

(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  
31 de Mayo de 2007 (31.05.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2007/059714 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C07K 14/575 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/CU2006/000013

(22) Fecha de presentación internacional:  
20 de Noviembre de 2006 (20.11.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
2005-0231  
22 de Noviembre de 2005 (22.11.2005) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA** [CU/CU]; Ave. 31 entre 158 Y 190, Cubanacán Playa, Ciudad De La Habana 10600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **LUGO GONZÁLEZ, Juana, María** [CU/CU]; Avenida 75ª, No. 8403, Entre 84 Y 86 Güira de Melena, La Habana 33 600 (CU). **ESTRADA GARCÍA, Mario, Pablo** [CU/CU]; Calle: 186 Entre 31 Y 33, #3112, Apto.10 Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana Playa 10600 (CU). **RODRÍGUEZ MALLON, Alina** [CU/CU]; Calle 186, No. 3115 Entre 31 Y 33, Apto 12b Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 11600 (CU). **CARPIO GONZÁLEZ, Yamila** [CU/CU]; Calle 8 No. 666 Entre 27 Y Zapata, Apto 1, Vedado Plaza De La Revolución, Ciudad De La Habana 10400 (CU). **MORALES ROJAS, Antonio** [CU/CU]; Calle 7ma C, No. 4617, Entre 46 Y 48 Playa, Ciudad De La Habana 10600 (CU). **RODRIGO GONZÁLEZ DE SOSA, Osmany** [CU/CU]; Calle 69,

No. 34008, Entre 340 Y 342, Arroyo Arena, Lisa, Ciudad De La Habana 17100 (CU). **MORALES FERNÁNDEZ, Reynold** [CU/CU]; Avenida 33 Entre 186 Y 188, Edif C-15, Apto 12, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 11600 (CU). **HERRERA MIYARES, Fidel, Francisco** [CU/CU]; Avenida 31, No. 18207, Entre 182 Y 184, Apto 36, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 11600 (CU).

(74) Mandatario: **GONZALEZ BLANCO, Sonia**; Departamento de Patentes, Ave. 31 Entre 158 Y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 10600 (CU).

(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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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.

(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, 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).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

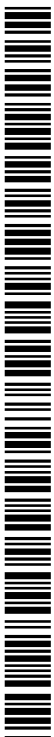
Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: NEUROPEPTIDES FOR THE CULTURE OF AQUATIC ORGANISMS

(54) Título: NEURÓPEPTIDOS PARA EL CULTIVO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

(57) Abstract: The invention relates to the use of variants of the pituitary adenylate cyclase-activating peptide in order to stimulate the growth and improve the immunological system of aquatic organisms. The variants of the peptide were supplied by means of immersion or injection or in the form of an additive in the diet.

(57) Resumen: La presente invención esta relacionada con la utilización de variantes del Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa de Pituitaria para estimular el crecimiento y mejorar el sistema inmunológico de organismos acuáticos. Las variantes del péptido fueron suministradas por inmersión, por inyección y como aditivo en la dieta alimenticia.



WO 2007/059714 A1

## NEUROPEPTIDOS PARA EL CULTIVO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS.

### Campo de la técnica

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología agropecuaria, específicamente con la utilización del Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa de Pituitaria. Cuando se aplica el péptido por inmersión, por inyección o como aditivo en la dieta alimenticia, se obtiene un aumento en el apetito de estos organismos, una mayor tasa de crecimiento y de supervivencia, una actividad inmune superior y un aumento de la liberación de prolactina.

### Estado de la técnica Anterior

El Péptido Activador de la adenilato ciclasa de Pituitaria (en inglés Pituitary Adenylate cyclase Activating peptide, abreviado PACAP) se aisló por primera vez en el año 1989 a partir de hipotálamo bovino y se demostró que su capacidad de estimular la secreción de la hormona del crecimiento (en inglés growth hormone abreviado GH) es a través de la activación de la enzima adenilatociclasa (Miyata and col. (1989) Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:567-574). El PACAP pertenece a la familia de péptidos que incluye a la secretina, el glucagón y el péptido intestinal vasoactivo (Arimura and Shioda (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors: Neuroendocrine and endocrine interaction. *Front. Neuroendocrinol.* 16:53-88). Los precursores del PACAP y de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (en inglés "growth hormone releasing hormone" abreviado GHRH), en mamíferos, están codificados por dos genes distintos (Hosoya and col. (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1129:199-206), mientras que en todas las especies submamíferas estudiadas hasta la fecha (aves, reptiles y peces), los péptidos GHRH y PACAP son codificados por un mismo gen y están contenidos en un mismo precursor (Montero and col. (2000) Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. *Journal of Molec. Endocrinol.* 25:157-168). El PACAP se expresa fundamentalmente en el sistema nervioso central y periférico, en las fibras nerviosas que inervan los ojos, en el tracto

