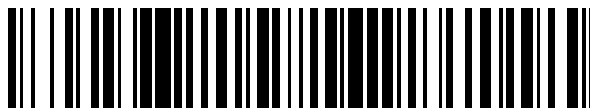


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 827 148**

21 Número de solicitud: 201931006

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

19.11.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.05.2021

Fecha de concesión:

11.10.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.10.2021

73 Titular/es:

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)
(70.0%)**

Ctra. de La Coruña, km 7,5

28040 Madrid (Madrid) ES y

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF ABERDEEN (30.0%)**

72 Inventor/es:

TAFALLA PIÑEIRO, Carolina;

MUÑOZ ATIENZA, Estefania;

SECOMBES, Christopher J.;

HOLLAND, Jason W. y

FABER, Marc

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

54 Título: **Plásmido codificante para el receptor del factor de activación de células B (BAFF-R) y usos del mismo en el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias en peces**

57 Resumen:

Plásmido codificante para el receptor del factor de activación de células B (BAFF-R) y usos del mismo en el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias en peces.

La presente invención se refiere a un plásmido que codifica para una proteína de fusión que comprende un péptido señal y el dominio extracelular del receptor del factor de activación de células B (BAFF-R), y opcionalmente, un fragmento de la región constante (Fc) de una inmunoglobulina. La invención se refiere, además, a las composiciones que comprenden dicho plásmido, y al uso de las mismas en el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias en peces, más preferiblemente en salmónidos.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 827 148 B2

DESCRIPCIÓN

Plásmido codificante para el receptor del factor de activación de células B (BAFF-R) y usos del mismo en el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias en peces

5

La presente invención se engloba en el sector técnico de la acuicultura, específicamente en el tratamiento y prevención de enfermedades que cursan con inflamación mediada por células B. Así, la invención se refiere a un plásmido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína de fusión que comprende un péptido señal y el dominio extracelular del receptor del factor de activación de células B (BAFF-R), y opcionalmente, un fragmento Fc de una inmunoglobulina. Más concretamente, la presente invención divulga también el uso de dicho plásmido y de composiciones que lo comprenden como medicamento, y más específicamente, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursan con inflamación mediada por células B, en peces, más preferiblemente en salmónidos.

10

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El crecimiento de la acuicultura intensiva ha provocado un incremento de la incidencia de enfermedades inflamatorias en peces causadas por virus, bacterias o parásitos. En este sentido, la incidencia de enfermedades que cursan con inflamación mediada por células B, como la enfermedad proliferativa renal (PKD, del inglés *Proliferative Kidney Disease*) causada por el mixozoo *Tetracapsuloides bryosalmonae*, o el síndrome de la marca roja, es cada vez mayor en la acuicultura de salmónidos tanto en Europa como en América del Norte (Grabner, D. S., y M. El-Matbouli. Dis. Aquat. Organ. 2010; 90: 197-206; Okamura, B., et al. Freshwater Biol. 2011; 56: 735-753). En España, la enfermedad PKD se ha identificado como uno de los mayores problemas del cultivo de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), originando importantes pérdidas económicas en este sector, principalmente durante los meses de verano cuando el agua alcanza una temperatura superior a 15°C, que favorece la proliferación y la infección por parte del parásito.

20

25

30

35

El mixozoo *T. bryosalmonae* tiene un ciclo de doble hospedador afectando a distintas especies de salmónidos y al briozoo *Fredericella sultana* que es el hospedador

invertebrado. Los briozoos infectados por este parásito liberan malacoesporas en el agua que invaden las branquias de los salmónidos. Posteriormente, el parásito migra a través del sistema vascular hasta el riñón y el bazo, siendo éstos los principales órganos dianas para su desarrollo y proliferación en los salmónidos. Cuando la temperatura del agua es superior a 15°C, la proliferación extraesporogónica y el desarrollo de *T. bryosalmonae* en el tejido intersticial del riñón de los salmónidos produce una inflamación crónica caracterizada por una hiperplasia linfocítica, formación de lesiones granulomatosas, atrofia renal e hipersecreción de inmunoglobulinas por los linfocitos B. Como consecuencia de la desregulación del sistema inmune tras la infección parasitaria, los peces son más susceptibles a infecciones secundarias y las mortalidades pueden alcanzar hasta el 100%. En cambio, cuando la temperatura del agua es inferior a 15°C, el hospedador desarrolla una respuesta inmune moderada frente al parásito, asociada con una menor sintomatología clínica y poca mortalidad.

Plásmidos de expresión eucariota que codifican para un antígeno vacunal han sido utilizados en peces como vacunas. En este sentido, la solicitud de patente internacional WO2006035084 describe construcciones génicas que comprenden la secuencia codificante de péptidos inmunogénicos de patógenos de animales acuáticos y el uso de dichas construcciones como vacunas para la prevención de enfermedades infecciosas en animales acuáticos. Por otro lado, la solicitud de patente internacional WO2008077413A1 describe el uso, el método y la formulación de inclusión de vacunas de ADN en composiciones alimenticias para animales en cultivo, particularmente en sistemas acuícolas. También en la patente ES2321789B1 se describe la utilización de un vector de expresión como inmunoestimulante o adyuvante para vacunas ADN y prevenir la infección de peces por rhabdovirus, tales como el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV). Por otro lado, también en la solicitud de patente internacional WO2014041189A1 se describen ácidos nucleicos, así como las vacunas que comprenden dichos ácidos nucleicos, y el uso de las mismas contra los agentes causantes de la enfermedad del páncreas (SPD, del inglés *Salmon Pancreas Disease*) causada por un alfavirus del salmón (SAV).

Es importante mencionar que, hasta el año 2017, la inyección de vectores o plásmidos de expresión para la prevención de enfermedades en acuicultura, no estaba permitida

- en peces destinados para consumo humano en la Unión Europea, pero fue precisamente en ese año cuando la Comisión Europea dio luz verde a la utilización de una vacuna de ADN para inyección intramuscular en acuicultura. Específicamente, se trata de la inyección del plásmido pUK-SPDV-poly2#1, comercializado como Clynav, Elanco GmbH, Alemania, para proteger al salmón Atlántico (*Salmo salar*) frente a la enfermedad SPD causada por el subtipo 3 del alfavirus del salmón (SAV3) (CVMP assessment report for CLYNAV (EMEA/V/C/002390/0000). *Salmon pancreatic disease vaccine (recombinant DNA plasmid)*).
- 10 Por el contrario, no existen tratamientos comerciales para prevenir y/o tratar la enfermedad PKD, ni la enfermedad de la marca roja en salmónidos, ya que el uso de compuestos efectivos frente al parásito *T. bryosalmonae*, como el verde malaquita y la fumagilina, no están registrados en la Unión Europea para su empleo en acuicultura debido a los efectos nocivos que producen en la salud de los humanos que consumen dichos animales. Por ello, teniendo en cuenta que la incidencia de dicha enfermedad es cada vez mayor, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar compuestos útiles para el tratamiento de patologías que cursan con inflamación mediada por células B, tales como por ejemplo, la enfermedad PKD provocada por el mixozoo *T. bryosalmonae* o la enfermedad de la marca roja, en salmónidos. Dichos compuestos y/o sistemas de prevención y/o tratamiento deberían ser, ventajosamente, fáciles y económicos en cuanto a su producción y administración.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 25 Para solucionar el problema de la técnica mencionado anteriormente, los inventores han utilizado la estrategia de inhibir la señalización mediada por la citoquina BAFF (*B-cell activating factor*), implicada en procesos de maduración, activación de los linfocitos B, y desarrollo y activación de órganos linfoides. Esta citoquina ejerce importantes funciones reguladoras induciendo respuestas pleiotrópicas a través de su interacción con tres receptores: TACI, BCMA y BAFF-R, cuya expresión está restringida fundamentalmente a linfocitos B y T. Para llevar a cabo dicha estrategia han diseñado plásmidos de expresión eucariota que comprenden secuencias que codifican para cada una de las regiones solubles de cada receptor de BAFF, específicamente BAFF-R, TACI y BCMA, de manera independiente. Así de esta manera, la administración de dichos plásmidos, via intramuscular, es capaz de inhibir la respuesta inflamatoria, y

por lo tanto, son útiles en el tratamiento de infecciones que cursan con inflamación mediada por células B, tales como por ejemplo, la PKD y la marca roja, en salmónidos, preferiblemente en trucha arcoíris.

