

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 079 877**

21 Número de solicitud: 202530183

51 Int. Cl.:

C07K 14/28 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.03.2025

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.09.2026

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100,00%)

Avda. Blasco Ibáñez, 13

46010 Valencia (Valencia) ES

72 Inventor/es:

AMARO GONZÁLEZ, Carmen;

FOUZ RODRÍGUEZ, Belén;

MOLINA SORRIBES, Carla y

SANJUAN CARO, Eva

74 Agente/Representante:

GONZALEZ IZQUIERDO, José Manuel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **VACUNA SUBUNITARIA CONTRA LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA**

57 Resumen:

Vacuna subunitaria contra la septicemia hemorrágica. La presente invención se refiere a una composición que comprende una proteína de unión a la transferrina que comprende los aminoácidos 23 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1 y una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis que comprende los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2, o la combinación de ambas proteínas; así como su uso como vacuna subunitaria que activa la respuesta inmunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas tales como: *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*.

ES 3 079 877 A1

DESCRIPCIÓN

VACUNA SUBUNITARIA CONTRA LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con vacunas subunitarias (acelulares) que contienen
5 componentes bacterianos que activan la respuesta inmunitaria de los animales
vacunados. En particular, la presente invención se relaciona con vacunas subunitarias
que activan la respuesta inmunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por
bacterias patógenas, en las que dichas vacunas comprenden una proteína
10 recombinante de unión a la transferrina, o una proteína recombinante que confiere
resistencia al complemento y a la fagocitosis, o la combinación de ambas proteínas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las especies de *Vibrio* y de *Photobacterium* son bacterias acuáticas que proliferan sobre
todo en ambientes cálidos de salinidades variadas. En estos ambientes colonizan las
superficies mucosales y quitinosas de múltiples especies de animales acuáticos que
15 solo infectan si presentan la dotación genética adecuada. La probabilidad de infección
por especies de *Vibrio* y de *Photobacterium* aumenta exponencialmente si los animales
acuáticos se encuentran encerrados en piscifactorías, ambientes artificiales que facilitan
su proliferación y el intercambio de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia.
El calentamiento global, además, está favoreciendo la proliferación de las especies de
20 *Vibrio* y de *Photobacterium* en zonas costeras y su expansión geográfica hacia los polos,
lo que redundo en un incremento de casos de Vibriosis y fotobacteriosis.

Tanto *Vibrio vulnificus* como *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (anteriormente
conocido como *Vibrio damsela*) son patógenos con potencial zoonótico y, por tanto,
25 pueden causar infecciones en seres humanos. Además, *Vibrio vulnificus* puede causar
una rápida muerte por septicemia hemorrágica en todos sus hospedadores, incluido el
ser humano. Esto tiene especial relevancia para los trabajadores de las piscifactorías,
donde pueden producirse zoonosis y los trabajadores pueden infectarse por los
patógenos presentes en los peces.

30

En especies de *Vibrio* y *Photobacterium* se dan fenómenos de transferencia genética
horizontal y de recombinación. Entre los genes transferibles están genes de virulencia

que, al estar presentes en elementos genéticos móviles, pueden ser intercambiados entre bacterias en los ambientes adecuados.

Vibrio vulnificus tiene genes de virulencia para peces en un plásmido transferible denominado pVir. Los genes de virulencia de pVir no codifican toxinas sino un sistema de resistencia a la inmunidad innata de, al menos, varias especies de teleósteos. El sistema de resistencia, conocido como “kit de supervivencia en sangre”, consta de dos proteínas de membrana externa que permiten a la bacteria resistir la acción bactericida del complemento y la fagocitosis (Fpcrp, *Fish phagocytosis and complement resistance protein*) y captar el hierro secuestrado por la transferrina del pez (Ftbp, *Fish transferrin binding protein*) para multiplicarse en sangre. El “kit de supervivencia en sangre” está también presente en las especies patógenas *Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, ambos patógenos de peces de amplio espectro, y en *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*.

Actualmente, la mayoría de las vacunas comerciales contra la Vibriosis (septicemia hemorrágica causada por vibrios) son convencionales, y consisten en bacterias inactivadas por tratamientos físicos o químicos, o por combinación de ambos tratamientos. También se han desarrollado vacunas subunitarias contra la Vibriosis. Por ejemplo, una vacuna basada en la maltoporina LamB para inmunizar peces cebras frente a *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio mimicus* (Lun et al. (2014)), y otra formada por esporas de *Bacillus subtilis* modificadas genéticamente que presentan en su superficie la porina OmpK de *Vibrio parahaemolyticus*, para inmunizar lubinas frente a *Vibrio anguillarum* y *Vibrio parahaemolyticus* (Gonçalves et al. (2022)).

Sin embargo, las vacunas subunitarias contra la Vibriosis descritas anteriormente están basadas en genes cromosómicos y no en genes de virulencia transferibles. Además, ninguna permite la inmunización múltiple frente a *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*.

Las piscifactorías son ambientes que aceleran los fenómenos de transferencia genética horizontal y, en consecuencia, la evolución de las especies patógenas, favoreciendo la emergencia de nuevas variantes de una especie patógena por transferencia genética horizontal del “kit de supervivencia en sangre”.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar tratamientos de prevención de septicemias hemorrágicas causadas por este tipo de bacterias patógenas y de prevención de la transmisión de genes de virulencia entre bacterias.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A efectos de la presente invención, “vacuna subunitaria” se refiere a una vacuna acelular que comprende uno o varios componentes bacterianos (antígenos), que desencadenan la respuesta inmunitaria del animal vacunado.

10 A efectos de la presente invención, “PeIBLs+Ftbp E18-L741” se refiere a una proteína de unión a la transferrina de secuencia SEQ ID NO: 1.

A efectos de la presente invención, “Fpcrp M52-Q465” se refiere a una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis de secuencia SEQ ID NO: 2.

15

El problema técnico a resolver consiste en proporcionar una composición útil como vacuna subunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas.

La presente invención proporciona una composición que comprende una proteína
20 seleccionada de entre una proteína de unión a la transferrina que comprende los aminoácidos 23 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1 y una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis que comprende los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2, o una combinación de ambas proteínas. Estas proteínas son expresadas *in vivo* por genes de virulencia transferibles que forman parte del
25 sistema de resistencia al sistema inmunitario conocido como “kit de supervivencia en sangre”. El “kit de supervivencia en sangre” consta de dos proteínas de membrana externa que permiten a la bacteria resistir la acción bactericida del complemento y la fagocitosis (Fpcrp, *Fish phagocytosis and complement resistance protein*) y captar el hierro secuestrado por la transferrina del pez (Ftbp, *Fish transferrin binding protein*) para
30 multiplicarse en sangre. La composición de la invención es útil como vacuna subunitaria mutiespecie que activa la respuesta inmunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por cualquier bacteria patógena que haya adquirido dicho “kit de supervivencia en sangre”. El “kit de supervivencia en sangre” está presente en bacterias patógenas

tales como: *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*.

La presente invención se refiere, por tanto, a vacunas subunitarias que contienen
5 componentes bacterianos del “kit de supervivencia en sangre de pez” y esto es relevante porque, por un lado, dichas vacunas subunitarias protegen de la septicemia hemorrágica causada por todas las especies bacterianas que han adquirido los genes que las codifican y, por otro, frenan los eventos de transferencia genética horizontal de estos genes en las piscifactorías.

10 Los aminoácidos 23 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1 de la proteína de unión a la transferrina corresponden a un fragmento de dicha proteína que no tiene péptido señal ni etiqueta de histidinas y que es plenamente funcional.

15 Los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2 de la proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis corresponden a un fragmento de dicha proteína que no tiene etiqueta de histidinas y que es plenamente funcional.

Una ventaja de la composición de la invención es que su producción no requiere de
20 laboratorios de nivel de bioseguridad 2, dado que se prepara cultivando una cepa de *Escherichia coli* modificada genéticamente que es de nivel de bioseguridad 1. Hasta el momento, las empresas productoras solo fabrican autovacunas a demanda a partir de cepas aisladas de peces con septicemia hemorrágica, y todas las especies bacterianas causantes de dicha septicemia son patógenos de nivel de bioseguridad 2 que requieren
25 instalaciones especiales para su manejo y cultivo.

Las ventajas de utilizar la proteína recombinante de unión a la transferrina que comprende los aminoácidos 23 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1 como antígeno vacunal son las siguientes: (i) es una proteína de membrana externa y, en consecuencia,
30 un antígeno de superficie expuesto a la interacción con el sistema inmunitario; (ii) su función es secuestrar el hierro de la transferrina férrica del pez para la multiplicación de la bacteria en sangre, proceso clave en septicemia. En consecuencia, su bloqueo por anticuerpos no solo activa el complemento y la fagocitosis, sino que impide que la bacteria crezca en sangre facilitando su eliminación por el sistema inmunitario; (iii) tiene
35 un peso molecular alto y una estructura y composición en aminoácidos que la hace muy

inmunógena; y (iv) está presente en las especies patógenas *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*, por lo que la vacuna basada en esta proteína es una vacuna multiespecie.

5

Las ventajas de utilizar la proteína recombinante que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis que comprende los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2 como antígeno vacunal son las siguientes: (i) es una lipoproteína con un anclaje lipídico a la membrana que, por su papel en la virulencia, debe estar expuesta al exterior celular y es, en consecuencia, un antígeno de superficie expuesto a la interacción con el sistema inmunitario; (ii) su función es proteger la bacteria de la fagocitosis y la acción del complemento. En consecuencia, su bloqueo por anticuerpos aumenta la eficacia de la fagocitosis y la acción del complemento sobre la bacteria, facilitando la eliminación de esta por el sistema inmunitario; (iii) tiene un peso molecular alto y una estructura y composición en aminoácidos que la hace muy inmunógena; y (iv) está presente en las especies patógenas *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*, por lo que la vacuna basada en esta proteína es una vacuna multiespecie.

10

15

20

En una realización preferente de la composición de la invención, la proteína de unión a la transferrina comprende o consiste en los aminoácidos 23 a 754 de la secuencia SEQ ID NO: 1. Los aminoácidos 23 a 754 de la secuencia SEQ ID NO: 1 de la proteína de unión a la transferrina corresponden a un fragmento de dicha proteína que no tiene péptido señal, que tiene etiqueta de histidinas, y que es plenamente funcional.