respiratorio, en las glándulas salivales, en el tracto gastrointestinal, en los órganos del sistema reproductivo, en el páncreas, y en el tracto urinario. También se sintetiza en las glándulas adrenales, en las gónadas y en las células inmunes (Sherwood and col. (2000) The origin and function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. *Endocrine Review* 21:619-670).

5 Presenta diferentes funciones biológicas, lo cual, es consistente con su diversa distribución en los distintos tejidos y con su actividad hipofisiotrófica, neurotransmisora, neuromoduladora y vasoreguladora (Chatterjee and col. (1997) Genomic organization of the rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor gene. Alternative splicing within the 59-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 10 272:12122–12131). Está involucrado en la regulación de la división celular, de la diferenciación y de la muerte celular (Sherwood and col. (2000) The origin and function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. *Endocrine Review* 21:619-670).

15 El PACAP estimula la liberación de la hormona de crecimiento. El efecto del péptido sobre la liberación de GH se ha demostrado, *in vitro*, en varias especies de mamíferos, en aves, en anfibios (Hu and col. (2000) Characterization and messenger ribonucleic acid distribution of a cloned pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor in the frog *Xenopus laevis* brain. *Endocrinol.* 20 141:657–665) y en peces (Anderson L. L. and col. (2004) Growth Hormone Secretion: Molecular and Cellular Mechanisms and In Vivo Approaches. *Society for Experim. Biol. and Med.* 229:291-302). Los estudios realizados sobre el papel del PACAP en la secreción y liberación de la GH, *in vivo*, son escasos. Hasta la fecha se conoce que el péptido incrementa, *in vivo*, los niveles de GH en plasma de ratas

25 (Jarr and col. (1992) Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on *in vivo* and *in vitro* prolactin and growth hormone release in male rats. *Life Sci.* 51:823–830) y de bovinos (Radcliff and col. (2001) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces secretion of growth hormone in cattle. *Domestic. Animal. Endocrinol.* 21:187-196), mientras que en ovejas

30 (Sawangjaroen and Curlewis (1994) Effects of pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on prolactin, luteinizing hormone and growth hormone secretion in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 6:549–555) y en humanos (Chiodera and col. (1996) Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on adenohipofyseal hormone

secretion in normal men. *Clin. Neuroendocrinol.* 64:242–246), no produce este efecto. Estos hallazgos sugieren que el efecto del péptido sobre la secreción de la GH, en mamíferos, varía de especie a especie (Anderson and col. (2004) Growth Hormone Secretion: Molecular and Cellular Mechanisms and In Vivo Approaches. *Society for Experim. Biol. and Med.* 229:291-302). En peces hasta el presente no existen estudios, *in vivo*, que muestren el papel del PACAP en la regulación de la GH, tampoco existen antecedentes del uso de este péptido como estimulador del apetito en organismos acuáticos. En crustáceos no existen evidencias, hasta el presente, de la presencia de este péptido y no se tiene conocimiento de la cascada de señales que regulan el crecimiento en estos organismos.

El PACAP estimula además, la liberación de prolactina en mamíferos por las células de la glándula pituitaria (Ortmann and col. (1999) Interactions of ovarian steroids with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and GnRH in anterior pituitary cells. *Eur. J. Endocrinol.* 140:207-214). Promueve la liberación de la hormona estimulante de los melanocitos (en inglés “melanotropin  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormona” abreviado MSH) por las células melanotróficas de la pituitaria anterior (Vaudry and col. (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.s* 52:269-364). En peces no existen estudios hasta el presente que muestren la actividad de este péptido como liberador de prolactina *in vivo*, ni hallazgos acerca de su efecto en el desarrollo de la coloración en peces.