5 Más concretamente, la presente invención se refiere a la síntesis de una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la región soluble (dominio extracelular) de BAFF-R, o la región soluble de TACI, o la región soluble de BCMA, procedentes de la trucha arcoíris, unidas inmediatamente después de una secuencia de aminoácidos que comprende el péptido señal de la interleuquina
10 2 (IL-2) de la trucha arcoíris, y cuando dicha proteína de fusión se administra a la trucha arcoíris, preferiblemente comprendida en un plásmido, es capaz de bloquear la actividad de la citoquina BAFF, siendo así útil en el tratamiento de infecciones que cursan con inflamación mediada por células B, tales como por ejemplo, la PKD y la marca roja. Más concretamente, la PKD conlleva un gran aumento de los niveles de
15 expresión de la citoquina BAFF y es provocada por la infección por el parásito *T. bryosalmonae*. Así, mediante dichas proteínas de fusión, incluidas, de manera independiente, en un plásmido que se administra a los animales infectados, se disminuye la patología asociada a dicha infección, y por lo tanto, se reduce la mortalidad que conlleva, especialmente en época de verano cuando la temperatura del
20 agua se encuentra por encima de 15°C.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el tratamiento de infecciones en acuicultura se ha basado principalmente en el uso de vacunas que comprenden antígenos del patógeno, en cambio, la presente invención va dirigida a la obtención de
25 moléculas, específicamente plásmidos o vectores, que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican proteínas de fusión a base de péptidos endógenos del hospedador, con el objetivo de bloquear rutas inmunológicas que se encuentran alteradas cuando el animal ha sido infectado por un patógeno, siendo por tanto útiles en el tratamiento y/o prevención de dichas infecciones.

30

Tal y como se muestran en los ejemplos incluidos en el presente documento, la administración del plásmido que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de fusión mencionada anteriormente, en truchas infectadas de manera natural con el parásito *T. bryosalmonae*, reduce el grado de inflamación renal y la
35 mortalidad de dichos animales (Ejemplo 4), así como la carga parasitaria en los

animales tratados con el plásmido de la invención (Ejemplo 5).

Así, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una proteína de fusión, de aquí en adelante se le denominará, proteína de fusión de la invención, que comprende una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 2, fusionada a una segunda secuencia de aminoácidos, donde dicha segunda secuencia de aminoácidos tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 4.

La primera secuencia de aminoácidos que forma la proteína de fusión de la invención, corresponde con una secuencia que codifica un péptido señal, preferiblemente es una secuencia de aminoácidos que codifica para el péptido señal de la interleuquina 2 (IL-2). A efectos de la presente invención, el péptido señal de la IL-2 procede de la trucha arcoíris, y se corresponde con los aminoácidos 1 a 20 de la proteína con número de acceso CAM12545.1 en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A efectos de la presente invención, el término "péptido señal", "secuencia señal" o "péptido señal de localización", usados indistintamente a lo largo del presente documento se refiere a un péptido corto (5-30 aminoácidos de longitud) presente en el extremo N-terminal que dirige el transporte de proteínas hacia la vía secretora. El péptido señal dirige la translocación al retículo endoplasmático de la proteína a la cual va unido. Durante o después de la translocación, el péptido señal es escindido por una peptidasa señal, generando un péptido señal libre y una proteína madura secretada. Péptidos señal adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, péptidos señal, capaces de dirigir una proteína a la membrana de la célula, al núcleo, a la membrana nuclear, a la matriz mitocondrial, a la membrana mitocondrial, al retículo endoplásmico o sarcoplásmico, al citoplasma, al complejo de Golgi, al cloroplasto, al apoplasto o al peroxisoma. En una realización preferida, el péptido señal de la proteína de fusión de la invención es el péptido señal de la IL-2 de la trucha arcoíris (SEQ ID NO: 2).

La segunda secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la invención, corresponde con el dominio extracelular del receptor de BAFF (BAFF-R) procedente

de la trucha arcoíris (SEQ ID NO: 4). El dominio extracelular de BAFF-R se corresponde con los aminoácidos 21 a 75 de la proteína con número de acceso AQZ26593 en la base de datos NCBI. El BAFF-R es un receptor de membrana que pertenece a la superfamilia de los receptores y ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *Tumor Necrosis Factor*) y se encarga de regular la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células B.

En una realización preferida, la proteína de fusión de la invención comprende una primera secuencia de aminoácidos tal y como la SEQ ID NO: 2 y una segunda secuencia de aminoácidos tal y como la SEQ ID NO: 4. En otra realización más preferida la proteína de fusión de la invención comprende la SEQ ID NO: 8.

En otra realización preferida, la proteína de fusión de la invención comprende, además una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de una inmunoglobulina (Ig). En una realización más preferida, el dominio Fc pertenece a una inmunoglobulina G (IgG) murina, seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipos. El dominio Fc de una IgG en la proteína de fusión de la invención, permite la detección y purificación de dicha proteína de fusión. En una realización más preferida, el dominio Fc de una IgG1 murina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95, 96, 97, 98 y 99% de identidad con la SEQ ID NO: 6. En otra realización más preferida aún, el dominio Fc de la IgG1 murina es la SEQ ID NO: 6.

En otra realización preferida, la proteína de fusión de la invención comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la SEQ ID NO: 10. Más preferiblemente, la proteína de fusión de la invención comprende la SEQ ID NO: 10.

La combinación de polipéptidos para proporcionar una proteína de fusión puede conseguirse por varios medios, por ejemplo: químicamente por acoplamiento directo o a través de una estructura intermedia; o por fusión biológica molecular, a través de la combinación de moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que comprenden fragmentos de ácido nucleico capaces de codificar las dos, de manera que finalmente se produce un único producto de expresión continua. Así, a efectos de la presente invención, el término “fusionado a” o “unido a”, usados indistintamente a lo largo del

presente documento, se refiere, sin limitarse, a un polipéptido o proteína de fusión formado por la expresión de una secuencia nucleotídica quimérica creada mediante la combinación de más de una secuencia, generalmente mediante la clonación de un gen en un vector de expresión en un marco con un segundo gen tal que los dos genes
5 codifican un polipéptido continuo.

