

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de Julio de 2008 (03.07.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/077413 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/08 (2006.01) **A61K 39/12** (2006.01)
C12N 15/40 (2006.01) **A23K 1/16** (2006.01)

[CL/CL]; Av. Diagonal Pedro Aguirre Cerda, No. 1180, Oficina No. 403, Concepción (CL). **ÑANCUCHEO, CUEVAS, Iván, Patricio** [CL/CL]; Av. Diagonal Pedro Aguirre Cerda, No. 1180, Oficina No. 403, Concepción (CL).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/EC2007/000004

(74) Mandatario: **MANDAKOVIC, FALCONI, Sasha**; Av. Amazonas 477 Y Roca, Ed. Río Amazonas, Of. 900, Quito (EC).

(22) Fecha de presentación internacional:
20 de Diciembre de 2007 (20.12.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
3767-2006
22 de Diciembre de 2006 (22.12.2006) CL

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*): **SOLUCIONES BIOTECNOLOGICAS INNOVACION LTDA** [CL/CL]; Av. Diagonal Pedro Aguirre Cerda, No.1180, Oficina No. 413, Concepcion (CL). **EWOS S.A.** [CL/CL]; Parque Escuadron Km. 20, Coronel (CL). **FALCONI, PEREZ, Cecilia** [EC/EC]; Av. Amazonas 477 y Roca, Ed. Río Amazonas, Of. 900, Quito (EC).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **KRIMAN, FLEIDERMAN, Salomón, Luis** [CL/CL]; Av. Diagonal Pedro Aguirre Cerda, No. 1180, Oficina No. 403, Concepción (CL). **REYES, HERNANDEZ, Miguel, Ernesto** [CL/CL]; Av. Diagonal Pedro Aguirre Cerda, No.1180, Oficina No. 403, Concepción (CL). **OYARZUN, CAYO, Patricio, Alejandro** [CL/CL]; Av. Diagonal Pedro Aguirre Cerda, No. 1180, Oficina No. 403, Concepción (CL). **VILLEGAS, FERRARI, Claudio, Ricardo, Alfonso**

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- con reivindicaciones modificadas y declaración

Fecha de publicación de las reivindicaciones modificadas y de la declaración: 21 de Agosto de 2008

(54) Title: DNA VACCINES FOR FISH

(54) Título: VACUNAS ADN EN PECES

(57) Abstract: Process, use, method and formulation of inclusion of Deoxyribonucleic acid (DNA) in food compositions for livestock animals, in particular in aquacultural systems.

(57) Resumen: Proceso, uso, método y formulación de inclusión de vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN) en composiciones alimenticias para animales en cultivo, particularmente en sistemas acuícolas.

WO 2008/077413 A1

AMENDED CLAIMS**received by the International Bureau on July 12, 2008 (12.07.08)**

- 5 1. Una vacuna ADN para peces, CARACTERIZADA porque dicha vacuna esta
incluida en el alimento para peces y cuya formulación comprende:
- a. Un constructo plasmidial pcDNA-VP2 que porta un fragmento de 725pb
según SEC. ID a N°3,
 - 10 b. Liposoma DOTAP,
 - c. Excipientes que presentan propiedades nutricionales para el individuo
inmunizado.
- 15 2. Una vacuna ADN para peces en concordancia con reivindicación N°1,
CARACTERIZADA porque es una vacuna ADN y cuyos excipientes presentan la
siguiente composición promedio (g/Kg):
- a. Proteína cruda 450 a 600
 - b. Lípidos 150 a 250
 - 20 c. Cenizas 80 a120
 - d. Fibra cruda 6 a10
 - e. Extracto no nitrogenado 70 a 80
- 25 3. Una vacuna ADN para peces en concordancia con reivindicación N°1,
CARACTERIZADA porque es una vacuna ADN es de administración oral y cuyos
excipientes comprenden los siguientes ingredientes;
- a. harina de pescado,
 - b. aceite de pescado y/o aceite vegetal,
 - 30 c. subproductos de trigo y maíz,
 - d. concentrado e peptona,
 - e. gluten de trigo y maíz,
 - f. harina de krill,