En mamíferos está muy bien caracterizada la función del PACAP sobre el sistema inmune y existen varias patentes que describen su uso en humanos como modulador de la respuesta inmunológica. Hasta el presente no existen antecedentes en la literatura que expliquen el papel del PACAP sobre el sistema inmune en organismos acuáticos.

El gen que codifica para el PACAP ha sido clonado de varias especies de vertebrados y de un protocordado (tunicado). En peces ha sido aislado el de algunas especies de salmon y de pez gato (Sherwood and col. (2000) The Origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily *Endocrine Reviews* 21(6):619–670), goldfish (Leung y col. (1999) Molecular cloning and tissue distribution of in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) the goldfish. *Rec. Progr. Mol. Comp.*

*Endocrinol.* 338-388), pez cebra (Fradinger and Sherwood (2000) Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 165:211-219), trucha (Krueckl and Sherwood. (2001) Developmental expression, alternative  
5 splicing and gene copy number for the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GRF) gene in rainbow trout. *Molec. and Cell. Endocrinol.* 182:99-108). En la patente US 5695954 se protege el aislamiento y la purificación de secuencias nucleotídicas de genes que codifiquen para el polipéptido GHRH-PACAP de peces, así como vectores y  
10 hospederos que expresen dichas secuencias con el objetivo de ser usados para incrementar el crecimiento en peces, vía transgénesis, introduciendo las contrucciones genéticas mencionadas en huevos de peces fertilizados. Se protege además, un método para detectar peces transgénicos que contengan estas secuencias. En esta patente se reportan específicamente la secuencias de los  
15 genes que codifican para el polipéptido GHRH-PACAP de las especies *Oncorhynchus Nerka*, *Claria macrocephalus* y *Acispenser transmontanus*.

En la presente invención se emplean variantes de la secuencia aminoacídica exacta del PACAP, obtenida en nuestro laboratorio para las especies *Claria gariepinus* y *Oreochromis niloticus*, con modificaciones en el extremo amino terminal. Estas  
20 variantes son utilizadas como estimuladores del crecimiento por vía no transgénica, mediante su administración por inmersión expresadas en el sobrenadante de cultivo de *E. coli* y de *P. pastoris*, sin previa purificación de las mismas. Inesperadamente además encontramos que estas variantes son capaces en estas condiciones de promover un aumento significativo de la actividad inmunológica en estos organismos  
25 y de la concentración de prolactina en suero. Estas propiedades del péptido no habían sido descritas hasta el presente para organismos acuáticos.

Varios autores han reportado un efecto estimulador del crecimiento en peces por la administración vía inmersión de hormona de crecimiento recombinante. Sin embargo en la práctica el uso directo de la hormona de crecimiento está sujeto a  
30 muchos requisitos regulatorios, lo mismo sucede con el uso de peces transgénicos que sobreexpresan la hormona de crecimiento o un factor liberador de la misma. En la presente invención se describe una metodología no mediada por transgénesis, para aumentar el crecimiento y mejorar el sistema inmune de organismos acuáticos, incluyendo invertebrados.

Los organismos acuáticos son actualmente una fuente importante de proteínas, pero su captura de forma natural se encuentra al límite máximo de su explotación, por lo que para aumentar su producción se hace necesario su cultivo (Pullin y col.; Conference Proceeding 7, 432 p. International Center for living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines. 1982, ISSN 0115-4389). Aumentar la eficiencia del cultivo de estos organismos, mediante la estimulación del crecimiento, el aumento de la sobrevivencia y la mejora de la calidad de las larvas se mantiene como un problema importante a resolver en la acuicultura.

## 10 **Explicación de la invención**

La presente invención resuelve el problema antes mencionado proporcionando variantes del Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa de Pituitaria con las secuencias de aminoácidos identificadas como SEQ ID No 12, 13 y 14, que incrementan la tasa de crecimiento de organismos acuáticos, incluyendo organismos invertebrados, en un periodo de tiempo corto, lo cual resulta de vital importancia para la acuicultura, estos péptidos aumentan además la sobrevivencia cuando se aplican por inmersión o como aditivo en la dieta de larvas de peces y crustáceos de interés comercial, estimulan la actividad inmune en estos organismos, así como el apetito, el desarrollo de la coloración de la piel y la liberación de prolactina.