El término “identidad” “porcentaje de identidad” o “identidad de secuencia” entre dos secuencias (ácidos nucleicos o proteínas), se entiende que designa un porcentaje de nucleótidos o de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se comparan,
10 obtenido después del mejor alineamiento, siendo dicho porcentaje puramente estadístico y estando repartidas las diferencias entre las dos secuencias al azar y a lo largo de toda su longitud. Por “mejor alineamiento” o “alineamiento óptimo” se entiende que se designa el alineamiento por el cual el porcentaje de identidad determinado como se describe a continuación es el más elevado. Las comparaciones entre dos
15 secuencias de nucleótidos o de aminoácidos tradicionalmente se llevan a cabo: comparando estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, llevándose a cabo dicha comparación por segmento o por “ventana de comparación” para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de estas secuencias para la comparación se puede realizar, en
20 particular, con ayuda de uno de los siguientes algoritmos: el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), el algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch (1970), el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988), los programas informáticos que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTX, FASTA y TFASTA en el paquete de *software*
25 *Wisconsin Genetics* (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o los servidores de internet en particular los del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.embl.org>) y el proyecto Ensembl (<http://www.ensembl.org>)). Con el fin de obtener el alineamiento óptimo, se usa preferiblemente el programa BLAST, con la matriz BLOSUM 62.
30 También se pueden usar las matrices PAM o PAM250, así como una matriz de identidad para las secuencias de nucleótidos.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico, de aquí en adelante se le denominará, ácido nucleico de la invención, que codifica la proteína
35 de fusión de acuerdo con la invención.

En una realización preferida, el ácido nucleico de la invención comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende al menos un 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la SEQ ID NO: 1, más preferiblemente la SEQ ID NO: 1, fusionada a una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos un 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3, más preferiblemente la SEQ ID NO: 3. En otra realización más preferida, el ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que presenta al menos un 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la SEQ ID NO: 7, más preferiblemente el ácido nucleico de la invención comprende la SEQ ID NO: 7.

10

En otra realización más preferida, el ácido nucleico de la invención, comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifican para el dominio Fc de IgG1 murina, donde dicha secuencia de nucleótidos comprende al menos un 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la SEQ ID NO: 5, más preferiblemente la SEQ ID NO: 5.

15

En otra realización más preferida, el ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la SEQ ID NO: 9, más preferiblemente comprende la SEQ ID NO: 9.

20

En otro aspecto de la invención, ésta se refiere a un vector o plásmido de expresión, de aquí en adelante vector o plásmido de la invención, que comprende el ácido nucleico de la invención, en donde opcionalmente, dicho ácido nucleico está unido de forma operativa a una secuencia de control de expresión adecuada para la expresión en una célula huésped.

25

El término "vector de expresión" o "plásmido de expresión", utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y puede servir de vehículo para llevar a cabo la transcripción de una secuencia de interés que haya sido insertada en el mismo. El vector o plásmido de expresión pueden incorporarse también en un cósmido, un bacteriófago, un vector viral, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

30

35

A efectos de la presente invención, el término "unido de forma operativa", tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de control, por ejemplo, un

promotor u operador, que se coloca de manera adecuada en una posición relativa a una secuencia de codificación de tal manera que la secuencia de control dirija la producción de un polipéptido codificado por la secuencia codificante.

- 5 Un vector o plásmido de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector o plásmido adecuado, incluyendo vectores de ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos (una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN
10 de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos y vectores de ácidos nucleicos virales (ARN o ADN).

Los vectores o plásmidos de expresión útiles para hospedadores eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores o plásmidos que comprenden secuencias de control de
15 expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus, virus adenoasociados, citomegalovirus y retrovirus.

Las secuencias de control de expresión están diseñadas para controlar y dirigir la transcripción de genes de interés y la expresión posterior de proteínas en varios
20 sistemas celulares o sitios de interés. Los plásmidos combinan una secuencia de nucleótidos o gen de interés expresable con secuencias de control de la expresión (es decir, casetes de expresión) que comprenden elementos deseables tales como, por ejemplo, promotores, potenciadores, marcadores seleccionables, operadores, etc. En el vector o plásmido de expresión de la invención, las moléculas de ácido nucleico que
25 codifican para la proteína de fusión de la invención, pueden comprender o estar asociadas con cualquier promotor, potenciador, marcador seleccionable, operador, proteína represora, secuencias de terminación poliA y otros elementos facilitadores de la expresión.

30 A efectos de la presente invención, el término "promotor", se refiere a una secuencia de ADN suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia de ADN a la cual está unida de forma operativa, tal y como se ha descrito previamente. Ejemplos de promotores de expresión útiles en la presente invención son, promotores constitutivos tales como por ejemplo, el promotor/potenciador citomegalovirus (CMV) humano o
35 promotor IE principal de CMV (CMV-MIE), así como el promotor del virus del sarcoma

de Rous (RSV), promotor tardío del virus del simio 40 (SV40), promotores de SL3-3, MMTV, ubiquitina (Ubi), ubiquitina C (UbC) y LTR de VIH.

En una realización preferida, el vector o plásmido de la invención comprende un
5 promotor seleccionado del grupo que consiste en SV40, CMV, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi, UbC y LTR de VIH. En otra realización más preferida aún, el promotor es CMV.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden unirse de forma operativa a una secuencia de terminación poli (A) eficaz, un origen de replicación para
10 el producto plásmido en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible regulable (inducible, reprimible, regulado por el desarrollo) a diferencia de un promotor constitutivo como el IE de CMV (el experto en la materia reconocerá que dichos
15 términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica en ciertas condiciones).

Los marcadores seleccionables son elementos muy conocidos en la técnica. Bajo las condiciones selectivas, solo las células que expresan el marcador seleccionable
20 apropiado pueden sobrevivir. Comúnmente, los genes marcadores seleccionables expresan proteínas, generalmente enzimas, que confieren resistencia a varios antibióticos en cultivos celulares. En otras condiciones selectivas, las células que expresan un marcador de proteína fluorescente se hacen visibles y, por lo tanto, son seleccionables. Las realizaciones incluyen beta-lactamasa (*bla*) (gen de resistencia a
25 antibióticos beta-lactámicos o de resistencia a ampicilina o *ampR*), *bls* (gen de la acetil transferasa de la resistencia a blasticidina), *bsd* (gen de la resistencia a la blasticidina-S-desaminasa), *bsr* (gen de resistencia a la blasticidina-S), *Sh ble* (gen de resistencia a Zeocin®), higromicina fosfotransferasa (*hpt*) (gen de resistencia a higromicina), *tetM* (gen de resistencia a tetraciclina o *tetR*), neomicina fosfotransferasa II (*npt*) (gen de
30 resistencia a neomicina o *neoR*), *kanR* (gen de resistencia a kanamicina) y *pac* (gen de resistencia a puromicina).

En ciertas realizaciones, el vector o plásmido de la invención comprende uno o más genes marcadores seleccionables seleccionados del grupo que consiste en *bla*, *bls*,
35 *BSD*, *bsr*, *Sh ble*, *hpt*, *tetR*, *tetM*, *npt*, *kanR* y *pac*. En otras realizaciones, el vector

comprende uno o más genes marcadores seleccionables que codifican proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), proteína fluorescente ciano (CFP), proteína fluorescente ciano mejorada (eCFP) o proteína fluorescente amarilla (YFP).

5

En otra realización más particular, el plásmido de la invención comprende la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector de la invención.

10

A efectos de la presente invención, el término "célula huésped" incluye cualquier tipo de célula que sea susceptible a transformación, transfección, transducción y similares con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos o polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido y su fuente. La célula huésped puede ser eucariota, tal como de célula de mamífero, insecto, ave, peces, anfibio, reptil, planta o fúngica. La elección de una célula huésped adecuada puede también estar influida por la elección de la señal de detección. Por ejemplo, el uso de construcciones con genes reporteros (por ejemplo, lacZ, luciferasa, timidina quinasa o la proteína verde fluorescente "GFP") puede proporcionar una señal seleccionable mediante la activación o inhibición de la transcripción del gen de interés en respuesta a una proteína reguladora de la transcripción. De cara a conseguir una selección o "screening" óptimo, el fenotipo de la célula hospedadora deberá ser considerado.