- g. premezclas de vitaminas y sales minerales,
 - h. sales minerales de soya,
 - i. trigo,
 - j. betaína, y
 - 5 k. nucleótidos.
4. Un Procedimiento de obtención de una vacuna ADN para peces, CARACTERIZADO porque comprende las siguientes etapas:
- 10 a. Síntesis del constructo con los cebadores de la fig nº1
 - b. formación del constructo plasmidial pcDNA que contiene la SEQ ID 3,
 - c. transfección, clonamiento y purificación de pcDNA-VP2,
 - d. formación del complejo contiene un plásmido portador de un fragmento de la SEQ ID 3 del virus IPNV y el liposoma DOTAP generando el complejo
 - 15 molecular pcDNA4/HisMaxTOPO, denominado lipoplex,
 - e. aspersión y mezclado e integración del lipoplex a la composición alimenticia , denominada alimento base, constituyendo una vacuna oral o formulado vacunal,
 - f. envasado del alimento que contiene la vacuna ADN.
- 20
5. Un Procedimiento de obtención de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicación N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de transfección, clonamiento y purificación se utilizó la cepa LMBP 5333.
- 25
6. Un Procedimiento de obtención de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicación N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de aislamiento y purificación del plásmido recombinante pcDNA-VP2, se realiza a través de proceso de lisis alcalina y sucesivas etapas de filtración y ultrafiltración.
- 30
7. Un Procedimiento de obtención de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicación N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de aspersión/mezclado e integración del complejo lipoplex al alimento base, la incorporación de la vacuna al alimento puede operar en batch, de acuerdo a dos formas preferentes de proceso, que incluyen ambas, una vía de alimentación seca y una vía líquida.

- 5 8. Un Procedimiento de obtención de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicación N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de aspersion/mezclado e integraci3n del complejo lipoplex al alimento base, de acuerdo a la primera opci3n de adici3n de la vacuna, en la v3a de alimentaci3n seca, el alimento base, en forma de pellets, es vertido a un aceitador-mezclador bajo condiciones de vac3o.
- 10 9. Un Procedimiento de obtenci3n de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicaci3n N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de aspersion/mezclado e integraci3n del complejo lipoplex, de acuerdo a la primera opci3n de adici3n de la vacuna, en la v3a de alimentaci3n l3quida opera paralelamente a la v3a seca, a trav3s de dos etapas, 3stas se basan en dos dep3sitos, manteniendo uno de ellos el lipoplex predosificado de acuerdo al calibre, y en el otro dep3sito la cantidad de alimento base que fue programada previamente en el batch de aceitado.
- 15 10. Un Procedimiento de obtenci3n de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicaci3n N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de aspersion/mezclado e integraci3n del complejo lipoplex, de acuerdo a la primera opci3n de adici3n de la vacuna, en la v3a de alimentaci3n l3quida opera en paralelo y en dos etapas, en la primera etapa se adicional la vacuna mediante una fina aspersion bajo condiciones de vac3o y en la segunda etapa, a presi3n atmosf3rica normal, se aspersa aceite de pescado prepesado en el segundo dep3sito.
- 20 11. Un Procedimiento de obtenci3n de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicaci3n N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de aspersion/mezclado e integraci3n del complejo lipoplex, de acuerdo a la segunda opci3n de adici3n a la vacuna, la incorporaci3n se puede desarrollar en operaci3n batch a trav3s de dos v3as de alimentaci3n, que incluyen una v3a seca y una v3a l3quida.
- 25 12. Un Procedimiento de obtenci3n de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicaci3n N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de aspersion/mezclado e integraci3n del complejo lipoplex, de acuerdo a la segunda opci3n de adici3n a la vacuna, la v3a seca se clasifica en un pes3metro una cantidad predefinida de alimento
- 30

base, en forma de pellets, el cual es incorporado a un mezclador tipo paila rotativa de ángulo y velocidad variable.

- 5 13. Un Procedimiento de obtención de una vacuna ADN en concordancia con la reivindicación N°4, CARACTERIZADO porque en la etapa de aspersión/mezclado e integración del complejo lipoplex, de acuerdo a la segunda opción de adición a la vacuna, la vía líquida opera en paralelo con el mezclado y consiste en un sistema de aspersión conectado a un dosificador pre-programado de acuerdo al calibre y cantidad de alimento base.
- 10
14. Una composición inmunológicamente activa que contiene una vacuna para peces CARACTERIZADA porque es una vacuna ADN y cuya composición comprende:
- 15
- a. Un principio activo que es derivado del uso de los cebadores de la Fig n°1, y cuya secuencia es la SEQ ID 3,
 - b. DOTAP un liposoma catiónico como vehículo,
 - c. Excipientes digeribles, nutricionales, por los peces y que son alimenticios e inocuos, farmacéuticos aceptables.
- 20
15. Una composición farmacéutica que contiene una vacuna para peces en concordancia con la reivindicación N°14, CARACTERIZADA porque es una vacuna ADN de administración oral.
- 25
16. Una composición farmacéutica que contiene una vacuna para peces en concordancia con la reivindicación N°14, CARACTERIZADA porque permite la inmunización contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa de peces y además, permite la nutrición de los individuos.
- 30
17. Una composición farmacéutica que contiene una vacuna para peces en concordancia con la reivindicación N°14, CARACTERIZADA porque la forma de administración farmacéutica es de pellets.