25

En otra realización preferente de la composición de la invención, que la proteína de unión a la transferrina comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1. Los aminoácidos 1 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1 de la proteína de unión a la transferrina corresponden a un fragmento de dicha proteína que tiene péptido señal, que no tiene etiqueta de histidinas, y que es plenamente funcional.

30

En otra realización preferente de la composición de la invención, la secuencia de la proteína de unión a la transferrina consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1. La secuencia SEQ ID NO: 1, de 754 aminoácidos, corresponde a una proteína que tiene péptido señal y tiene etiqueta de histidinas, y que es plenamente funcional.

35

En otra realización preferente, la composición de la invención comprende una proteína de unión a la transferrina que comprende los aminoácidos 23 a 754 de la secuencia SEQ ID NO: 1. Más preferentemente, la secuencia de la proteína de unión a la transferrina consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

5

En otra realización preferente de la composición de la invención, la secuencia de la proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2. La secuencia SEQ ID NO: 2, de 422 aminoácidos, corresponde a una proteína que tiene etiqueta de histidinas, que es plenamente funcional.

10

En otra realización preferente, la composición de la invención comprende una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis que comprende los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2. Más preferentemente, la secuencia de la proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.

15

En otra realización preferente adicional, la composición de la invención comprende una proteína seleccionada de entre una proteína de unión a la transferrina que comprende los aminoácidos 23 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1 y una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis que comprende los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2. Más preferentemente, la proteína de unión a la transferrina comprende los aminoácidos 23 a 754 de la secuencia SEQ ID NO: 1. Aún más preferentemente, la secuencia de la proteína de unión a la transferrina consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.

20

25

La composición de la invención tiene otra ventaja con respecto a las vacunas convencionales y es que puede administrarse como complemento o adyuvante específico de vacunas monoespecie para mejorar su poder inmunógeno. La razón es que la composición de la invención contiene antígenos que el patógeno solo expresa *in vivo* por lo que no están presentes en las vacunas monoespecie, todas ellas compuestas por bacterias cultivadas *in vitro* e inactivadas.

30

La composición de la invención puede administrarse como dosis de refuerzo de una vacuna monoespecie previamente administrada contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas, en la que dicha vacuna monoespecie previamente administrada es distinta a la composición vacunal de la presente invención.

5 Preferentemente, dicha vacuna monoespecie previamente administrada contiene bacterias inactivadas. La composición de la invención contiene antígenos que el patógeno solo expresa *in vivo* por lo que no están presentes en las vacunas monoespecie, las cuales se cultivan *in vitro*. Al administrarse como dosis de refuerzo activa una respuesta inmunitaria que no activa la vacuna monoespecie pero que
10 completa su acción y la hace más eficaz.

La composición de la invención puede administrarse alternativamente como aditivo inmunoestimulante, útil para impedir o prevenir que cualquier bacteria patógena que hubiera adquirido el “kit de supervivencia en sangre” pueda proliferar y transmitirlo, en
15 estrategias de prevención de la transmisión de genes de virulencia en las piscifactorías, frenando el proceso de transferencia de genes de virulencia entre los peces. Esto es especialmente relevante en las piscifactorías, donde se aceleran los procedimientos de transferencia genética horizontal entre especies de *Vibrio* y *Photobacterium*, favoreciendo la evolución de los patógenos del género *Vibrio* y la aparición de nuevas
20 variantes patógenas.

En los ejemplos de la presente solicitud se han obtenido resultados en anguilas que demuestran que las proteínas PelBLs+Ftbp E18-L741 y Fpcrp M52-Q465 confieren inmunidad protectora frente a la Vibriosis producida por *Vibrio vulnificus* en anguilas.
25 Además de *Vibrio vulnificus*, que contiene el “kit de supervivencia en sangre”, la composición de la invención es útil como vacuna subunitaria que activa la respuesta inmunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por cualquier bacteria patógena que haya adquirido dicho “kit de supervivencia en sangre”, como *Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*. Debido a que el “kit de supervivencia en sangre” está contenido en un
30 elemento genético móvil y a la facilidad de las bacterias acuáticas de adquirir nuevo material genético por transferencia horizontal, la transferencia de las proteínas Ftbp y Fpcrp a otras muchas especies de bacterias es un evento altamente probable.

En una realización preferente de la composición de la invención, la proteína o las proteínas están en forma de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados de proteína que se forman espontáneamente en el citoplasma de *Escherichia coli*, microorganismo utilizado en la expresión de la proteína o proteínas recombinantes.

5 La utilización de los cuerpos de inclusión que comprenden la proteína o proteínas recombinantes de la invención tiene las siguientes ventajas: (i) los cuerpos de inclusión son inmunógenos, son resistentes a elevadas temperaturas y a pH ácido y mantienen, en dichas condiciones, su estructura, conformación y tamaño, por lo que son compatibles con las condiciones de preparación de los piensos animales por extrusión, así como con su tránsito por el sistema digestivo, lo que asegura su inmunogenicidad tras su administración en la dieta, lo que permite, a su vez, la extrusión de los cuerpos de inclusión en piensos. La utilización de piensos facilita el trabajo de los piscicultores, reduce el estrés en los animales durante la inmunización y reduce los riesgos de infecciones de los trabajadores, asociadas a la manipulación de peces o agua contaminada, beneficio especialmente importante en el caso de *Vibrio vulnificus* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, patógenos zoonóticos peligrosos para la salud pública y animal; (ii) el proceso de producción de los cuerpos de inclusión es sencillo, rentable, escalable y da lugar a una elevada cantidad de proteína; (iii) los cuerpos de inclusión confieren protección utilizando bajas concentraciones de antígeno (2,5 µg/g pez), permitiendo la inmunización de un número elevado de peces por cada lote de producción de vacuna; y (iv) en el proceso de producción se obtienen otros compuestos que se obtienen conjuntamente que actúan de adyuvantes por lo que no es necesaria la adición de adyuvantes externos para potenciar la respuesta inmunitaria, reduciendo así los efectos adversos y el coste económico de la vacuna.

25 En una realización preferente, la composición de la invención puede además comprender al menos un adyuvante para mejorar su efecto protector. Ejemplos de adyuvantes disponibles comercialmente son los siguientes: Montanide™ ISA 763A VG y Montanide™ ISA 761 VG, ambos de SEPPIC.

30 La presente invención también proporciona la composición de la invención para uso como vacuna subunitaria que activa la respuesta inmunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas.

En una realización, la invención se refiere al uso de la composición de la invención como vacuna subunitaria que activa la respuesta inmunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas.

- 5 En una realización, la invención se refiere al método de prevención para activar la respuesta inmunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas en un animal, que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición de la invención a dicho animal. Preferentemente, dicho animal es un pez.
- 10 En una realización preferente de la composición para uso de la invención, la septicemia hemorrágica es de peces.

En otra realización preferente de la composición para uso de la invención, la bacteria patógena se selecciona del grupo que consiste en: *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*,
15 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*.

En una realización más preferente, la composición de la invención es para uso como vacuna subunitaria multiespecie que activa la respuesta inmunitaria contra la septicemia
20 hemorrágica causada por las bacterias patógenas *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*.

En otra realización preferente de la composición para uso de la invención, el pez se
25 selecciona del grupo que consiste en: anguila, lubina, tilapia y rodaballo.

En otra realización preferente, la composición de la invención se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en: oral, intramuscular, intraperitoneal y por
inmersión.

30

En una realización más preferente, la composición de la invención se administra por vía oral en 3 dosis. Más preferentemente, dichas 3 dosis están separadas 12 días.

En otra realización preferente, la composición para uso de la invención se administra
35 como dosis de refuerzo de una vacuna monoespecie previamente administrada contra

la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas, en la que dicha vacuna previamente administrada es distinta a la composición vacunal de la presente invención. Preferentemente, dicha vacuna monoespecie previamente administrada contiene bacterias inactivadas. La composición de la invención contiene antígenos que el patógeno solo expresa *in vivo* por lo que no están presentes en las vacunas monoespecie, las cuales se cultivan *in vitro*. Al administrarse como dosis de refuerzo activa una respuesta inmunitaria que no activa la vacuna monoespecie pero que completa su acción y la hace más eficaz.

- 10 La presente invención también proporciona la composición de la invención para uso en la prevención de la transmisión de genes de virulencia entre bacterias.

En otra realización, la composición de la invención es para uso como adyuvante en combinación con una vacuna contra la septicemia hemorrágica causada por una bacteria patógena.

La presente invención también proporciona un pienso para peces que comprende una proteína seleccionada de entre una proteína de unión a la transferrina que comprende los aminoácidos 23 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1 y una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis que comprende los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2, o una combinación de ambas proteínas.

En una realización preferente del pienso de la invención, la proteína de unión a la transferrina comprende o consiste en los aminoácidos 23 a 754 de la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferente del pienso de la invención, la proteína de unión a la transferrina comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferente del pienso de la invención, la secuencia de la proteína de unión a la transferrina consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferente del pienso de la invención, la secuencia de la proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.

- 5 En una realización preferente del pienso de la invención, la proteína o proteínas están en forma de cuerpos de inclusión.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una cepa de *Escherichia coli* depositada en la colección de cultivos DSMZ con número de depósito DSM 35328, que
10 contiene un plásmido que comprende un gen que codifica para una proteína de unión a la transferrina, en la que la secuencia de dicho gen es la secuencia SEQ ID NO: 3. Preferentemente, la secuencia del plásmido es la secuencia SEQ ID NO: 5.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una cepa de *Escherichia coli* depositada en la colección de cultivos DSMZ con número de depósito DSM 35327, que
15 contiene un plásmido que comprende un gen que codifica para una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis, en la que la secuencia de dicho gen es la secuencia SEQ ID NO: 4. Preferentemente, la secuencia del plásmido es la secuencia SEQ ID NO: 6.