25

Una célula huésped de la presente invención incluye células procariotas y eucariotas. Entre las procariotas se incluyen organismos Gram negativos (por ejemplo, *Escherichia coli*) o Gram positivos (por ejemplo, bacterias del género *Bacillus*). Las células procariotas se usarán, preferiblemente, para la propagación de la secuencia del control de la transcripción del vector que contiene el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención, lo que permitirá conseguir un mayor número de copias del vector conteniendo el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención. Entre las células hospedadoras procariotas adecuadas para la transformación de este vector se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse a, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*

35

typhimurium, y otras especies dentro de los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. En una realización más particular, la célula huésped procariota de la invención es una célula de *E. coli*. Las células eucariotas incluyen, entre otras, levaduras, células de insectos, células de mamífero, y

5 células de organismos parásitos (por ejemplo, Trypanosomas). Los sistemas de cultivo con células hospedadora de mamífero incluyen líneas celulares establecidas como las células COS, células L, células 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células madre embrionarias, con las células BHK, HeK o HeLa como células preferidas. Las células eucariotas son, preferiblemente, utilizadas para la expresión del gen

10 recombinante mediante la aplicación de la secuencia de regulación de la transcripción o el vector de expresión de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de la proteína de fusión de la invención, de ahora en adelante método primero de la invención, que comprende:

15

- a) cultivar la célula huésped de la invención en condiciones que permitan la producción de la proteína de fusión de la invención; y
- b) recuperar y purificar la proteína de fusión producida en la etapa (a) anterior.

20

Un cultivo de células hospedadoras se refiere al proceso de mantener y crecer las células hospedadoras. Los cultivos celulares necesitan condiciones contraladas de temperatura, pH, porcentajes de gases (oxígeno y dióxido de carbono), así como la presencia de los nutrientes adecuados para permitir la viabilidad y la división celular.

25 Los cultivos celulares pueden desarrollarse en sustratos sólidos como el agar, o en medio líquido, lo que permite cultivar grandes cantidades de células en suspensión.

El término "purificar" tal y como se emplea en la descripción, se refiere al aislamiento de la proteína de fusión de la invención y a su concentración, del resto de polipéptidos presentes en el medio de cultivo y de la célula hospedadora de la invención. El

30 aislamiento del polipéptido de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Las técnicas de cromatografía pueden estar basadas en el peso molecular, la carga iónica (basada en el estado de ionización de los aminoácidos en las condiciones de trabajo), la

35 afinidad de la proteína por determinadas matrices o columnas cromatográficas, o

mediante etiquetas de purificación, y puede realizarse en columna, en papel o en placa. El aislamiento de la proteína puede realizarse, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato amónico, cromatografía líquida rápida (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*) o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), empleando sistemas automatizados que reducen notablemente el tiempo de purificación e incrementan el rendimiento de la purificación. La expresión "etiqueta de purificación" o "etiqueta de afinidad", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una secuencia de aminoácidos que ha sido incorporada (generalmente, por ingeniería genética) a una proteína para facilitar su purificación. La etiqueta, que puede ser otra proteína o una secuencia corta de aminoácidos, permite la purificación de la proteína, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. Etiquetas de purificación conocidas en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse a, el péptido de unión a calmodulina (CBP), la enzima glutatión-S-transferasa (GST) o una cola de residuos de histidina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición, de aquí en adelante composición de la invención, que comprende la proteína de fusión, el ácido nucleico, el plásmido, o la célula huésped de la invención, y al menos un excipiente y/o vehículo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la proteína de fusión, el ácido nucleico, el vector o la composición de la invención para su uso como medicamento.

A partir de aquí, toda la información mencionada en relación con los usos médicos de los diferentes aspectos de la invención: la proteína de fusión, el ácido nucleico, el vector o la composición de la invención, hacen referencia indistintamente a todos ellos, aunque se mencione exclusivamente la composición de la invención.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. A efectos de la presente invención, los términos "medicamento", "composición farmacéutica", o "composición veterinaria", se emplean como sinónimos.

En una realización preferida, la composición de la invención es un medicamento para

uso veterinario, más preferiblemente para uso en animales acuáticos, más preferiblemente aún para su uso en peces, y más preferiblemente, en peces de la familia de los salmónidos.

- 5 "Animal acuático", tal como aquí se utiliza en el presente documento incluye a cualquier organismo multicelular que vive en el agua, típicamente a los peces. Preferentemente, dicho animal acuático es un animal perteneciente a una especie de pez cultivada mediante acuicultura. Ejemplos ilustrativos de dichos animales acuáticos incluyen los peces teleósteos, tales como peces vertebrados, por ejemplo, salmónidos
10 (e.g., truchas, salmones, etc.), carpas, rodaballos, doradas, lubinas, etc.

En una realización preferida, los animales acuáticos son preferiblemente animales pertenecientes a la familia de los salmónidos. El término "familia de salmónidos" dentro del alcance de esta invención se entenderá que comprende a todos los
15 representantes de la familia *Salmonidae*, especialmente de la subfamilia *Salmoninae* y, preferiblemente, las siguientes especies: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*); salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*); salmón del Atlántico (*Salmo salar*); trucha común (*Salmo trutta*); timalo (*Thymallus thymallus*); coregonos (*Coregonus* spp.); keta (*Oncorhynchus keta*); salmón rojo
20 (*Oncorhynchus nerka*); trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*); trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*); trucha alpina (*Salvelinus alpinus*). En una realización más particular los animales acuáticos son preferiblemente, trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y trucha común (*Salmo trutta*).

25 Las composiciones de esta invención, así como el resto de aspectos de la invención mencionados anteriormente, proteína de fusión, ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión de la invención, y el plásmido de la invención, son adecuados para tratar enfermedades parasitarias mixozoicas de importancia económica en especies de peces de piscifactoría, que incluyen *Kudoa* spp., *Ceratomyxa* spp., *Parvicapsula* spp.,
30 *Myxobolus* spp., *Tetracasuloides* spp., entre otras, preferiblemente son adecuadas para tratar enfermedades parasitarias provocadas por patógenos del género *Tetracasuloides* spp, preferiblemente por la especie *T. bryosalmonae*. Dichas composiciones también son útiles para el tratamiento de la marca roja.

35 Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición de la invención

para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias en animales acuáticos, preferiblemente enfermedades que cursan con inflamación mediada por células B, preferiblemente la marca roja o la enfermedad PKD, esta última causada por parásitos del género *Tetracapsuloides*, más preferiblemente por *T. bryosalmonae*.

En una realización más preferida, los animales acuáticos son preferiblemente peces, más preferiblemente peces de la familia de los salmónidos, tal y como se ha descrito anteriormente. En una realización más preferida, el animal acuático es la trucha arcoíris.

En otra realización más preferida, el parásito del género *Tetracapsuloides* spp., es preferiblemente la especie *T. bryosalmonae*.

El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto, preferiblemente animal acuático, más preferiblemente, pez, que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

La composición o medicamento al que se refiere la presente invención es preferiblemente de uso veterinario. El medicamento o composición de uso veterinario es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán "medicamentos veterinarios" las "premezclas para piensos medicamentosos" elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

Opcionalmente, el medicamento de la presente invención comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente aceptable. El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término "excipiente" se define como aquella materia que, incluida en las "formas galénicas", se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica o veterinaria y su biodisponibilidad.

