inactivación está entre 2 y 3 horas.
- 20 19. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 18, donde el tiempo para la inactivación es de 3 horas.
- 20 20. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según las reivindicaciones 11 a 19, donde la temperatura para la inactivación está entre 20°C y 25°C.
- 25 21. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 20, donde la temperatura para la inactivación es de 25°C
- 25 22. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 14, donde la temperatura para la inactivación por calor está 80°C y 100°C.
- 30 23. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 22, donde la temperatura para la inactivación por calor es de 100°C.
- 35 24. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según reivindicaciones 22 a 24, donde el tiempo para la inactivación está entre 45 y 60 min.

25. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 24, donde el tiempo para la inactivación son 60 minutos.
- 5 26. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según reivindicaciones 11 a 26, donde la recuperación de las células bacterianas se realiza a través de una de las siguientes técnicas: centrifugación y ultrafiltración
- 10 27. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 26, donde la recuperación de las células bacterianas se realiza a través de centrifugación.
28. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 27, donde la centrifugación se produce a 10000-12000 rpm.
- 15 29. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 28, donde la centrifugación se produce a 10000 rpm.
- 20 30. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según reivindicaciones 11 a 29, donde la suspensión se realiza en solución salina y tampón fosfato salino (PBS) con formaldehído.
- 25 31. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 30, donde la suspensión se produce en tampón fosfato con formaldehído.
32. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 31, donde el formaldehído se encuentra a una concentración entre 0,10 y 0,20%
- 30 33. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 31, donde el formaldehído se encuentra a una concentración de 0,15%
- 35 34. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según reivindicaciones 30 a 33, donde tras la suspensión la densidad óptica a 620 nm está entre 0,5 y 0,8.

- 5
35. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 34, donde tras la suspensión la densidad óptica a 620 nm es de 0,7.
36. Procedimiento para la producción de la composición inmunogénica, según la reivindicación 11 a 35, en el cual se incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 37. Uso de la composición inmunogénica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o del anticuerpo según las reivindicaciones 9 a 10, en la elaboración de una composición farmacéutica o composición veterinaria
- 15 38. Uso de la composición inmunogénica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o del anticuerpo según las reivindicaciones 9 y 10, en la elaboración de un medicamento para la prevención, control y/o tratamiento de la tenacibaculosis.
39. Uso según la reivindicación 38 donde el medicamento es una vacuna.
- 20 40. Uso según la reivindicación 39 donde la vacuna es para peces.
- 25 41. Uso según la reivindicación 40 donde los peces se seleccionan de la lista que consiste en: salmón atlántico (*Salmo salar*), salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lenguado (*Solea solea* y *Solea senegalensis*), lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), bacalao (*Gadus morhua*), rombo (*Scophthalmus rhombus*) y/o acedía (*Dicologlossa cuneata*).
- 30 42. Uso según la reivindicación 41, donde los peces son dorada (*Sparus aurata*), lenguado (*Solea senegalensis*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y/o rodaballo (*Scophthalmus maximus*).
- 35 43. Un kit para uso en la inducción de una respuesta inmune en peces, que comprende la composición inmunogénica según reivindicaciones 1 a 8 y, opcionalmente, instrucciones relacionadas con la administración.