20

Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento de obtención de una proteína de unión a la transferrina, que comprende:

- (a) cultivar una cepa de *Escherichia coli* depositada en la colección de cultivos DSMZ con número de depósito DSM 35328, que contiene un plásmido que
25 comprende un gen que codifica para una proteína de unión a la transferrina, en la que la secuencia de dicho gen es la secuencia SEQ ID NO: 3, en un medio de cultivo;
- (b) añadir isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido e incubar la mezcla resultante durante un tiempo entre 1 y 6 horas;
- 30 (c) añadir fluoruro de fenilmetansulfonilo, lisozima y al menos un inhibidor de proteasas al producto resultante de la etapa anterior e incubar la mezcla resultante durante un tiempo entre 1 y 4 horas; y
- (d) centrifugar el producto obtenido en la etapa anterior; descartar el sobrenadante y recoger el precipitado que contiene los cuerpos de inclusión que comprenden
35 la proteína de unión a la transferrina.

En una realización preferente, la secuencia de la proteína de unión a la transferrina consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

5 En una realización preferente, el tiempo de la etapa (b) es entre 2 y 4 horas. Más preferentemente, dicho tiempo es 2 o 4 horas.

En una realización preferente, el tiempo de la etapa (c) es entre 2 y 3 horas. Más preferentemente, dicho tiempo es 2 horas.

10 En una realización preferente, el procedimiento de la invención además comprende las siguientes etapas:

(e) sonicar el producto obtenido en la etapa (d);

(f) solubilizar con un agente desnaturizante e incubar durante un tiempo entre 16 y 18 horas;

15 (g) sonicar el producto obtenido en la etapa (f); y

(h) someter el producto obtenido en la etapa anterior a una cromatografía de afinidad a níquel, obteniendo así una composición que comprende la proteína de unión a la transferrina purificada.

20 En una realización preferente, el agente desnaturizante es urea o guanidina. Preferentemente, el agente desnaturizante es guanidina a una concentración 6 M.

En una realización preferente del procedimiento de la invención, el medio de cultivo es cualquier medio de cultivo apropiado tal como el medio de cultivo Luria-Bertani.

25

Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento de obtención de una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis, que comprende:

(a) cultivar una cepa de *Escherichia coli* depositada en la colección de cultivos DSMZ con número de depósito DSM 35327, que contiene un plásmido que comprende un gen que codifica para una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis, en la que la secuencia de dicho gen es la secuencia SEQ ID NO: 4, en un medio de cultivo;

30

(b) añadir isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido e incubar la mezcla resultante durante un tiempo entre 1 y 6 horas;

(c) añadir fluoruro de fenilmetansulfonilo, lisozima y al menos un inhibidor de proteasas al producto resultante de la etapa anterior e incubar la mezcla resultante durante un tiempo entre 1 y 4 horas; y

5 (d) centrifugar el producto obtenido en la etapa anterior; descartar el sobrenadante y recoger el precipitado que contiene los cuerpos de inclusión que comprenden la proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis.

En una realización preferente, la secuencia de la proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.

10

En una realización preferente, el tiempo de la etapa (b) es entre 2 y 4 horas. Más preferentemente, dicho tiempo es 4 horas.

15 En una realización preferente, el tiempo de la etapa (c) es entre 2 y 3 horas. Más preferentemente, dicho tiempo es 2 horas.

En una realización, el procedimiento de la invención además comprende las siguientes etapas:

20 (e) sonicar el producto obtenido en la etapa (d);
(f) solubilizar con un agente desnaturizante e incubar durante un tiempo entre 16 y 18 horas;
(g) sonicar el producto obtenido en la etapa (f); y
(h) someter el producto obtenido en la etapa anterior a una cromatografía de afinidad a níquel, obteniendo así una composición que comprende la proteína
25 que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis purificada.

En una realización preferente, el agente desnaturizante es urea o guanidina. Preferentemente, el agente desnaturizante es guanidina a una concentración 6 M.

30 En una realización preferente del procedimiento de la invención, el medio de cultivo es cualquier medio de cultivo apropiado tal como el medio de cultivo Luria-Bertani.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, el término “comprende”, “que comprende” y sus variantes no son de naturaleza limitativa y, por lo tanto, no pretenden
35 excluir otras características técnicas. El término “comprende”, “que comprende” y sus

variantes, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, incluye, específicamente, el término “consiste en”, “que consiste en” y sus variantes.

5 Como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares “el”, “la” incluyen referencias a las formas plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Plásmido pET303_PelBLs+Ftbp E18-L741, que contiene un gen de resistencia a ampicilina y el gen clonado es inducible mediante isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El plásmido genera la proteína recombinante PelBLs+Ftbp E18-L741, que
10 comprende una cola de histidinas en su extremo C-terminal.

Figura 2. Plásmido pET28a_Fpcrp M52-Q465, que contiene un gen de resistencia a kanamicina y el gen clonado es inducible mediante IPTG. El plásmido genera la proteína recombinante Fpcrp M52-Q465, que comprende una cola de histidinas en su extremo
15 C-terminal.

Figura 3. Evolución en el tiempo de la respuesta inmunitaria de los animales inmunizados con la proteína recombinante PelBLs+Ftbp E18-L741 + adyuvante incompleto de Freund. El título de los anticuerpos se determinó por ELISA indirecto, tapizando las placas con proteína recombinante PelBLs+Ftbp E18-L741 y revelando con una dilución 1:2000 de suero de conejo anti-IgM de anguila y una dilución 1:2000 de suero de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano. Los valores de títulos obtenidos se presentan como media $\pm$ desviación típica de tres réplicas independientes.
20

Figura 4. Mortalidad en el tiempo de los grupos inmunizados con la proteína recombinante PelBLs+Ftbp E18-L741 + adyuvante incompleto de Freund (AIF) y los grupos no inmunizados (Tris y Tris+AIF).
25

Figura 5. Evolución en el tiempo de la respuesta inmunitaria de los animales inmunizados con la proteína recombinante Fpcrp M52-Q465 + adyuvante incompleto de Freund. El título de los anticuerpos se determinó por ELISA indirecto, tapizando las placas con la proteína Fpcrp M52-Q465 y revelando con una dilución 1:2000 de suero de conejo anti-IgM de anguila y una dilución 1:2000 de suero de cabra anti-conejo
30

conjugado con peroxidasa de rábano. Los valores de títulos obtenidos se presentan como media $\pm$ desviación típica de tres réplicas independientes.

Figura 6. Mortalidad en el tiempo de los grupos inmunizados con la proteína recombinante Fpcrp M52-Q465 + adyuvante incompleto de Freund (AIF) y los grupos no inmunizados (Tris y Tris+AIF).

Figura 7. Caracterización de los cuerpos de inclusión de la proteína Fpcrp M52-Q465 mediante microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (A). Histogramas de la distribución de tamaños a pH neutro y temperatura ambiente (B) a pH 2, durante 3 horas (C) y a 100°C, durante 10 minutos (D).

Figura 8. Actividad lisozima del suero de las anguilas vacunadas con los cuerpos de inclusión (CI) de la proteína recombinante PeIBLs+Ftbp E18-L741, anguilas a las que se administraron cuerpos de inclusión (CI) de la Proteína Roja Fluorescente iRFP (proteína no inmunógena) y anguilas a las que se administró agua. La vacunación con los cuerpos de inclusión de la proteína recombinante PeIBLs+Ftbp E18-L741 dio lugar a un aumento significativo de la actividad lisozima a los 50 días del inicio del experimento (26 días post-inmunización completa). *Diferencias significativas p-valor < 0,05.

Figura 9. Actividad lisozima del suero de las anguilas vacunadas con los cuerpos de inclusión (CI) de la proteína recombinante Fpcrp M52-Q465, anguilas a las que se administraron cuerpos de inclusión (CI) de la Proteína Roja Fluorescente iRFP (proteína no inmunógena) y anguilas a las que se administró agua. La vacunación con los cuerpos de inclusión de la proteína recombinante Fpcrp M52-Q465 dio lugar a un aumento significativo de la actividad lisozima a los 50 días del inicio del experimento (26 días post inmunización completa). *Diferencias significativas p-valor < 0,05.

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Poder inmunógeno y protector de la proteína PeIBLs+Ftbp E18-L741

Obtención y purificación

La secuencia génica de la proteína Ftbp de *Vibrio vulnificus* se analizó para seleccionar el fragmento proteico a expresar y se seleccionó la secuencia nucleotídica que codifica

para el fragmento E18-L741 de Ftbp. Se eliminó la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal propio de Ftbp y se sustituyó por la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal PelB de *Erwinia carotovora*. La secuencia génica completa se optimizó para su expresión en *Escherichia coli*. La secuencia génica resultante, optimizada para su expresión en *Escherichia coli*, es la secuencia SEQ ID NO: 3.

La secuencia génica SEQ ID NO: 3 se sintetizó y clonó en el plásmido de expresión pET303_CT-His, obteniendo así el plásmido pET303_PelBLs+Ftbp E18-L741 (**Figura 1**). El plásmido pET303_PelBLs+Ftbp E18-L741 contiene un gen de resistencia a la ampicilina (AmpR), el gen clonado está sometido a expresión inducible por isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), y la proteína que se genera contiene una cola de histidinas en su extremo C-terminal que sirve para su purificación. La secuencia aminoacídica de la proteína recombinante generada PelBLs+Ftbp E18-L741 es la secuencia SEQ ID NO: 1.

El plásmido pET303_PelBLs+Ftbp E18-L741 se clonó en la cepa *Escherichia coli* DH5 α quimiocompetente para su mantenimiento y posterior purificación. El plásmido se purificó para su clonaje en la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) electrocompetente. La cepa bacteriana transformada es el vector de expresión final.