En una realización preferida de la presente invención, las variantes del neuropéptido PACAP se le aplican a los peces o crustáceos por inyecciones periódicas con intervalos de 3 días en una concentración de 0.1  $\mu\text{g/g}$  de peso del animal, por baños de inmersión con intervalos de 1 a 4 días en agua dulce o agua de mar teniendo una concentración de péptido de entre 100 a 200  $\mu\text{g/por litro}$  de agua y como alimento formulado en una concentración de 5mg/Kg de pienso. Obteniéndose en todos los casos un aumento significativo del crecimiento de estos organismos y una actividad inmune superior.

El uso de las variantes del neuropéptido PACAP ofrece ventajas por ser de tallas pequeñas en el orden aproximado de los 5 KDa, por lo que se absorbe mejor a través de la piel y mucosas de los organismos al ser aplicado por inmersión, que es una vía de administración con ventajas de costo y de manipulación para la acuicultura y con bajos índices de contaminación, además su mecanismo de

transducción de señales se inicia por la activación de una enzima (adenilatociclasa) y no a través de la activación de una hormona y su actividad liberadora de hormona de crecimiento en mamíferos, incluyendo humanos, es débil, por lo que su utilización presenta mejor percepción pública y menos requerimientos regulatorios.

5 Otras de las ventajas es la de estimular la actividad inmune innata y adaptativa en peces y aumentar la resistencia a infecciones por agentes patógenos.

En una materialización de la invención, las variantes del PACAP se les suministran a especies de organismos acuáticos como a la tilapia *Oreochromis sp*, al pez gato *Claria sp*, al salmón *Salmon sp*. y a camarones del género *Penaeus sp*.

10 En otra realización preferida de la presente invención, las variantes del PACAP se les suministran a los peces o crustáceos para prevenir o tratar infecciones por agentes patógenos.

Como resultado de este trabajo, una materialización de la presente invención describe la preparación de una composición para tratar peces o crustáceos en cultivo para estimular su crecimiento y para incrementar su resistencia contra enfermedades, así como para tratamiento preventivo o terapéutico de una infección por agentes patógenos, todo esto con el objetivo de mejorar la productividad.

#### Breve descripción de las figuras:

20 **Figura 1.** Estrategia de clonaje del péptido de interés en los vectores de expresión en bacteria (Fig. 1A) y en levadura (Fig. 1B).

**Figura 2.** Experimento de estimulación del crecimiento en juveniles de *Claria gariepinus* mediante la inyección intraperitoneal del PACAP recombinante purificado por cromatografía de afinidad, a la dosis de 0.1  $\mu\text{g}$  por gramo de peso del animal. La gráfica representa el promedio del peso corporal del grupo tratado con el PACAP comparado con el grupo tratado con placebo durante el transcurso del experimento.

25 **Figura 3.** Experimento de estimulación del crecimiento en juveniles de *Claria gariepinus* mediante la inyección intraperitoneal del PACAP recombinante purificado por cromatografía de afinidad, a la dosis de 0.1  $\mu\text{g}$  por gramo de peso del animal. La gráfica representa el promedio de los valores de índice hepatosomático y de peso seco del músculo del grupo tratado con el PACAP comparado con el grupo tratado con placebo.

**Figura 4.** Experimento de estimulación del crecimiento en larvas de tilapia mediante la aplicación vía inmersión del PACAP recombinante contenido en el sobrenadante de ruptura de *E. coli*, a la dosis de 100 µg por cada 1 litro de agua. Las gráficas 4A y 4B muestran el promedio de los valores de peso en gramos y de longitud en centímetros de los peces del grupo tratado con el PACAP respecto al grupo tratado con placebo, durante el transcurso del experimento.

**Figura 5.** Experimento de estimulación del crecimiento en larvas de tilapia mediante la aplicación vía inmersión del PACAP recombinante contenido en el sobrenadante de ruptura de *E. coli*, a la dosis de 100 µg por cada 1 litro de agua. La gráfica representa el peso en gramos de los peces tratados con el PACAP y de los peces tratados con placebo a los 22 días de iniciado los tratamientos.