El "vehículo" o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento o composición farmacéutica o veterinaria para diluir cualquiera de los componentes de la misma hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento o composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológica o veterinariamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición de la invención contendrá una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión, del ácido nucleico o del plásmido de la invención, para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Tal como se usa en la presente

descripción, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de la proteína de fusión, del ácido nucleico, o del plásmido de la invención contenida en la composición que es capaz de producir el efecto terapéutico deseado. En general, la cantidad efectiva que debe administrarse dependerá, entre otros factores, de las propias características del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben tenerse en cuenta sólo como guía para la persona conocedora de la técnica, que debe ajustar esta dosis dependiendo de los factores anteriormente descritos.

En cada caso la forma de presentación del medicamento o composición se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración veterinariamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. Así, la composición se puede presentar en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, intramuscular, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada, pero sin limitarse a estas formas. Como entiende el experto en la materia, en ocasiones la administración directa de la composición o del plásmido de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de la composición o del plásmido de la invención al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, *e.g.*, una cánula apropiada, por perfusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios mencionados en esta descripción o conocidos en la técnica.

En una realización preferida, la administración de la composición o del plásmido de la invención es una administración intramuscular.

La composición de la invención se formulará de acuerdo con la forma de administración elegida. Así, la composición de la invención puede prepararse en un modo de dosificación líquido, por ejemplo, en forma de solución o suspensión, para ser inyectada o perfundida al individuo, preferiblemente al animal acuático según se ha definido anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento y/o

prevención de enfermedades inflamatorias en animales acuáticos que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión, del ácido nucleico, del plásmido, o de la composición de la invención.

5 En una realización más particular del método de tratamiento y/o prevención de la invención, éste se caracteriza por que los animales acuáticos pertenecen a la familia de los salmónidos y se seleccionan de la lista que consiste en: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*); salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*); salmón del Atlántico (*Salmo salar*); trucha común (*Salmo*
10 *trutta*); timalo (*Thymallus thymallus*); coregonos (*Coregonus spp.*); keta (*Oncorhynchus keta*); salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*); trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*); trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) y trucha alpina (*Salvelinus alpinus*). En otra realización más particular, los salmónidos son la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la trucha común (*Salmo trutta*).

15 En otra realización más particular, las enfermedades inflamatorias que pueden afectar a especies de salmónidos de la lista anterior, comprenden la enfermedad proliferativa renal, causada por parásitos del género *Tetracapsuloides*, preferiblemente por *T. bryosalmonae*, y la enfermedad de la marca roja.

20 Las dosificaciones efectivas y los calendarios de administración de las composiciones que comprenden la proteína de fusión, del ácido nucleico, del plásmido, o de la composición de la invención, descritos en este documento pueden ser determinadas empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la experiencia en la
25 técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente amplios para producir el efecto deseado. La dosificación no debe ser tan alta como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. La dosis puede variar, y puede ser administrada en una o más administraciones de dosis
30 diarias, durante uno o varios días.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la
35 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la

invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

FIG. 1. Niveles de transcripción del gen que codifica el dominio extracelular del receptor de BAFF (BAFF-R) de trucha arcoíris tras la inyección intramuscular del plásmido pBAFF-R. A día 7 post-inyección, los peces se sacrificaron para muestrear el músculo de la zona dorsal y determinar los niveles de expresión de genes por PCR en tiempo real. El plásmido vacío sin la construcción génica se utilizó como control negativo. Los datos se muestran como la expresión relativa de cada gen con respecto a la expresión del gen control endógeno EF-1 α (media + DS; n=3-6).

FIG. 2. Proteína correspondiente al dominio extracelular del receptor de BAFF (BAFF-R) de trucha arcoíris detectada por la técnica *Western blot* empleando el sobrenadante concentrado de células EPC transfectadas con el plásmido pBAFF-R. El plásmido vacío sin la construcción génica se utilizó como control negativo. M, marcador.

FIG. 3. Efecto del tratamiento intramuscular con el plásmido pBAFF-R en truchas arcoíris naturalmente infectadas con *T. bryosalmonae*. **(A)** Grado de inflamación del riñón posterior de truchas tratadas con el plásmido pBAFF-R (n=20) o PBS (control negativo; n=24). La gráfica de valores individuales muestra el rango intercuartil y la mediana de los datos. **(B)** Porcentaje de truchas afectadas o muertas por PKD tras la inyección intramuscular del plásmido pBAFF-R o PBS (control).

25

FIG. 4. Niveles de transcripción del *ARNr 18S* de *T. bryosalmonae* tras la inyección intramuscular del plásmido (0,1 y 1 μ g) que contiene la secuencia del dominio extracelular del receptor de BAFF (pBAFF-R) en trucha arcoíris naturalmente infectadas por *T. bryosalmonae*. A día 110 post-inyección, los peces se sacrificaron para muestrear el riñón posterior y determinar los niveles de expresión del gen *ARNr 18S* de *T. bryosalmonae* por PCR en tiempo real. El plásmido vacío sin la construcción génica se utilizó como control negativo. Los datos se muestran como la expresión relativa de cada gen con respecto a la expresión del gen control endógeno EF-1 α (media + DS; n=5-7).

35

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

5

Ejemplo 1. Obtención del plásmido pBAFF-R (SEQ ID NO: 11) que codifica para la proteína de fusión IL-2-BAFF-R (SEQ ID NO: 8).

La secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 3) que codifica para el dominio extracelular del BAFF-R (SEQ ID NO: 4) procedente de trucha arcoíris se fusionó a la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 1) que codifica para el péptido señal de la IL-2 (SEQ ID NO: 2) de trucha arcoíris dando lugar a la construcción IL-2-BAFF-R que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 7 que codifica para la proteína de fusión IL-2-BAFF-R que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8.

15

Para permitir la posterior purificación de la construcción IL-2-BAFF-R, se fusionó a ésta la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 5) que codifica para la región Fc del dominio de tipo inmunoglobulina IgG1 de ratón (SEQ ID NO: 6) dando lugar a la construcción IL-2-BAFF-R-IgG1 que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 9, que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 10.

20

Así, la construcción anterior se clonó en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1+ (Invitrogen), previamente digerido por las enzimas de restricción HindIII/XhoI. A continuación, dicho plásmido, denominado pBAFF-R (SEQ ID NO: 11), se transformó en bacterias competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias transformadas se seleccionaron en el medio LB agar (Invitrogen) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) para la posterior extracción y purificación del plásmido (Invitrogen).

25

Posteriormente, la secuencia nucleotídica del plásmido pBAFF-R clonada se confirmó mediante secuenciación empleando el cebador T7 (SEQ ID NO: 12; 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') derivado del vector.

30

El plásmido vacío, sin la secuencia nucleotídica que codifica para la construcción génica IL-2-BAFF-R-IgG1 se utilizó como control negativo.

35

Ejemplo 2. Estudio de la transcripción de BAFF-R tras la inyección intramuscular de pBAFF-R (SEQ ID NO: 11).

Se utilizaron truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de 7 cm suministradas por la piscifactoría Cifuentes (Guadalajara, España). Para ello, los peces se mantuvieron en el Centro de Investigaciones en Sanidad Animal (CISA-INIA) a 14°C y se alimentaron diariamente con una dieta comercial (Skretting, Noruega). Antes de comenzar los experimentos, los peces se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante 2 semanas.

Los peces se dividieron en dos grupos y se inyectaron intramuscularmente con 1 µg de plásmido pBAFF-R resuspendido en 50 µl de solución salina (0,9% NaCl) estéril o con la misma cantidad de plásmido vacío (control negativo). Los peces se sacrificaron 7 días post-inyección y de cada pez se realizó un muestreo de la zona del músculo donde se había hecho la inyección para la extracción del ARN.