La cepa bacteriana transformada se creció durante la noche a 37°C y 180 rpm. Se realizó una dilución 1:100 en 1 L de medio de cultivo Luria-Bertani y se incubó a 37°C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6. Se añadió IPTG 0,5 mM y se incubó a 37°C durante 4 horas. El cultivo inducido se centrifugó (4000 g, 30 minutos) y el precipitado se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8 y se congeló a -20°C. El cultivo se sonicó (3x30 segundos), se centrifugó (35000g, 20 minutos a 4°C) y el precipitado se sometió a sonicación (3x30 segundos), centrifugación (35000g, 20 minutos a 4°C) y resuspensión en diferentes tampones, dos en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Triton 2%, urea 2 M, pH 8 y una en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Triton 2%, pH 8. La suspensión se centrifugó de nuevo y el precipitado se resuspendió en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, guanidina-HCl 6 M, imidazol 5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 8, para la solubilización de los cuerpos de inclusión. Una vez solubilizados, los cuerpos de inclusión se sonicaron (3x30 segundos) y se realizó la purificación de la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741 mediante cromatografía de afinidad a níquel (columna de cromatografía de afinidad High Density

Nickel 6BCL-QHNI-100, Agarose Bead Technologies). La solución con los cuerpos de inclusión se introdujo en la columna de cromatografía de afinidad para la unión de la proteína, se realizaron dos lavados con tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, guanidina-HCl 6 M, 2-mercaptoetanol 1 mM, imidazol 10 mM y finalmente se realizó la elución de la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741 mediante concentraciones crecientes de imidazol (50, 100, 200 y 400 mM). Tras la cromatografía de afinidad, la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741 se concentró (Vivaspin concentrator cutoff 30 kDa, Sartorius) y se dializó (Spectra/Por® Dialysis Membrane cutoff 12-14 kDa, Spectrum laboratories) frente a Tris-HCl 50 mM, pH 8, durante la noche. Por último, se realizaron 3 ciclos de centrifugación (4000 g, 15 minutos a 4°C), resuspensión en Tris-HCl 50 mM, pH 8 y sonicación (2x30 segundos) para su recuperación y concentración.

La pureza de la proteína se determinó mediante SDS-PAGE y su concentración se determinó mediante cuantificación con el kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific) y semicuantificación mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie.

Poder inmunógeno y protector

Se vacunaron anguilas (*Anguilla anguilla*) por inyección intraperitoneal (i.p.) con una solución de proteína purificada PelBLs+Ftbp E18-L741 (1 mg proteína/mL) mezclada con adyuvante incompleto de Freund (AIF) en proporción 1:1.

Vacunación. 53 anguilas europeas se inyectaron i.p. con 2 dosis de vacuna separadas 12 días de 0,1 mL/pez de PelBLs+Ftbp E18-L741 + AIF (0,0025 mg proteína/g de pez). Se tomaron muestras a los 0, 12, 15, 22, 26 y 34 días del inicio del ensayo. Un grupo inmunizado únicamente con el adyuvante (Tris-HCl 50 mM + AIF, n = 13) y otro sin inmunizar (Tris-HCl 50 mM, n = 13) fueron utilizados como controles.

Respuesta inmunitaria específica. Se determinó el título de anticuerpos en el suero de las anguilas mediante ELISA en placas de 96 pocillos Nunc F96 Maxisorp (ThermoFisher Scientific). Las placas se tapizaron con 10 ng de proteína PelBLs+Ftbp E18-L741. Se realizaron diluciones 1:2 seriadas de las muestras de suero de anguila. La reacción se reveló usando una dilución 1:2000 de suero de conejo anti-IgM de anguila y una dilución 1:2000 de suero de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de

rábano (Bio-rad; número de catálogo 1721019). El título se estableció como la inversa de la dilución que alcanzaba un valor de absorbancia a 450 nm dos veces el del blanco (albúmina de suero bovino 0,1% en tampón fosfato salino (PBS)).

- 5 **Ensayo de infección.** A los 22 días post-inmunización (34 días del inicio del ensayo) se infectaron grupos de 13 anguilas por inmersión de 1 hora con la cepa de *Vibrio vulnificus* CECT 4999 (dosis infecciosa = 5×10^4 ufc/mL). Se registró la mortalidad diariamente durante un periodo de 10 días, aunque la mortalidad en esta enfermedad se concentra en los 3 primeros días. Solo se consideró que la septicemia era debida a
- 10 *Vibrio vulnificus* si el patógeno se recuperaba en cultivo puro a partir de órgano interno del animal moribundo. El efecto protector conferido por la proteína adyuvantada se valoró mediante el cálculo del Porcentaje relativo de supervivencia (RPS) definido por la **Ecuación 1**:

15
$$RPS = 1 - (\% \text{ mortalidad peces vacunados} / \% \text{ mortalidad control}) \times 100$$

- La inmunización de las anguilas con PeIBLs+Ftbp E18-L741 + AIF activó la producción de anticuerpos específicos a lo largo del tiempo con un aumento significativo del título (8.000) a los 10 días post-inmunización (22 días del inicio del ensayo), valor que se
- 20 mantuvo hasta el final del experimento (**Figura 3**).

- Los animales inmunizados mostraron una clara reducción de la mortalidad con respecto a los no inmunizados, indicando que PeIBLs+Ftbp E18-L741 + AIF protege frente a la Vibriosis causada por *Vibrio vulnificus* (**Figura 4**). Se obtuvo un valor de RPS del
- 25 45,45%, calculado con respecto al grupo inmunizado con adyuvante (Tris+AIF) cuando la mortalidad en el grupo control fue de 92,86%. Los resultados obtenidos demuestran que la proteína PeIBLs+Ftbp E18-L741 confiere inmunidad protectora frente a la Vibriosis producida por *Vibrio vulnificus*.

Ejemplo 2. Poder inmunógeno y protector de la proteína Fpcrp M52-Q465

- 30 Obtención y purificación

Se realizó un análisis *in silico* de la estructura de la proteína Fpcrp de *Vibrio vulnificus* mediante predicción de estructura de proteínas por Inteligencia Artificial con el programa informático Alpha Fold. Este análisis reveló que se trata de una lipoproteína con un

anclaje a membrana formada por una zona no estructurada y una parte soluble formada por 7 dominios WD40. Tras este análisis, la secuencia génica se analizó para seleccionar el fragmento proteico a expresar y se seleccionó la secuencia nucleotídica que codifica para el fragmento M52-Q465 de Fpcrp. Se eliminó la secuencia nucleotídica que codifica para la región de anclaje a membrana (M1-G19) y la secuencia nucleotídica que codifica para la región no estructurada (C20-N51). La secuencia génica que codifica para la proteína recombinante Fpcrp M52-Q465 se optimizó para su expresión en *Escherichia coli*. La secuencia génica optimizada para su expresión en *Escherichia coli* es la secuencia SEQ ID NO: 4. La secuencia génica SEQ ID NO: 4 se sintetizó y clonó en el plásmido pMA. Este plásmido es resistente a la ampicilina (AmpR) y se utilizó para su posterior clonaje en el plásmido de expresión.

La secuencia génica que codifica para la proteína Fpcrp M52-Q465 se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores NcoI_Fpcrp_M52_Fw (secuencia SEQ ID NO: 7) XhoI_Fpcrp_465Q_Rv (secuencia SEQ ID NO: 8).

Una vez amplificado, el plásmido pET28a y el amplicón se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y NcoI (ThermoFisher Scientific) y se sometieron a una reacción de ligación (Ligasa ADN T4; ThermoFisher Scientific), obteniendo el plásmido pET28a_Fpcrp M52-Q465 (**Figura 2**). Este plásmido contiene un gen de resistencia a kanamicina (KanR), el gen clonado está sometido a expresión inducible por IPTG, y la proteína recombinante Fpcrp M52-Q465 que se genera contiene una cola de histidinas en su extremo C-terminal que sirven para su purificación. La secuencia aminoacídica de la proteína recombinante generada Fpcrp M52-Q465 es la secuencia SEQ ID NO: 2.

El plásmido pET28a_Fpcrp M52-Q465 se clonó en la cepa *Escherichia coli* DH5α quimiocompetente para su mantenimiento y posterior purificación. El plásmido se purificó para su clonaje en la cepa *Escherichia coli* BLR (DE3) electrocompetente. La cepa bacteriana transformada es el vector de expresión final.

La cepa bacteriana transformada se creció durante la noche a 37°C y 180 rpm. Se realizó una dilución 1:100 en 1 L de medio de cultivo Luria-Bertani y se incubó a 37°C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6. Se añadió IPTG 0,5 mM y se incubó a 25°C durante la noche. El cultivo inducido se centrifugó (4000g, 30 minutos) y el precipitado se resuspendió en tampón Tris-HCl 50

mM NaCl 300 mM pH 8 y se congeló a -20°C. El cultivo se sonicó (3x30 segundos), se centrifugó (35000g, 20 minutos a 4°C) y el precipitado se sometió a sonicación (3x30 segundos), centrifugación (35000g, 20 minutos a 4°C) y resuspensión en diferentes tampones, dos en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Triton 2%, urea 2 M, pH 8 y una en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Triton 2%, pH 8. Una vez lavada, la suspensión se centrifugó de nuevo y el precipitado se resuspendió en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, guanidina-HCl 6 M, imidazol 5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 8, para la solubilización de los cuerpos de inclusión. Una vez solubilizados, los cuerpos de inclusión se sonicaron (3x30 segundos) y se realizó la purificación de la proteína Fpcrp M52-Q465 mediante cromatografía de afinidad a níquel (columna de cromatografía de afinidad *High Density Nickel 6BCL-QHNI-100, Agarose bead technologies*). La solución con los cuerpos de inclusión se introdujo en la columna de cromatografía de afinidad a níquel para la unión de la proteína, se realizó un lavado con tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, guanidina-HCl 6 M, 2-mercaptoetanol 1 mM, imidazol 20 mM y finalmente se realizó la elución de la proteína mediante concentraciones crecientes de imidazol (50, 100, 200 y 400 mM). Tras la cromatografía de afinidad, la proteína se concentró (*Vivaspin concentrator cut off- 10 kDa, Sartorius*) y se dializó (*Spectra/Por® Dialysis Membrane cut off- 12-14 kDa, Spectrum laboratories*) frente a Tris-HCl 50 mM, pH 8, durante la noche. Por último, se realizaron 3 ciclos de centrifugación (4000g, 15 minutos a 4°C), resuspensión en Tris-HCl 50 mM, pH 8 y sonicación (2x30 segundos) para su recuperación y concentración.

La pureza de la proteína se determinó mediante SDS-PAGE y su concentración se determinó mediante cuantificación con el kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific) y semicuantificación mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie.

Poder inmunógeno y protector

Se vacunaron anguilas (*Anguilla anguilla*) por inyección i.p. con una solución de proteína purificada Fpcrp M52-Q465 (1 mg proteína/mL) mezclada con adyuvante incompleto de Freund (AIF) en proporción 1:1.