**Figura 6.** Experimento de estimulación del crecimiento en larvas de tilapia mediante la aplicación vía inmersión del PACAP recombinante contenido en el sobrenadante de ruptura de *E. coli*, a la dosis de 100 µg por cada 1 litro de agua. La fotografía muestra la diferencia en longitud a los 30 días, después del último baño de inmersión, de los peces tratados con el PACAP (A y C) respecto al grupo tratado con placebo (B).

**Figura 7.** Experimento de estimulación del crecimiento en larvas de tilapia mediante la aplicación vía inmersión del PACAP recombinante contenido en el sobrenadante de ruptura de *E. coli*, a la dosis de 100 µg por cada 1 litro de agua. La fotografía muestra mayor precocidad en el desarrollo de la coloración de los peces tratados con el PACAP (A y B) respecto al grupo placebo (C).

**Figura 8.** Experimento para evaluar el efecto del PACAP recombinante purificado por cromatografía de afinidad, sobre el apetito, en tilapias juveniles de la especie *Oreochromis niloticus*, cuando es aplicado a la dosis de 0.5 µg por gramo de peso del animal. La gráfica muestra la cantidad de alimento promedio ingerido por los peces de ambos grupos a las 6 horas y a las 22 horas de iniciado los tratamientos.

#### **Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos**

**Ejemplo 1: Construcción de vectores para la expresión del PACAP de forma intracelular en *E.coli* y de forma extracelular en el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris*.**

El gen que codifica para PACAP de *Claria gariepinus* fue aislado mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés, Polymerase Chain Reaction, abreviado PCR) a partir de la secuencia previamente obtenida por RT-PCR (en inglés, Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) para el gen que codifica para el neuropéptido GHRH-PACAP de esta especie. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos SEQ ID No 1 y SEQ ID No 2 para obtener la secuencia completa del gen que codifica para el polipéptido GHRH-PACAP incluyendo la secuencia señal, y los oligonucleótidos específicos SEQ ID No 3 y SEQ ID No 4 para amplificar el gen exacto del PACAP con los sitios de restricción enzimático necesarios para su clonaje en un vector de expresión en *E. coli*. EL PACAP de tilapia se aisló de igual forma utilizando los oligonucleótidos SEQ ID No 3 y SEQ ID No 4. La presente invención constituye el primer reporte del aislamiento de este gen en tilapia.

El gen que codifica para el PACAP fue clonado en el vector de expresión en *E. coli* pAR 3040 utilizando los sitios de restricción NdeI / BamHI (Figura 1A). Se seleccionó uno de los clones recombinantes para transformar la cepa de *E. coli* BL21D3 e inducir la expresión del gen bajo la regulación del promotor T7, utilizando como inductor IPTG 0.5 mM. La expresión del gen se llevó a cabo a 28°C durante 5 horas. La expresión del PACAP recombinante y su integridad se chequearon mediante Espectrometría de Masas.

Para la construcción de los vectores de expresión del PACAP en *P. pastoris*, se utilizaron los vectores de expresión pPS9 y pPS10. Se utilizaron los oligonucleótidos SEQ ID No 7 y SEQ ID No 6 para el clonaje en pPS9 y los oligonucleótidos SEQ ID No 5 y SEQ ID No 6 para el clonaje en pPS10. Para el clonaje en el vector pPS7 se utilizaron los sitios de restricción NcoI / SpeI, esta estrategia de clonaje adiciona a la proteína de interés en el extremo amino terminal una metionina y una glicina. Para el clonaje en el vector pPS10 se utilizaron los sitios NaeI y SpeI, esta estrategia de clonaje no adiciona aminoácidos a la proteína de interés (Figura 1 B).

Los plásmidos fueron linealizados antes de transformar la cepa de MP36 de *P. pastoris*. La transformación se llevó a cabo por electroporación. La cepa MP36 es un mutante auxotrófico his3 la cual adquiere un fenotipo His<sup>+</sup> después de la transformación.