El ARN total del músculo se extrajo utilizando el reactivo Tri-reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenó a -80°C hasta su utilización. El ARN purificado se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A continuación, 1 µg de ARN se trató con la enzima ADNasa I empleando el kit RapidOut DNA Removal (Thermo Scientific) para eliminar las trazas de ADN genómico y se utilizó para sintetizar el ADNc con la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) y el oligo(dT)23VN (1.6 µM), según lo indicado por el fabricante. El ADNc resultante se diluyó en una proporción de 1:5 con agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Los niveles de expresión del dominio extracelular de BAFF-R se analizaron mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando el equipo LightCycler 96 System instrument (Roche). Todas las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado utilizando la mezcla de reacción FastStart Essential DNA Green Master (Roche) y cebadores específicos (Tabla 1). Las condiciones de la amplificación consistieron en un paso inicial de desnaturalización (95°C, 10 minutos), seguido de 40 ciclos de amplificación (95°C durante 10 s, 60°C durante 10 s y 72°C durante 10 s). Además, se obtuvo una curva de disociación leyendo la señal de fluorescencia cada grado entre las temperaturas 60°C y 95°C para comprobar que esta señal es debida a la

amplificación de un único producto. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos sin ADN molde y controles de transcripción reversa negativa (RT-). La expresión dominio extracelular del receptor BAFF-R se normalizó con la expresión del gen que codifica el factor de elongación-1 α (EF-1 α) de trucha arcoíris (Montero, J., J. et al., J. Virol. 2011; 85: 4046-4056) que se expresa constitutivamente en todos los órganos en igual medida, utilizando cebadores específicos (Tabla 1). Los niveles de expresión se calcularon con el método 2- Δ Ct, en el que Δ Ct se determinó restando el valor Ct de EF-1 α al valor Ct del gen diana (Livak, K. J., y T. D. Schmittgen. Methods. 2001;25: 402-408). El análisis estadístico se realizó mediante una *t* de Student de dos colas con la corrección de Welch y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

TABLA 1. Lista de cebadores utilizados en los estudios transcripcionales.

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
EF-1 α	SEQ ID NO: 13 (gatccagaaggaggtcacca)	SEQ ID NO: 14 (ttacgttcgaccttccatcc)
BAFF-R	SEQ ID NO: 15 (gacaaactgctcatcacctgtatc)	SEQ ID NO: 16 (atatccagacagctggactcactg)
ARNr 18S <i>T. bryosalmonae</i>	SEQ ID NO: 17 (ggacactgcatgtgctgcatagt)	SEQ ID NO: 18 (ccatgctagaatgtccaggcact)

Tal y como se observa en la **FIG. 1**, tras la inyección intramuscular del plásmido pBAFF-R se detectó un incremento de la expresión del ARNm de BAFF-R en el músculo (56 veces mayor) respecto de la expresión que mostraron las truchas tratadas con el plásmido vacío (control negativo).

Ejemplo 3. Obtención de sobrenadantes con el dominio extracelular del receptor de BAFF (BAFF-R) de trucha arcoíris.

Para la verificar que el plásmido pBAFF-R de la invención es capaz de transcribir y traducir de forma efectiva el dominio extracelular de BAFF-R de la trucha arcoíris, se transfectaron células EPC (*Epithelioma papulosum cyprinid*) con dicho plásmido pBAFF-R mediante el empleo del equipo 4D-NucleofectorTM (Lonza). Para ello, las células EPC mantenidas en medio Leibovitz (L-15, Life Technologies) suplementado

con penicilina (100 unidades/ml, Life Technologies), estreptomicina (100 µg/ml, Life Technologies) y suero fetal bovino (10% SFB, Life Technologies) se tripsinaron y se transfectaron con 1 µg de plásmido pBAFF-R empleando los reactivos del kit Amaxa P3 Primary cell (Lonza). A continuación, las células transfectadas se cultivaron en
5 placas de 24 pocillos a una concentración de 5×10^5 células/ml. Tras 24 h de incubación a 20°C, se cambió el medio de cultivo utilizando medio L-15 suplementado con antibióticos y 0,1% SFB. Tras incubar las células otras 24 h, los sobrenadantes se recogieron de los pocillos y se concentraron (50x) utilizando centricones con un corte de peso molecular de 3kDa (GE Healthcare Life Sciences). Adicionalmente, también
10 se recogieron los sobrenadantes de los cultivos de las células EPC transfectadas con el plásmido vacío (control negativo). Con el fin de verificar la correcta transfección de las células, se utilizó el plásmido pmaxGFP suministrado en el kit Amaxa como control positivo para la posterior visualización de la proteína verde fluorescente por microscopía de fluorescencia (Zeiss Axio Vert.A1).

15 Los sobrenadantes concentrados de las células EPC transfectadas con el plásmido pBAFF-R de la invención y con el plásmido vacío, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Para ello, el gel de poliacrilamida (12%; Bio-Rad)
20 se cargó con 20 µl de sobrenadante concentrado en condiciones reductoras y se tiñó con azul de Coomassie. La transferencia de las proteínas se hizo sobre una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad) empleando el equipo Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) para identificar la proteína correspondiente al dominio extracelular del receptor de BAFF de trucha arcoíris (BAFF-R) mediante *Western blot*.
25 Para ello, la membrana se bloqueó con 5% de leche desnatada en tampón fosfato salino (PBS) a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, la membrana se incubó con un anticuerpo primario anti-IgG de ratón producido en conejo (Sigma-Aldrich) y preparado en la solución de bloqueo a 4°C durante 16 h. Después la membrana se lavó tres veces con 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) preparado en PBS
30 durante 10 min y se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo producido en burro y conjugado con peroxidasa de rábano (GE Healthcare Life Sciences) a temperatura ambiente durante 1 h. Tras tres lavados en 0,1% Tween 20-PBS y un último lavado en PBS se procedió al revelado de la membrana por reacción quimioluminiscente de la peroxidasa empleando el kit ECL (GE Healthcare Life
35 Sciences).

Tal y como se observa en la **FIG. 2**, la proteína correspondiente al dominio extracelular de BAFF-R fue detectada, observándose una banda específica de 37 kDa.

Ejemplo 4. La administración del plásmido pBAFF-R (SEQ ID NO: 11) reduce el grado de inflamación del riñón posterior y la mortalidad en truchas naturalmente infectadas por *T. bryosalmonae*.

Se utilizaron 44 truchas de 30-40 g de la piscifactoría de Southampton (Reino Unido), libres de infección de *T. bryosalmonae* que se dividieron en dos grupos (20-24 peces por grupo). Los peces de uno de los grupos se trataron con dos inyecciones intramusculares (zona anterior y posterior de la aleta dorsal) del plásmido pBAFF-R (10 µg) disuelto en 20 µl de tampón fosfato (PBS) (20 µg del plásmido pBAFF-R administrados en total por pez). Los peces del segundo grupo se trataron de la misma manera, pero en lugar de administrarles el plásmido pBAFF-R sólo se les administró el mismo volumen de tampón fosfato (PBS) sin plásmido.

A continuación, ambos grupos de animales se introdujeron en una piscifactoría en la que se había detectado un brote de PKD (*Test Valley Trout*) registrando en cada momento el número de peces muertos. Este ensayo se hizo a mediados del mes de mayo, cuando la temperatura del agua aumentó, alcanzando valores superiores a 15°C. A los 90 días post-inyección, cuando la temperatura seguía siendo superior a 15°C y el brote por PKD persistía en la granja, las truchas se sacrificaron para analizar el nivel de inflamación del riñón posterior y así determinar el grado de infección por el parásito. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney* y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

Los resultados ponen de manifiesto que la administración intramuscular del plásmido pBAFF-R en las truchas produjo una disminución del grado de inflamación renal provocado por la infección de PKD con respecto al grado de inflamación renal que mostró el grupo control (**FIG. 3A**).