Vacunación. 53 anguilas europeas se inyectaron i.p. con 2 dosis de vacuna separadas 12 días de 0,1 mL/pez de Fpcrp M52-Q465 + AIF (0,0025 mg proteína/g de pez). Se

tomaron muestras a los 0, 12, 15, 22, 26 y 34 días del inicio del ensayo. Un grupo inmunizado únicamente con el adyuvante (Tris-HCl 50 mM + AIF, n = 13) y otro sin inmunizar (Tris-HCl 50 mM, n = 13) fueron utilizados como controles.

- 5 **Respuesta inmunitaria específica.** Se determinó el título de anticuerpos en el suero de las anguilas mediante ELISA en placas de 96 pocillos Nunc F96 Maxisorp (ThermoFisher Scientific). Las placas se tapizaron con 10 ng de proteína Fpcrp M52-Q465. Se realizaron diluciones 1:2 seriadas de las muestras de suero de anguila. La reacción se reveló usando una dilución 1:2000 de suero de conejo anti-IgM de anguila y una dilución 1:2000 de suero de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-rad; número de catálogo 1721019). El título se estableció como la inversa de la dilución que alcanzaba un valor de absorbancia a 450 nm dos veces el del blanco (albúmina de suero bovino 0,1% en tampón fosfato salino (PBS)).
- 10
- 15 **Ensayo de infección.** A los 22 días post-inmunización (34 días del inicio del ensayo) se infectaron grupos de 13 anguilas por inmersión de 1 hora con la cepa de *Vibrio vulnificus* CECT 4999 (dosis infecciosa = 5×10^4 ufc/mL). Se registró la mortalidad diariamente durante un periodo de 10 días, aunque la mortalidad en esta enfermedad se concentra en los 3 primeros días. Solo se consideró que la septicemia era debida a
- 20 *Vibrio vulnificus* si el patógeno se recuperaba en cultivo puro a partir de órgano interno del animal moribundo. El efecto protector conferido por la proteína adyuvantada se valoró mediante el cálculo del Porcentaje relativo de supervivencia (RPS) definido en la **Ecuación 1**.
- 25 La inmunización de las anguilas con Fpcrp M52-Q465 + AIF activó la producción de anticuerpos específicos a lo largo del tiempo con un aumento significativo del título (19.200) a los 14 días post-inmunización (26 días del inicio del ensayo), valor que se mantuvo hasta el final del experimento (**Figura 5**).
- 30 Los animales inmunizados mostraron una clara reducción de la mortalidad con respecto a los no inmunizados, indicando que Fpcrp M52-Q465 + AIF protege frente a la Vibriosis causada por *Vibrio vulnificus* (**Figura 6**). Se obtuvo un valor de RPS del 50,76%, calculado con respecto al grupo inmunizado con adyuvante (Tris+AIF) cuando la mortalidad en el grupo control fue de 92,86%. Los resultados obtenidos demuestran que

la proteína Fpcrp M52-Q465 confiere inmunidad protectora frente a la Vibriosis producida por *Vibrio vulnificus*.

Ejemplo 3. Obtención de cuerpos de inclusión

El vector de expresión se creció en medio de cultivo Luria-Bertani a 37°C y 250 rpm durante toda la noche. A continuación, se diluyó en 500 mL de medio fresco hasta obtener una densidad óptica a 550 nm inicial de 0,1 para la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741 y de 0,05 para la proteína Fpcrp M52-Q465 y se incubó hasta que alcanzó una densidad óptica a 550 nm de 0,6-0,8 (fase logarítmica exponencial de crecimiento). En ese momento se añadió IPTG 1 mM para inducir la producción de la proteína recombinante y se incubó a 37°C durante 2 horas para la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741 y 4 horas para Fpcrp M52-Q465. A continuación, se añadió a 500 mL de cultivo 2 mL de fluoruro de fenilmetansulfonilo (PMSF) 100 mM, 1,5 mL de lisozima (0,5 mg/mL) y un cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA, la mezcla se incubó a 37°C y 250 rpm durante 2 horas y se congeló a -80°C. Una vez descongelada, a los 500 mL de mezcla se añadió 1 mL de Triton X-100 y se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se añadió 500 µL de DNasa I (1mg/mL) y 500 µL de MgSO₄ 1 M y se incubó a 37°C y 125 rpm durante 1 hora. Por último, los cultivos se centrifugaron (15000 g, 15 minutos a 4°C), se resuspendieron en 50 mL de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y se congelaron a -80°C.

Los cuerpos de inclusión de la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741 se observaron al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. Se evaluó la resistencia de las nanopartículas cuando eran sometidas a pH 2, 3 horas y a 100°C, 10 min. La estructura de los cuerpos de inclusión se mantuvo independientemente de los tratamientos de pH (pH 2, 3 horas) y temperatura (100°C, 10 minutos), confirmando su estabilidad estructural.

Los cuerpos de inclusión de la proteína Fpcrp M52-Q465 se observaron al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. Se determinó que los cuerpos de inclusión presentaban una morfología predominantemente esférica ($\geq 90\%$) de un tamaño medio de $591 \pm 171,5$ nm, encontrándose una gran variabilidad (200-900 nm). Para determinar la resistencia al proceso de extrusión en pienso y a las condiciones del tracto gastrointestinal, se sometieron a 100°C, 10 minutos y a pH 2 durante 3 horas. Los

resultados indicaron que no existen grandes diferencias en ninguno de los parámetros evaluados (esferas, $580 \pm 188,04$ y $632 \pm 194,35$, respectivamente) (**Figura 7**).

Ejemplo 4. Poder protector de los cuerpos de inclusión de PelBLs+Ftbp E18-L741

Vacunación. 30 anguilas europeas se inyectaron i.p. con 3 dosis de separadas 12 días de 0,1 mL/pez de cuerpos de inclusión de la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741 (0,5 mg proteína/mL), lo que supuso una dosis media de 0,0025 mg proteína/g de pez. Además, se añadieron dos grupos control (n = 30), uno al que se le administró cuerpos de inclusión de la Proteína Roja Fluorescente iRFP (proteína no inmunógena) y uno al que se le administró agua. Se tomaron muestras 0, 46 y 50 días después del inicio del ensayo.

Respuesta inmunitaria inespecífica. La actividad lisozima se evaluó mediante ensayo de turbidimetría. A 20 μ L de cada muestra de suero se añadió 180 μ L de una suspensión 0,2 mg/mL de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado resuspendido en tampón fosfato (14.04 g/L KH_2PO_4 , 5.2 g/L Na_2HPO_4 , pH 6,2). La absorbancia a 450 nm se midió al inicio y tras incubar las muestras a 28°C durante 20 minutos.

Ensayo de infección. A los 22 días post-inmunización (46 días del inicio del ensayo) se infectaron grupos de 18 anguilas por inmersión de 1 hora con la cepa de *Vibrio vulnificus* CECT 4999 (dosis infecciosa = $4,65 \times 10^5$ ufc/mL). Se registró la mortalidad diariamente durante un periodo de 10 días, aunque la mortalidad en esta enfermedad se concentra en los 3 primeros días. Solo se consideró que la septicemia era debida a *Vibrio vulnificus* si el patógeno se recuperaba en cultivo puro a partir de órgano interno del animal moribundo. El efecto protector conferido por los cuerpos de inclusión de la proteína se valoró mediante el cálculo del Porcentaje relativo de supervivencia (RPS) definido en la **Ecuación 1**.

La vacunación oral de las anguilas con los cuerpos de inclusión activó la producción de lisozima en sangre ($186,54 \pm 6,19$ U/mL, $86,26 \pm 3,53$ U/mL y $109,33 \pm 9,43$ U/mL, para los cuerpos de inclusión de la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741, para los cuerpos de inclusión de la Proteína Roja Fluorescente iRFP y para el control con agua, respectivamente) a los 50 días de comenzar el experimento (26 días post-vacunación) (**Figura 8**). La vacuna presentó un RPS del 23,53%, calculado con respecto al grupo vacunado con cuerpos de inclusión de la Proteína Roja Fluorescente iRFP, cuando el

control con agua presentó una mortalidad del 89%. Los resultados obtenidos demuestran que la vacunación por vía oral con los cuerpos de inclusión de la proteína PeIBLs+Ftbp E18-L741 confieren inmunidad protectora frente a la Vibriosis producida por *Vibrio vulnificus*.

5 Ejemplo 5. Poder protector de los cuerpos de inclusión de Fpcrp M52-Q465

Vacunación. 30 anguilas europeas se inyectaron i.p. con 3 dosis de separadas 12 días de 0,1 mL/pez de cuerpos de inclusión de la proteína Fpcrp M52-Q465 (0,5 mg proteína/mL), lo que supuso una dosis media de 0,0025 mg proteína/g de pez. Además, se añadieron dos grupos control (n = 30), uno al que se le administró cuerpos de inclusión de la Proteína Roja Fluorescente iRFP (proteína no inmunógena) y uno al que se le administró agua. Se tomaron muestras 0, 46 y 50 días después del inicio del ensayo.

Respuesta inmunitaria inespecífica. La actividad lisozima se evaluó mediante ensayo de turbidimetría. A 20 µL de cada muestra de suero se añadió 180 µL de una suspensión 0,2 mg/mL de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado resuspendido en tampón fosfato (14.04 g/L KH₂PO₄, 5.2 g/L Na₂HPO₄, pH 6,2). La absorbancia a 450 nm se midió al inicio y tras incubar las muestras a 28°C durante 20 minutos.

Ensayo de infección. A los 22 días post-inmunización (46 días del inicio del ensayo) se infectaron grupos de 18 anguilas por inmersión de 1 hora con la cepa de *Vibrio vulnificus* CECT 4999 (dosis infecciosa = $4,65 \times 10^5$ ufc/mL). Se registró la mortalidad diariamente durante un periodo de 10 días, aunque la mortalidad en esta enfermedad se concentra en los 3 primeros días. Solo se consideró que la septicemia era debida a *Vibrio vulnificus* si el patógeno se recuperaba en cultivo puro a partir de órgano interno del animal moribundo. El efecto protector conferido por los cuerpos de inclusión de la proteína se valoró mediante el cálculo del Porcentaje relativo de supervivencia (RPS) definido en la **Ecuación 1**.