Los clones transformantes se identificaron mediante Dot Blot. Utilizando la técnica de Southern Blot se determinó en cuales la integración había ocurrido por reemplazamiento del gen AOX1 de *P. pastoris* por el casete de expresión del plásmido recombinante, lo cual se corresponde con un fenotipo Mut<sup>s</sup> (baja utilización  
5 de metanol) e His<sup>+</sup>. La *P. pastoris* secreta bajos niveles de proteínas propias y su medio de cultivo no necesita suplementos proteícos, por lo que se puede esperar que una proteína heteróloga que se secreta al medio extracelular, constituya la mayoría del total de proteínas en el medio (más de un 80%) (Tschopp and col. (1987) Bio/Technology, 5:1305-1308).

10 La expresión del PACAP en *P. pastoris* se llevó acabo en fermentadores de 5 litros mediante la adición de metanol al medio de cultivo.

**Ejemplo 2. Experimento de estimulación del crecimiento en juveniles de *Claria gariepinus*, determinación del índice hepatosomático y del peso seco del  
15 músculo de los peces.**

Se utilizaron 18 ejemplares de la especie *Claria gariepinus* sin distinción de sexo, de aproximadamente la misma edad y con un peso de 30 a 40 gramos.

Se conformaron dos grupos experimentales, de nueve individuos cada uno. Los grupos fueron aclimatados en tanques separados, con recirculación constante de  
20 agua, a una temperatura de 28°C y con un fotoperíodo constante de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los animales se alimentaron dos veces al día, con raciones equivalentes al 5% del peso corporal total en cada tanque. Cada ejemplar fue identificado antes de comenzar el experimento. Uno de los grupos experimentales fue tratado con el péptido PACAP previamente semipurificado (70 %  
25 de pureza) SEQ ID No. 13, mientras que el otro grupo, utilizado como placebo, fue tratado con proteínas de *E.coli* contenidas en PBS 1X (proteínas de *E.coli* obtenidas mediante el mismo procedimiento de purificación del péptido de interés, equivalentes a la cantidad de contaminantes presentes en la muestra purificada del PACAP). Los peces tratados con el PACAP fueron inyectados intraperitonealmente  
30 con una dosis de 0.1µg del péptido por gramo de peso corporal del animal, 2 veces por semana. El grupo placebo fue inyectado de igual forma con la muestra placebo. A los 22 días de iniciado el experimento, los animales inyectados con el PACAP en la cavidad peritoneal, mostraron un incremento en gramos del peso corporal

significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) respecto a los animales inyectados con placebo (Figura 2). Se midieron los valores de índice hepatosomático y peso seco del músculo para demostrar que el incremento en peso corporal observado no se debió ni al aumento del tamaño de los órganos, ni al aumento del contenido de agua en músculo. No se observaron diferencias significativas entre los valores de índice hepatosomático y entre los valores de peso seco del músculo de los grupos experimentales (Figura 3).

Resultados similares se obtuvieron cuando se aplicó el PACAP recombinante de secuencia SEQ ID No. 12.

**Ejemplo 3. Experimento de estimulación del crecimiento, de la resistencia a agentes patógenos y de la liberación de prolactina, en larvas de tilapia mediante la aplicación vía inmersión del PACAP recombinante contenido en el sobrenadante de ruptura de *E. coli*.**

Realizamos un experimento para el evaluar el papel del PACAP de *Claria gariepinus* recombinante contenido en el sobrenadante de ruptura de *E. coli* sobre el crecimiento en larvas de tilapia. Se conformaron dos grupos experimentales de 60 larvas cada grupo, un grupo tratado con el PACAP de secuencia SEQ ID No. 13 y un grupo placebo. Las larvas pertenecientes a cada grupo fueron aclimatadas en canaletas independientes de 80L, a una temperatura de 28°C y con un fotoperíodo constante de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y se alimentaron con una cantidad de pienso de acuerdo a la fórmula: Cantidad de alimento = # de animales X peso promedio (g) X 40% /100. Los tratamientos se realizaron por inmersión en un volumen de 2L, tres veces por semana durante 20 días, se aplicaron aproximadamente 200 µg del PACAP por cada baño de inmersión, de una hora de duración. Se obtuvieron como resultados que a los 10 días de iniciado el experimento el grupo tratado con el PACAP mostró un incremento en peso corporal y en la longitud estadísticamente superior respecto al grupo placebo ( $p < 0.01$ ), a los 15 días de iniciado el experimento la diferencia entre los tratamientos eran altamente significativa ( $p < 0.001$ ) (Tabla 1 y Figura 4A y 4B). A los 20 días de aplicados los baños de inmersión las diferencias entre el grupo tratado con el PACAP y el grupo placebo continuaban siendo altamente significativas ( $p < 0.001$ ) (Figura 5).