Se analizó también el porcentaje de mortalidad que presentaron ambos grupos de animales, poniéndose de manifiesto que dicho porcentaje de mortalidad fue menor en el grupo de truchas tratadas con el plásmido pBAFF-R (4,76%) respecto al porcentaje mostrado por grupo control (25%) (**FIG. 3B**). Además, tal y como se muestra en la **FIG.**

3B, el porcentaje de truchas que presentaron un grado de mortalidad ≤ 1 fue mayor (52,38%) en el grupo tratado con el plásmido pBAFF-R que en el grupo control (37,50%).

5 Ejemplo 5. La administración del plásmido pBAFF-R (SEQ ID NO: 11) reduce la carga de *T. bryosalmonae* en truchas naturalmente infectadas por este parásito.

Para determinar si la administración del plásmido pBAFF-R es capaz de modificar la carga parasitaria a largo plazo en truchas naturalmente infectadas con *T. bryosalmonae* y que consiguen sobrevivir a la enfermedad, se inyectó intramuscularmente el plásmido pBAFF-R en los peces para realizar estudios transcripcionales del gen *ARNr 18S* de *T. bryosalmonae*. Debido a la marcada estacionalidad de esta enfermedad parasitaria, el tratamiento con el plásmido pBAFF-R se realizó durante el mes de julio cuando se detectó un brote de PKD en el que aparecieron casos de mortalidad asociados a la sintomatología característica de esta enfermedad y, además, la temperatura del agua de la piscifactoría era superior a 15°C.

Se utilizaron 40 truchas arcoíris de 30-40 g de la piscifactoría de Cifuentes (Guadalajara, España) que se dividieron en cuatro grupos (10 peces por grupo). Se inyectó intramuscularmente en cada pez una cantidad de 100 µl de solución salina (0,9% NaCl) estéril con 0,1 o 1 µg del plásmido pBAFF-R (dos grupos), así como 0,1 o 1 µg del plásmido vacío sin la construcción en otros dos grupos (controles negativos). Los peces de cada grupo se sacrificaron 110 días post-inyección, en el mes de noviembre cuando la temperatura del agua era inferior a 15°C y el brote de PKD había remitido en la piscifactoría. Como se esperaba, en ningún caso se observó inflamación del riñón. De cada trucha se realizó un muestreo del riñón posterior para la extracción del ARN con Tri-reagent y posterior síntesis de ADNc utilizando la metodología explicada anteriormente en el Ejemplo 2.

Los resultados muestran que la administración de una dosis de 0,1 µg del plásmido pBAFF-R no indujo disminución de la expresión del gen *ARNr 18S* de *T. bryosalmonae* en el riñón posterior a los 110 días post-inyección (**FIG. 4**). Sin embargo, cuando se administró una dosis de 1 µg del plásmido pBAFF-R, se observó una disminución de la carga parasitaria detectada en el riñón a nivel transcripcional (**FIG. 4**).

35

Así, estos resultados indican que la administración del plásmido de la invención es capaz de favorecer la respuesta inmune específica del organismo infectado frente al parásito y su eliminación del organismo, así como controlar la inflamación mediada por las células B del tejido renal, favoreciendo así la supervivencia y la sintomatología de la infección provocada por *T. bryosalmonae*, en trucha arcoíris.

5

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión que comprende una primera secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con el péptido señal de la interleuquina 2 (IL-2) de SEQ ID NO: 2 fusionado a una segunda secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con el dominio extracelular del receptor de BAFF (BAFF-R) de SEQ ID NO: 4.
2. Proteína de fusión según la reivindicación 1 que comprende al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad la SEQ ID NO: 8.
3. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que además comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de una inmunoglobulina murina.
4. Proteína de fusión según la reivindicación 3 donde la inmunoglobulina es la IgG1 murina que comprende la SEQ ID NO: 6.
5. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con la SEQ ID NO: 10.
6. Ácido nucleico que codifica la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Ácido nucleico según la reivindicación 6 que comprende una secuencia con al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con cualquiera de las secuencias seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.
8. Plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en la que opcionalmente:

a) la molécula de ácido nucleico está unida de forma operativa a una secuencia de control de expresión adecuada para la expresión en una célula huésped; y/o,

b) el plásmido comprende uno o más genes marcadores seleccionables.

5

9. Plásmido según la reivindicación 8 caracterizado por que comprende la SEQ ID NO: 11.

10

10. Célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 o el plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9.

15

11. Composición que comprende la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, el plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, y al menos un excipiente y/o vehículo.

20

12. Composición según la reivindicación 11 caracterizada por que es una composición farmacéutica o veterinaria.

25

13. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, o la composición según las reivindicaciones 11 a 12 para su uso como medicamento.

30

14. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, o la composición según las reivindicaciones 11 a 12 para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias en animales acuáticos.

15. Proteína, ácido nucleico, vector o composición para su uso según la reivindicación 14 donde la administración es vía intramuscular.

16. Proteína, ácido nucleico, vector o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15 donde la enfermedad inflamatoria es causada por mixozoos del género *Tetracapsuloides*, preferiblemente por el mixozoo *T. bryosalmonae*.
- 5
17. Proteína, ácido nucleico, vector o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 donde las enfermedades inflamatorias son la enfermedad proliferativa renal y la enfermedad de la marca roja.
- 10
18. Proteína, ácido nucleico, vector o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 donde los animales acuáticos pertenecen a la familia de los salmónidos.
- 15
19. Proteína, ácido nucleico, plásmido o composición para su uso según la reivindicación 18 donde los salmónidos se seleccionan de la lista que consiste en: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*); salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*); salmón del Atlántico (*Salmo salar*); trucha común (*Salmo trutta*); tímalo (*Thymallus thymallus*); coregonos (*Coregonus* spp.); keta (*Oncorhynchus keta*); salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*); trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*); trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) y trucha alpina (*Salvelinus alpinus*).
- 20
20. Proteína, ácido nucleico, plásmido o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19 donde los salmónidos son trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y trucha común (*Salmo trutta*).
- 25