La vacunación oral de las anguilas con los cuerpos de inclusión de la proteína Fpcrp M52-Q465 activó la producción de lisozima en sangre ($270,14 \pm 5,54$ U/mL, $86,26 \pm 3,53$ U/mL y $109,33 \pm 9,43$ U/mL, para los cuerpos de inclusión de la proteína Fpcrp M52-Q465, para los cuerpos de inclusión de la Proteína Roja Fluorescente iRFP y para el control con agua, respectivamente) a los 50 días de comenzar el experimento (26 días

post vacunación) (**Figura 9**). La vacuna presentó un RPS del 23,53%, calculado con respecto al grupo vacunado con los cuerpos de inclusión de la Proteína Roja Fluorescente iRFP, cuando el control presentó una mortalidad del 89%. Los resultados obtenidos demuestran que la vacunación por vía oral con los cuerpos de inclusión de la proteína Fpcrp M52-Q465 confieren inmunidad protectora frente a la Vibriosis producida por *Vibrio vulnificus*.

Ejemplo 6. Poder protector de la combinación de los cuerpos de inclusión de PelBLs+Ftbp E18-L741 y de los cuerpos de inclusión de Fpcrp M52-Q465

Ensayo vacunación. 16 anguilas europeas se vacunaron mediante intubación oral con 3 dosis de separadas 12 días de 0,1 mL/pez de cuerpos de inclusión de la proteína PelBLs+Ftbp E18-L741 y cuerpos de inclusión de la proteína Fpcrp M52-Q465 (concentración media total de la combinación de ambas proteínas 0,5 mg proteína/mL), lo que supuso una dosis media total de la combinación de ambas proteínas de 0,0025 mg proteína/g de pez. Además, se añadieron dos grupos control (n = 18), uno al que se le administró cuerpos de inclusión de la Proteína Roja Fluorescente iRFP (proteína no inmunógena) y uno al que se le administró agua. Se tomaron muestras 0, 46 y 50 días del inicio del ensayo.

Protección: ensayo de infección. A los 22 días post-inmunización (46 días del inicio del ensayo) se infectaron grupos de 16-18 anguilas por inmersión de 1 h con la cepa CECT 4999 (dosis infecciosa = $4,65 \times 10^5$ ufc/mL). Se registró la mortalidad diariamente durante un periodo de 10 días, aunque la mortalidad en esta enfermedad se concentra en los 3 primeros días. Solo se consideró que la septicemia era debida a *Vibrio vulnificus* si el patógeno se recuperaba en cultivo puro a partir de órgano interno del animal moribundo. El efecto protector conferido por la combinación de los cuerpos de inclusión de PelBLs+Ftbp E18-L741 y de los cuerpos de inclusión de Fpcrp M52-Q465 se valoró mediante el cálculo del Porcentaje relativo de supervivencia (RPS) definido en la **Ecuación 1**.

La vacunación oral de las anguilas con la combinación de cuerpos de inclusión de PelBLs+Ftbp E18-L741 con cuerpos de inclusión de Fpcrp M52-Q465 dio lugar a un RPS del 27,21%, calculado con respecto al grupo vacunado con los cuerpos de inclusión de la Proteína Roja Fluorescente iRFP, cuando el control presentó una mortalidad del 89%. Los resultados obtenidos demuestran que la vacunación por vía oral con la

combinación de cuerpos de inclusión de PelBLs+Ftbp E18-L741 con cuerpos de inclusión de Fpcrp M52-Q465 confiere inmunidad protectora frente a la Vibriosis producida por *Vibrio vulnificus*.

REFERENCIA AL MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO

- 5 Las cepas *Escherichia coli* Fpcrp M52-Q465 y *Escherichia coli* PelBLs+Ftbp E18-L741 se depositaron el 24.01.2025, según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, en la Autoridad Internacional de Depósito “Leibniz Institut DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures”, por el depositante “Universitat de
- 10 Valencia”. El depositante identificó la cepa *Escherichia coli* Fpcrp M52-Q465 como “Fpcrp M52-Q465” y la cepa *Escherichia coli* PelBLs+Ftbp E18-L741 como “PelBLs+Ftbp E18-L741”. Tras completar con éxito los ensayos de viabilidad de las cepas, la Autoridad Internacional de Depósito aceptó las cepas, confirmó la fecha, anteriormente indicada, en la que recibió el depósito y asignó los siguientes números de
- 15 depósito a las cepas:
- Cepa *Escherichia coli* Fpcrp M52-Q465: DSM 35327
 - Cepa *Escherichia coli* PelBLs+Ftbp E18-L741: DSM 35328

LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lun et al. (2014). The outer membrane protein, LamB (malto porin), is a versatile vaccine
- 20 candidate among the *Vibrio* species. *Vaccine*; 32(7):809-15.
doi: 10.1016/j.vaccine.2013.12.035.
- Gonçalves et al. (2022). Oral vaccination of fish against Vibriosis using spore-display
- 25 technology. *Front Immunol.*; 13:1012301.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1012301.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una proteína de unión a la transferrina para uso como vacuna subunitaria que activa la respuesta inmunitaria contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas o como adyuvante en combinación con una vacuna contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas, en la que la secuencia de la proteína de unión a la transferrina consiste en una secuencia funcional seleccionada del grupo que consiste en: los aminoácidos 23 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 23 a 754 de la secuencia SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 1 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1; y la propia secuencia SEQ ID NO: 1, completa.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que la composición además comprende una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis que consiste en una secuencia funcional seleccionada de entre: los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2; y la propia secuencia SEQ ID NO: 2, completa.
3. La composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína o las proteínas están en forma de cuerpos de inclusión.
4. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende al menos un adyuvante.
5. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la septicemia hemorrágica es de peces.
6. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la bacteria patógena se selecciona del grupo que consiste en: *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida*.
7. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en la que el pez se selecciona del grupo que consiste en: anguila, lubina, tilapia y rodaballo.

8. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en: oral, intramuscular, intraperitoneal y por inmersión.
- 5 9. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se administra como dosis de refuerzo de una vacuna previamente administrada contra la septicemia hemorrágica causada por bacterias patógenas.
- 10 10. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho uso además previene la transmisión de genes de virulencia entre bacterias.
- 15 11. Un pienso para peces que comprende una proteína de unión a la transferrina, en el que la secuencia de la proteína de unión a la transferrina consiste en una secuencia funcional seleccionada del grupo que consiste en: los aminoácidos 23 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 23 a 754 de la secuencia SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 1 a 748 de la secuencia SEQ ID NO: 1; y la propia secuencia SEQ ID NO: 1, completa.
- 20 12. El pienso según la reivindicación 11, que además comprende una proteína que confiere resistencia al complemento y a la fagocitosis consiste en una secuencia funcional seleccionada de entre: los aminoácidos 1 a 416 de la secuencia SEQ ID NO: 2 y la propia secuencia SEQ ID NO: 2, completa.
- 25 13. El pienso según la reivindicación 11 o 12, en el que la proteína o proteínas están en forma de cuerpos de inclusión.
- 30 14. Una cepa de *Escherichia coli* depositada en la colección de cultivos DSMZ con número de depósito DSM 35328, que contiene un plásmido que comprende un gen que codifica para una proteína de unión a la transferrina, en la que la secuencia de dicho gen es la secuencia SEQ ID NO: 3.
15. La cepa de *Escherichia coli* según la reivindicación 14, en la que la secuencia del plásmido es la secuencia SEQ ID NO: 5.

16. Un procedimiento de obtención de una proteína de unión a la transferrina, que comprende:

- 5 (a) cultivar la cepa de la reivindicación 14 o 15 en un medio de cultivo;
- (b) añadir isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido e incubar la mezcla resultante durante un tiempo entre 1 y 6 horas;
- (c) añadir fluoruro de fenilmetansulfonilo, lisozima y al menos un inhibidor de proteasas al producto resultante de la etapa anterior e incubar la mezcla resultante durante un tiempo entre 1 y 4 horas; y
- 10 (d) centrifugar el producto obtenido en la etapa anterior; descartar el sobrenadante y recoger el precipitado que contiene los cuerpos de inclusión que comprenden la proteína de unión a la transferrina.

17. El procedimiento según la reivindicación 16, que además comprende las siguientes etapas:

- 15 (e) sonicar el producto obtenido en la etapa (d);
- (f) solubilizar con un agente desnaturalizante e incubar durante un tiempo entre 16 y 18 horas;
- (g) sonicar el producto obtenido en la etapa (f); y
- 20 (h) someter el producto obtenido en la etapa anterior a una cromatografía de afinidad a níquel, obteniendo así una composición que comprende la proteína de unión a la transferrina purificada.