**Tabla 1. Peso y longitud de las larvas de tilapias a los 10 días y a los 15 días de iniciado los tratamientos.**

Tratamientos	Peso (g)		Longitud (cm)	
	10 días	15 días	10 días	15 días
<b>PACAP</b>	0.3536±0.0879	0.6458±0.2399	2.41±0.2726	2.84±0.3627
<b>Placebo</b>	0.2221±0.0565	0.2785±0.1438	1.98±0.1687	2.01±0.5174

5 El peso y la longitud están dados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar  
 Se observó que el efecto sobre el crecimiento se mantenía en el tiempo, pues 30 días después del último baño de inmersión (realizado a los 20 días de iniciado el experimento) las diferencias en el peso corporal y en la longitud entre los animales de los grupos experimentales eran muy significativas ( $p < 0.01$ ) (Figura 6). Se  
 10 observó además que los peces tratados con el péptido desarrollaban la pigmentación de la piel con mayor precocidad (Figura 7).

En este mismo experimento se estudió la presencia del protozoo cutáneo del tipo *Trichodina sp.*, para ellos se tomaron de forma aleatoria 10 animales de cada grupo de experimentación, a los 30 días de iniciado los tratamientos y se determinó la  
 15 intensidad de la invasión por este agente patógeno. Los valores de intensidad de la invasión se determinaron según la fórmula:

$$(I: \# \text{ total de parásitos por pez}) I = \frac{\sum N}{n - F_0} \text{ y } E = \frac{n - F_0}{n} \times 100$$

donde:

20 I: (intensidad media de la invasión) E: (# de peces del total parasitados)  
 $\sum N$ : (total de parásitos hallados)  $F_0$ : (número de peces no parasitados)  
 n: (número de peces muestreados)

Se obtuvo como resultado que los animales tratados con el PACAP presentaron una intensidad de la invasión por el protozoo *Trichodinas sp.* significativamente menor (un valor promedio de  $I = 2.20$ ) respecto al grupo tratado con placebo que presentó  
 25 un valor promedio de  $I = 5.56$  ( $p < 0.01$ ).

A los 45 días de iniciados los tratamientos se trataron los peces mediante baños de inmersión en las condicines anteriormente descritas y se les extrajo sangre a las 24 horas de realizados los tratamientos. Se le midió la concentración de prolactina en suero a cada pez (muestra de 10 animales por cada grupo tratado) mediante

Western blot y mediante ELISA (en inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Se utilizó para estos experimentos un anticuerpo policlonal anti prolactina de tilapia. Se obtuvo como resultado que los peces del grupo tratado con el péptido presentaron concentraciones de prolactina en suero estadísticamente superior  
 5 respecto al grupo placebo  $p < 0.01$  (Tabla 2). Este resultado es muy atractivo para aquellos organismos acuáticos de interés comercial, como es el caso de los salmones, que realizan su ciclo de vida en agua dulce y agua de mar y en los que la prolactina desempeña una función importante en la osmoregulación.

10 **Tabla 2: Concentración de prolactina (ng/mL) en el suero de los peces a los 45 días de iniciado el experimento**

Concentración de prolactina	GRUPO TRATADO PACAP	GRUPO PLACEBO
ng/mL	36.860±2.695*	15.745±1.362

15 La concentración está dada como el promedio  $\pm$  la desviación estándar

**Ejemplo 4. Experimento para evaluar el efecto del PACAP recombinante sobre el apetito en tilapias juveniles de la especie *Oreochromis niloticus*.**

20 Los efectos biológicos del PACAP sobre el apetito, en peces, no han sido estudiados hasta el presente. De manera general en los organismos vertebrados submamíferos la actividad de estos péptidos sobre el apetito ha sido poco caracterizada. (Jensen, 2001, Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. And Physiol. Part A* 128:471-479).