18. Una composición farmacéutica que contiene una vacuna para peces en concordancia con la reivindicación N°14, CARACTERIZADA porque la formulación farmacéutica es útil para entregar inmunidad a peces.
- 5 19. Un proceso para obtener la formulación que contiene una vacuna ADN para peces, CARACTERIZADO porque comprende las siguientes etapas:
- a. Síntesis del constructo con los cebadores SEQ ID 1,
 - b. formación del constructo plasmidial pcDNA que contiene la SEQ ID 3
 - c. transfección, clonamiento y purificación pcDNA-VP2,
 - 10 d. formación del complejo contiene un plásmido portador de un fragmento de la SEQ ID 3 del virus IPNV y el liposoma DOTAP generando el complejo molecular denominado lipoplex,
 - e. aspersión y mezclado e integración del lipoplex a la composición alimenticia , constituyendo una vacuna oral o formulado vacunal,
 - 15 f. envasado del alimento que contiene la vacuna ADN.
20. Un proceso para obtener un alimento para animales que contiene una vacuna ADN, CARACTERIZADO porque comprende las siguientes etapas:
- 20 a. Síntesis del constructo con los cebadores de interés,
 - b. formación del constructo plasmidial que contiene la secuencia de interés,
 - c. transfección, clonamiento y purificación de la secuencia de interés,
 - d. formación de un complejo contiene un plásmido portador de un fragmento de interés y un liposoma, generando el complejo molecular estable,
 - 25 e. aspersión y mezclado e integración del complejo a la composición alimenticia , constituyendo una vacuna oral o formulado vacunal,
 - f. envasado del alimento que contiene la vacuna ADN.
- 30 21. Una composición alimenticia en concordancia con la reivindicación N° 19, CARACTERIZADA porque es producida por el proceso de la reivindicación anterior.

22. Una composición alimenticia en concordancia con la reivindicación N° 19, CARACTERIZADA porque es útil para otorgar inmunidad a organismos acuáticos, particularmente peces.
- 5 23. Una composición alimenticia CARACTERIZADA porque contiene la siguiente composición promedio (g/Kg):
- | | | |
|----|----------------------------|-----------|
| | a. Proteína cruda | 450 a 600 |
| | b. Lípidos | 150 a 250 |
| 10 | c. Cenizas | 80 a 120 |
| | d. Fibra cruda | 6 a 10 |
| | e. Extracto no nitrogenado | 70 a 80 |
- 15 24. Una célula transformada de *E.coli* JM109, CARACTERIZADA porque porta la SEQ ID 3, cuyo n° de depósito internacional es LMBP5333 y es útil para la amplificación del plásmido pcDNA-VP2
- 20 25. Una célula hospedadora CARACTERIZADA porque pertenece a la línea celular CHSE-214 y contiene la SEQ ID3 que es útil para otorgar inmunidad a peces.
- 25 26. Un polipéptido CARACTERIZADO porque deriva de la transcripción y traducción de la SEQ ID 3
27. Un vector de expresión CARACTERIZADO que corresponde a la cepa LMBP5333, útil para la síntesis de vacuna contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa de peces.

Statement under article 19 (1) of the PCT regarding amendments to the claims

The original claims 1-30 of the application have been replaced by 1-27 to address the defects regarding claiming structure and lack of clarity, as observed by the ISA. The preamble of the each of the claims has been modified, and they have been ordered to address the following structure: a) ADN vaccine; b) Process for obtaining the vaccine; c) Pharmaceutical compound that contains the vaccine; d) Process for obtaining the pharmaceutical compound; e) Process for obtaining food for animals that contains the vaccine of (a); f) Food obtained by the process (e). Therefore, modifications are limited to a new wording and a different order of the claims.