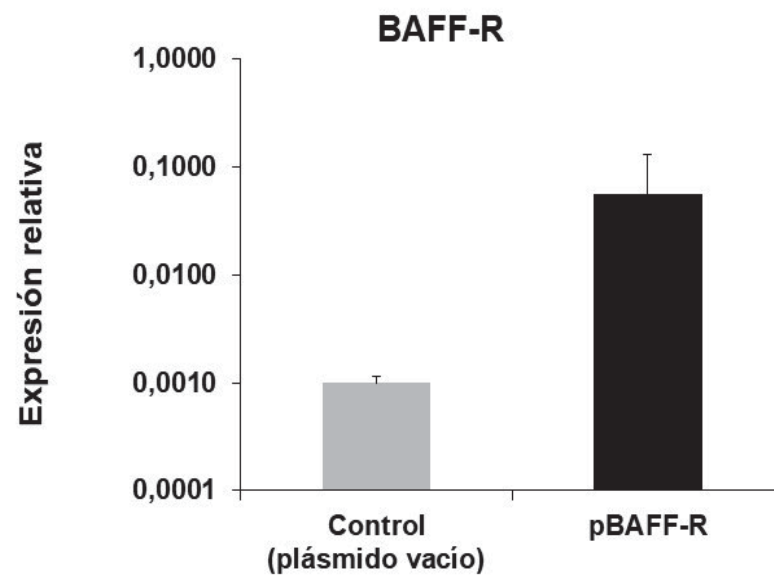


FIG. 1

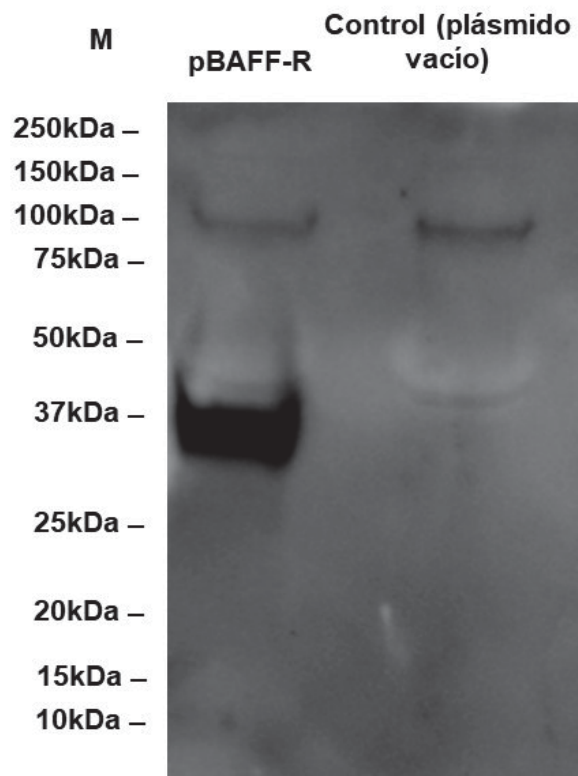


FIG. 2

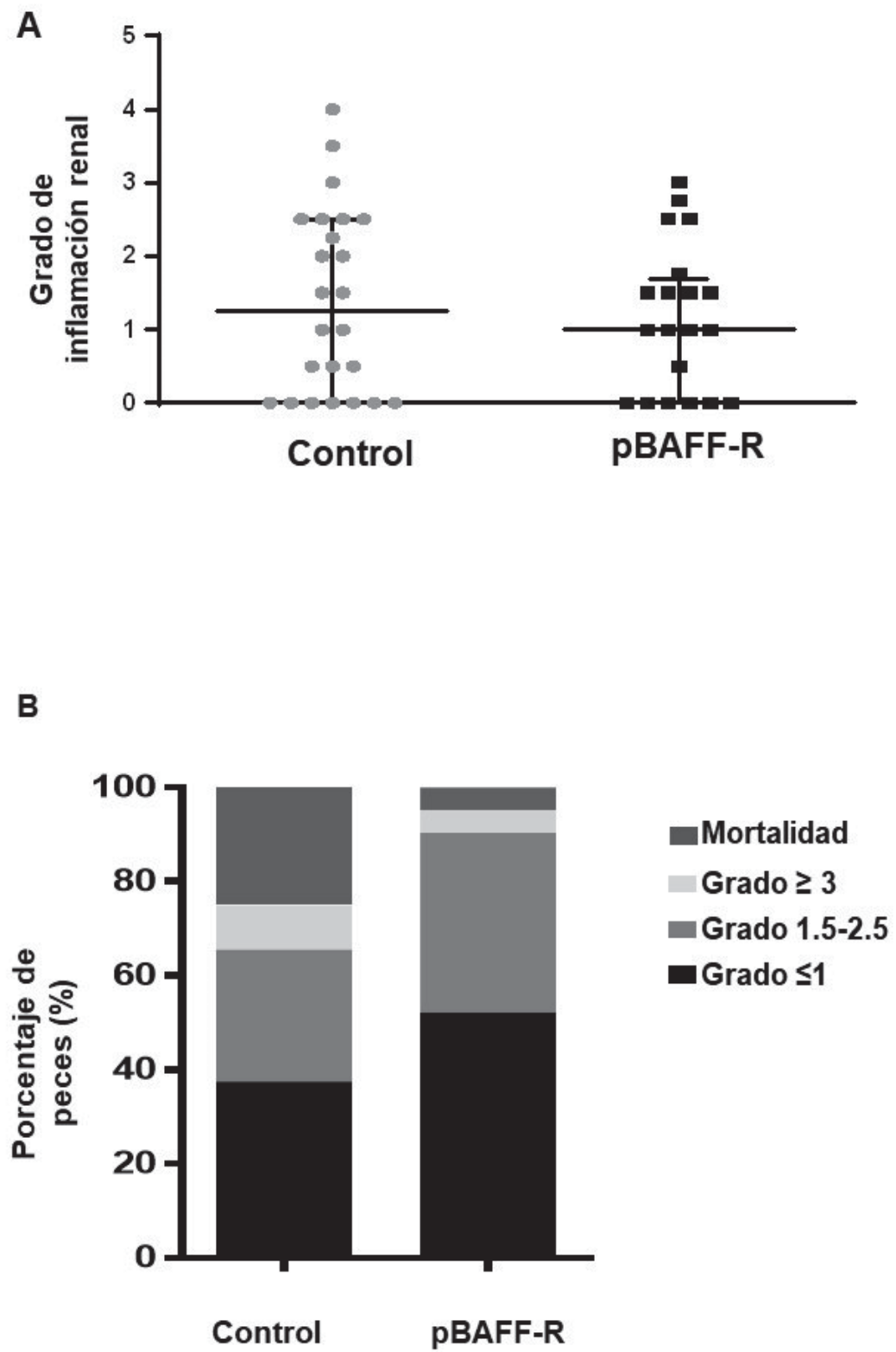


FIG. 3

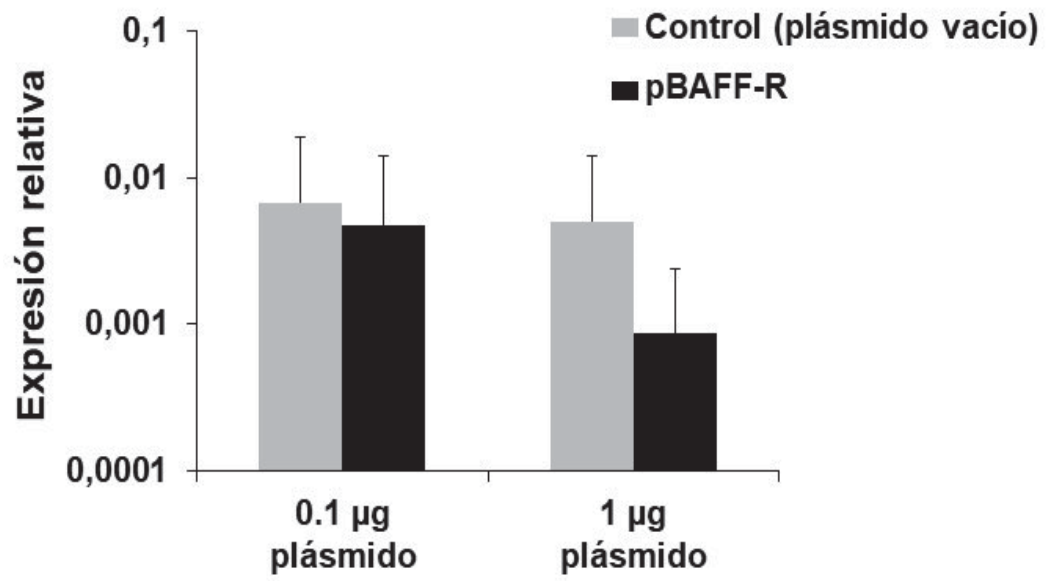


FIG. 4