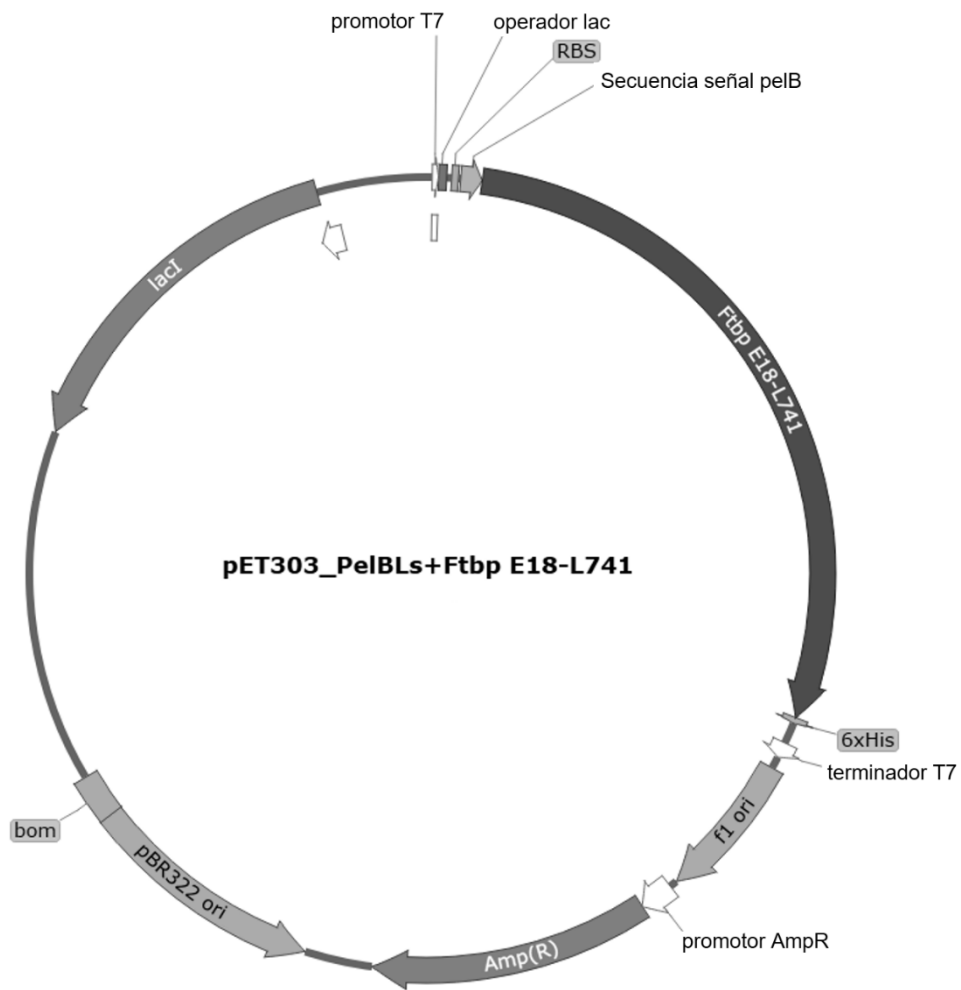


FIGURA 1

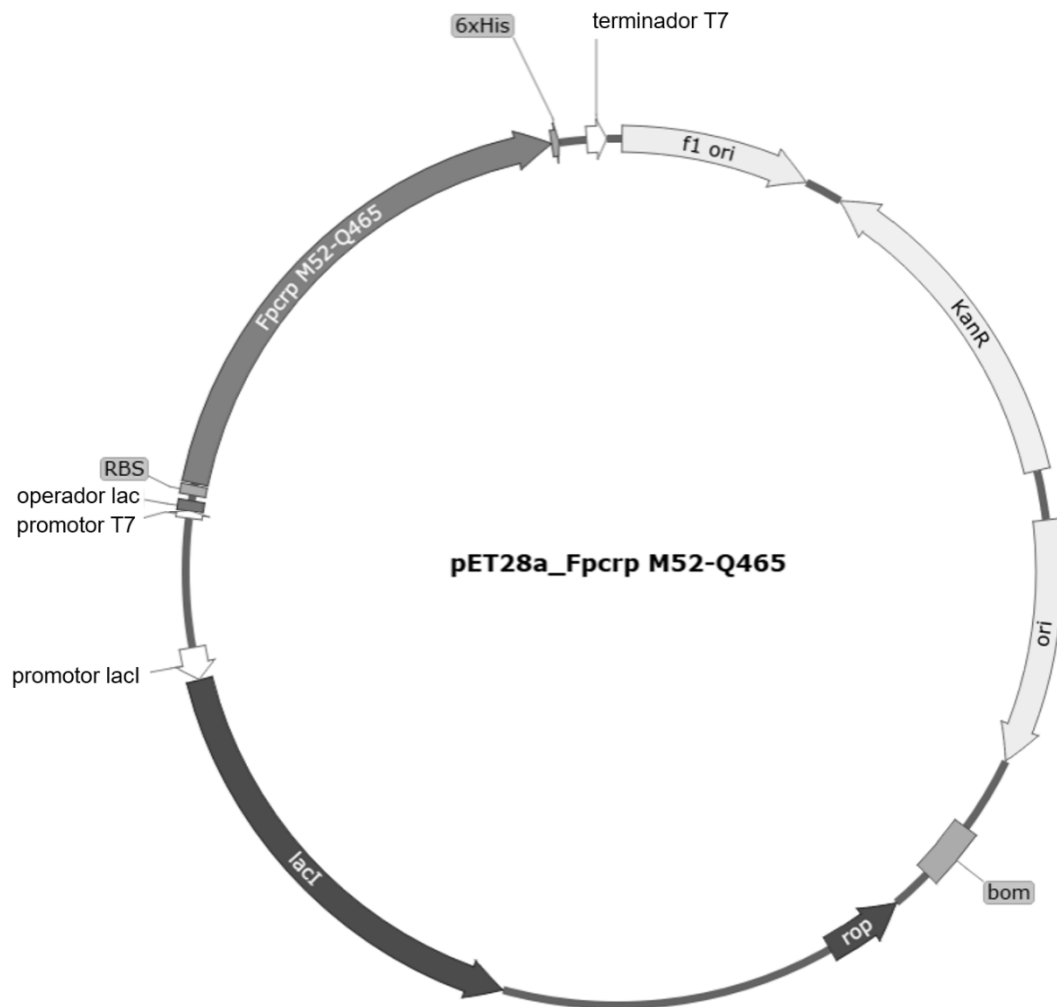


FIGURA 2

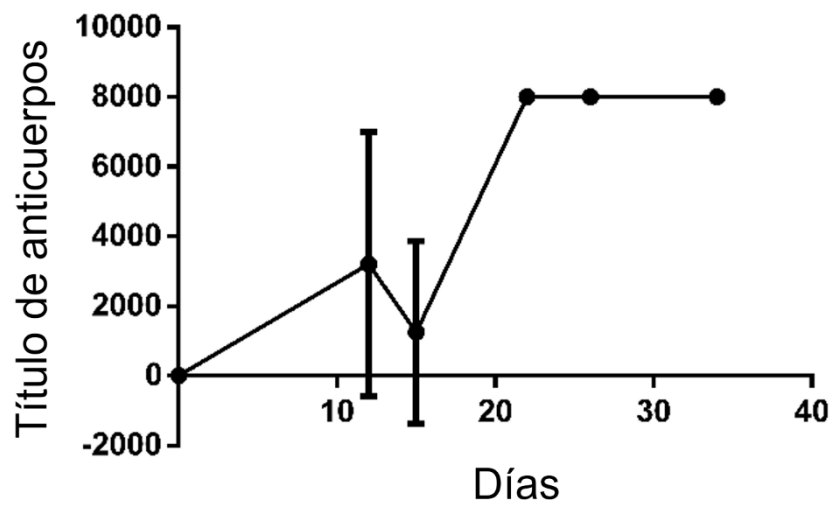


FIGURA 3

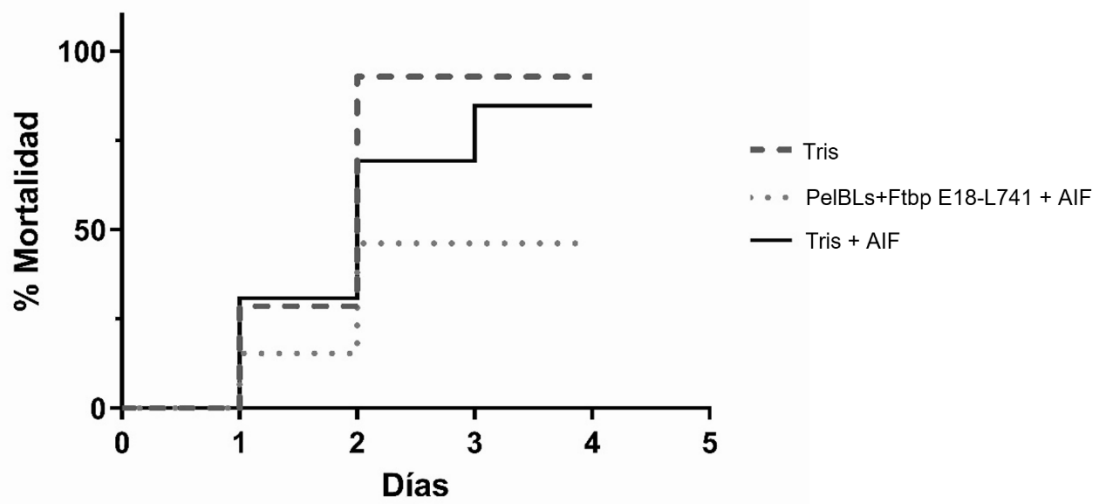


FIGURA 4

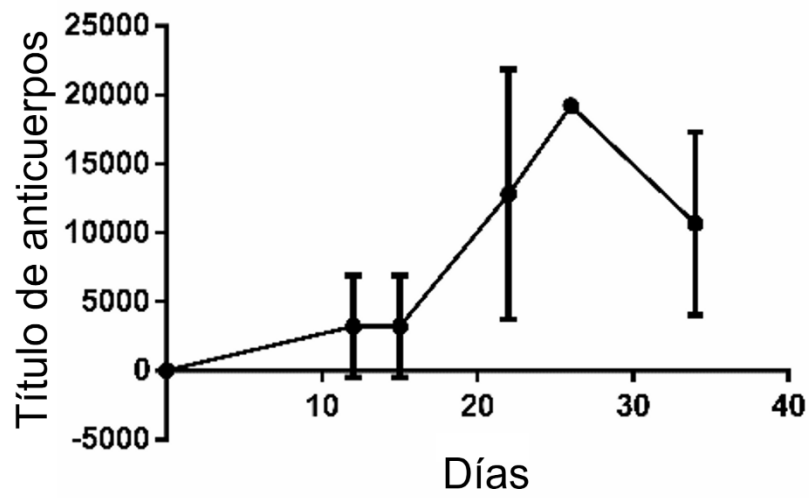


FIGURA 5

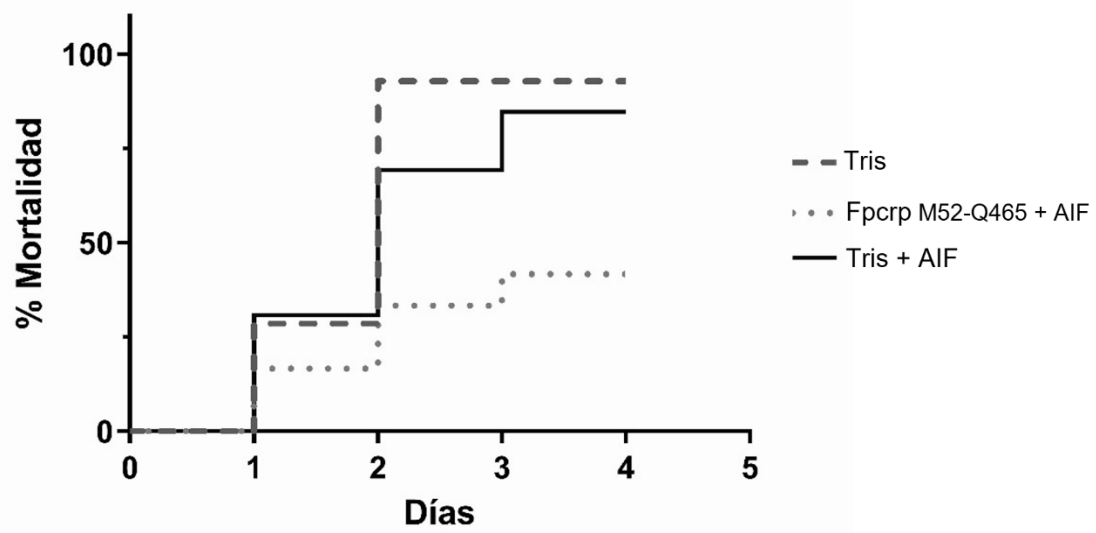


FIGURA 6

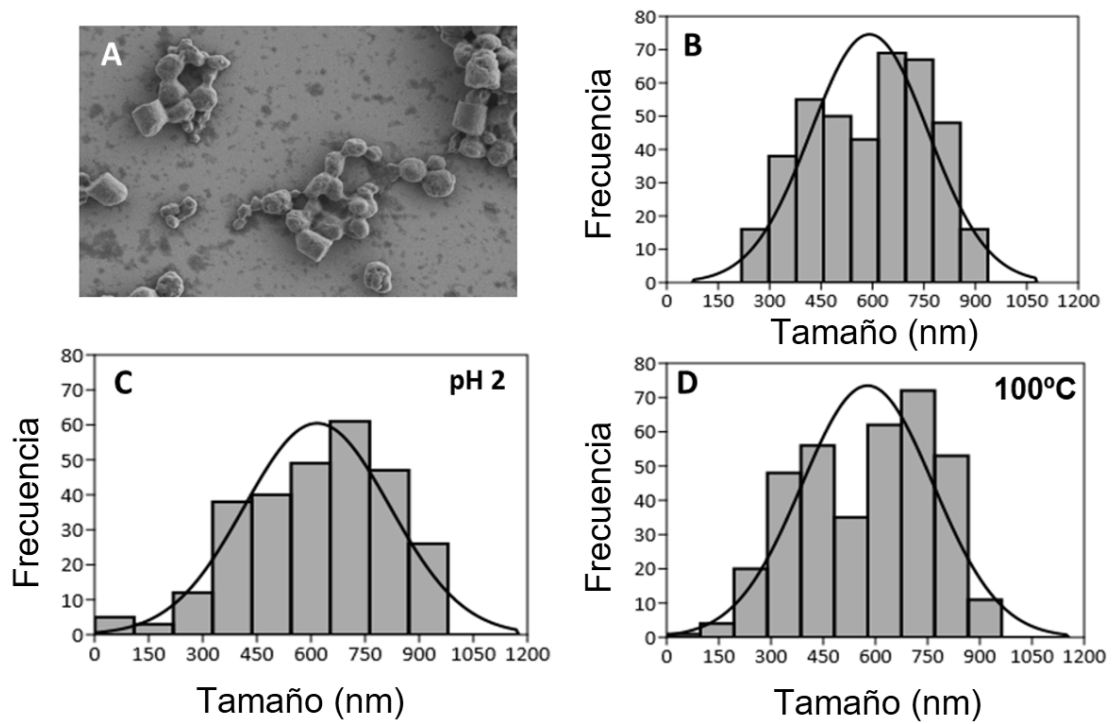


FIGURA 7

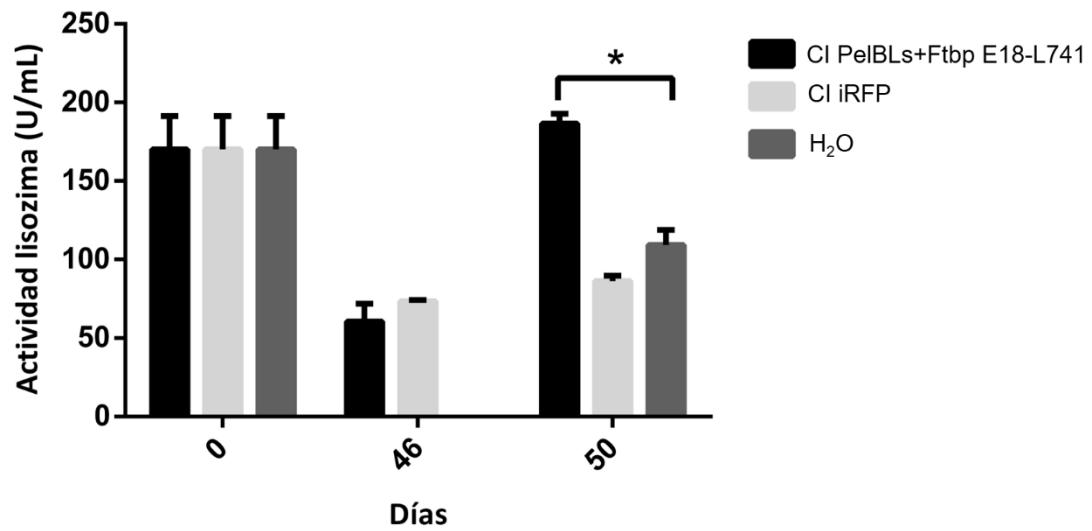


FIGURA 8

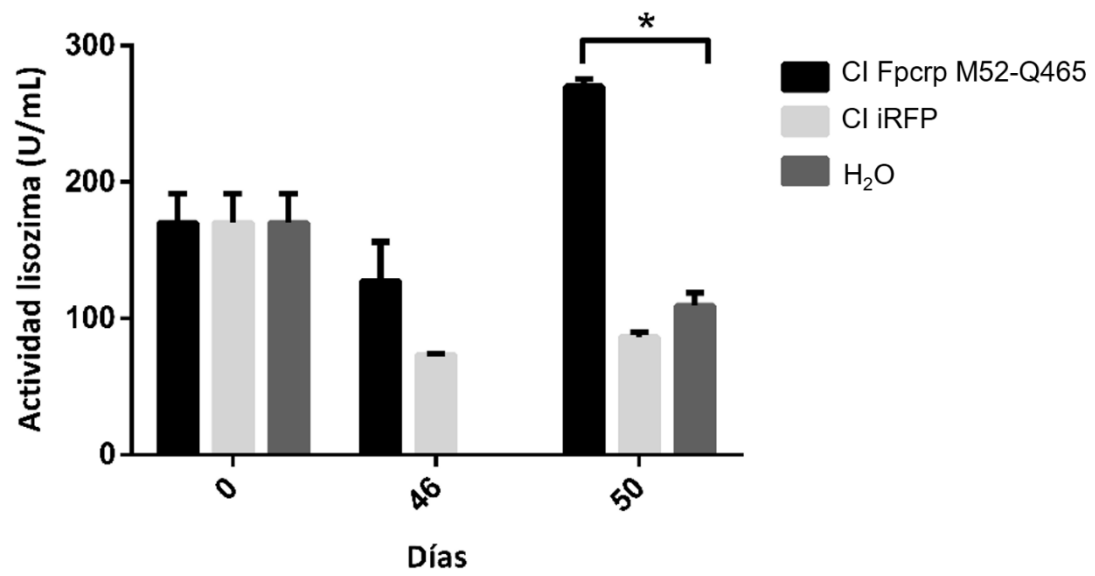


FIGURA 9



- ②① N.º solicitud: 202530183
②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.03.2025
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HERNÁNDEZ-CABANYERO, C. et al. Adaptation to host in <i>Vibrio vulnificus</i> , azoonotic pathogen that causes septicemia in fish and humans. Environ Microbiol, 08/2019, Vol. 21, Nº 8, Páginas 3118-3139, <DOI: doi: 10.1111/1462-2920.14714 >, todo el documento	1-8, 11-17
A	AMARO, C. et al. The Fish Pathogen <i>Vibrio vulnificus</i> Biotype 2: Epidemiology, Phylogeny, and Virulence Factors Involved in Warm-Water Vibriosis. Microbiol Spectrum, 2015, Vol. 3, Nº 3, artículo nº: VE-0005-2014, <DOI: doi:10.1128/microbiolspec.VE-0005-2014>, páginas 1 - 3; páginas 7 - 8; páginas 11 - 21;	1-8, 11-17