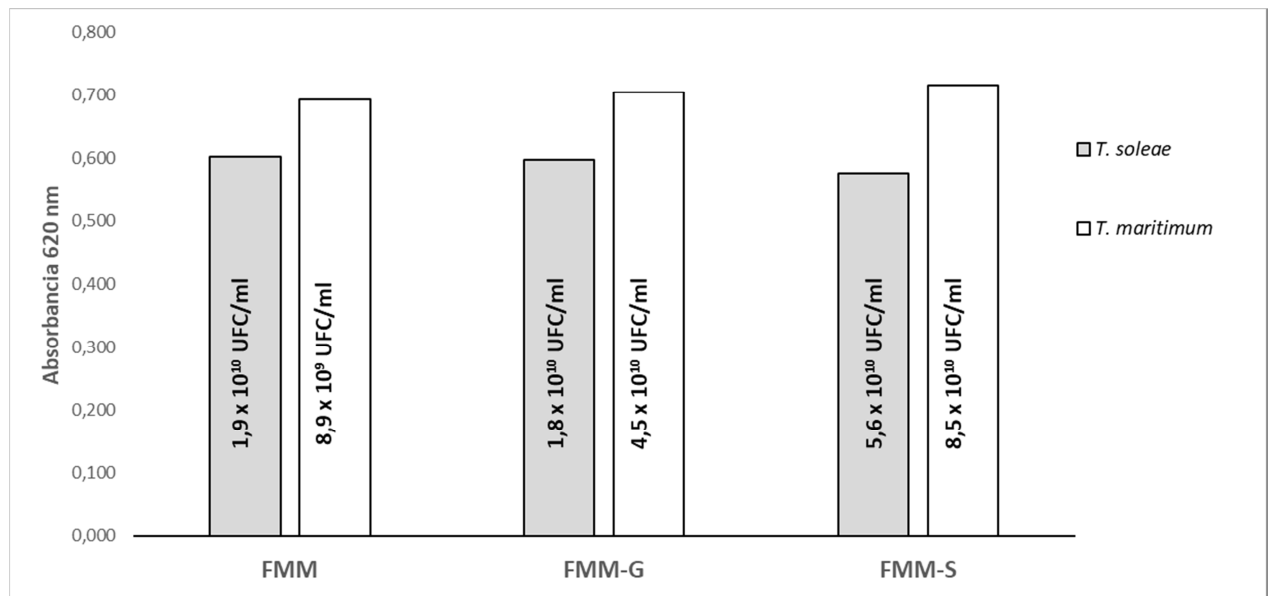


FIG. 1

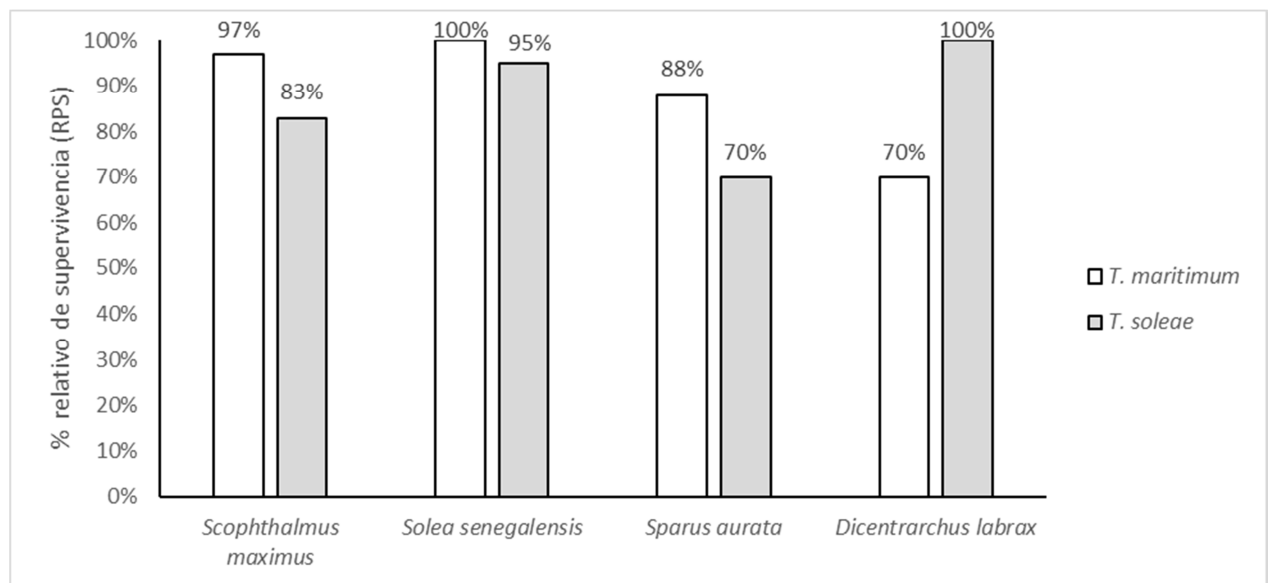


FIG. 2



- ②① N.º solicitud: 202131002
②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.10.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
D, A	GARCÍA CARBALLAS, C. M. Respuesta inmune en rodaballo (<i>Psetta máxima</i>) y lenguado (<i>Solea sp</i>). Efecto de la vacunación. 2018. Tesis de Doctorado. Universidade de Santiago de Compostela. Especialmente: páginas 5, 13, 27, 99-101, 112-115; tabla 26.	1-8, 11-31, 33-43
D, A	ES 2139549 B1 (UNIV. SANTIAGO DE COMPOSTELA) 01/10/2000, todo el documento.	1-8, 11-31, 33-43
A	KHALIL, R. H. et al. New perspective to control of tenacibaculosis in sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i> L. Aquaculture Research. Julio 2018, Vol. 49, Nº 7, páginas 2357 – 2365. ISSN 1355-557X (impreso), <DOI:10.1111/are.13689>. Especialmente: apartados 2.3, 2.7, 3.3; tabla 2.	1-8, 12-31, 33-43
D, A	FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, C. et al. Comparison of serological and molecular typing methods for epidemiological investigation of <i>Tenacibaculum</i> species pathogenic for fish. Applied Microbiology and Biotechnology. Marzo 2018, Vol. 102, Nº 6, páginas 2779 – 2789. ISSN 0175-7598 (impreso), ISSN 1432-0614 (electrónico), <DOI: 10.1007/s00253-018-8825-8>. Especialmente: página 2780, último párrafo - página 2781, primer párrafo; página 2782, apartado “Serological characterization”.	1-8, 11-31, 33-43
A	FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, C. et al. Identification and typing of fish pathogenic species of the genus <i>Tenacibaculum</i> . Applied Microbiology and Biotechnology. Diciembre 2018, Vol. 102, Nº 23, páginas 9973 - 9989. ISSN 1432-0614 (electrónico), <DOI: 10.1007/s00253-018-9370-1>. Especialmente: página 9979, columna izquierda.	1-8, 11-31, 33-43
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 D: Documento citado por el solicitante en la solicitud 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: 1-8, 11-31, 33-43		
Fecha de realización del informe 14.07.2022	Examinador E. Relaño Reyes	Página 1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)

A61K39/02 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, HCAPLUS