A	MAO, Z. et al. Expression and Immunogenicity Analysis of Two Iron-regulated Outer Membrane Proteins of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, Vol. 39, Nº 10, Páginas 763-769, ISSN 1672-9145, <DOI: 10.1111/j.1745-7270.2007. 00339.x>, todo el documento	1-8, 11-17
A	DEVI, S. J. et al. Capsular Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines of Carbotype 1 <i>Vibrio vulnificus</i> : Construction, Immunogenicity, and Protective Efficacy in a Murine Model. Infect Immun, 08/1995, Vol. 63, Nº 8, Páginas 2906-11, <DOI: doi: 10.1128/iai.63.8.2906-2911.1995>, todo el documento	1-8, 11-17
A	SONGLIN, G. et al. A novel recombinant bivalent outer membrane protein of <i>Vibrio vulnificus</i> and <i>Aeromonas hydrophila</i> as a vaccine antigen of American eel (<i>Anguilla rostrata</i>). Fish & Shellfish Immunology, 04/2015, Vol. 43, Nº 2, Páginas 477-484, página 477 páginas 481 - 483;	1-8, 11-17
A	CN 107583043 A (UNIV QINGDAO AGRICULTURAL) 16/01/2018, todo el documento	1-8, 11-17

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: 1-8, 11-17

Fecha de realización del informe
27.07.2026

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/28 (2006.01)**A61K39/106** (2006.01)**A61P37/04** (2006.01)

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

C07K, A61K, A61P

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

AbS colección patentes, AbS colección literatura no patente, Internet, EBI