25 Para evaluar el efecto del PACAP sobre el apetito en peces, se utilizaron tilapias juveniles de la especie *Oreochromis niloticus*, seleccionadas al azar sin distinción de sexo y edad y de aproximadamente el mismo peso corporal. Se conformaron tres grupos experimentales, con tres réplicas cada uno (3 tilapias por réplica). Las tilapias se colocaron en canaletas de 80 litros y se mantuvieron a 28°C, con un  
 30 fotoperíodo de luz oscuridad (14 horas luz-10 horas oscuridad) y recirculación constante del agua.

El primer grupo fue tratado con el PACAP (previamente obtenido en nuestro laboratorio, con un 87% de pureza) de secuencia SEQ ID No.13, mediante inyección

intraperitoneal (0.5 µg/gramo de peso del animal). El segundo grupo fue tratado con el GHRP-6 (Lipotec, S.A Barcelona. España), utilizando el mismo método de administración a la dosis de 0.1 µg/gramo de peso del animal. El grupo placebo fue tratado con proteínas de *E.coli* contenidas en PBS 1X (proteínas de *E.coli* obtenidas mediante el mismo procedimiento de purificación del PACAP, equivalentes a la cantidad de contaminantes presentes en la muestra purificada del PACAP).

Luego de aplicar por inyección los tratamientos, se añadió la misma cantidad de comida a los tres grupos experimentales, recolectándose a las 6 horas la comida no ingerida y añadiendo nuevamente alimento. Volviéndose a monitorear el apetito a las 22 horas de comenzado el experimento.

El alimento colectado del fondo de cada canaleta en cada monitoreo, fue secado al horno a 100°C durante 20 horas y fue pesado en una balanza analítica. Se calculó la comida ingerida determinando la diferencia entre la comida añadida a los estanques (10 gramos, con un 20% de humedad) y la comida no ingerida por los peces.

Las tilapias inyectadas con el PACAP por vía intraperitoneal, a la dosis de 0.5 µg/gramo de peso del animal y las inyectadas con el péptido GHRP-6, por esta misma vía de administración, pero a la dosis 0.1µg/gramo de peso del animal, mostraron un aumento significativo ( $p<0.05$ ) del apetito respecto a las tilapias del grupo placebo (Figura 8).

#### **Ejemplo 5. Experimento de evaluación del efecto del PACAP recombinante sobre el sistema inmune en peces.**

Se utilizaron juveniles de *Claria gariepinus*. Se conformaron dos grupos de 10 animales cada grupo. Los grupos fueron aclimatados en tanques separados, con recirculación constante de agua, a una temperatura de 28°C y con un fotoperíodo constante de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los animales se alimentaron dos veces al día, con raciones equivalentes al 5% del peso corporal total en cada tanque. El péptido de secuencia SEQ ID No.13, se aplicó por inyección intraperitoneal 2 veces por semana a la dosis de 0.1 µg/gramo de peso del animal. A los animales se les extrajo sangre a los 20 días de iniciado el experimento para medir los niveles de lisozima y de lectinas en suero sanguíneo.

La actividad de lisozima en el suero se determinó mediante un método turbidimétrico, basado en la lisis de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado. Se utilizó lisozima de clara de huevo de gallina como patrón de referencia. Se prepararon los patrones de lisozima a concentraciones de 0, 1, 2, 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  en tampón fosfato (0.05 M  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , pH 6.2). El microorganismo se preparó a una concentración de 3 mg/mL en tampón fosfato. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de las soluciones patrón en placas de 96 pocillos de fondo llano y se realizó por duplicado, y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de suero por sextuplicado. A cada uno de estos pocillos se le añadió 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión del microorganismo para un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  en cada pocillo. Se leyó densidad óptica (DO) inmediatamente después de adicionar el microorganismo, a una  $\lambda = 450 \text{ nm}$  en un lector de placas de 96 pocillos a los 0, 2, 3, 5, 10, 15, 25, 35 y 45 min. Las reacciones trascurrieron a  $22^\circ\text{C}$  aproximadamente. Se consideró como una Unidad (U) de lisozima: la variación de 0,001 unidades de DO en un minuto. Las unidades de lisozima de los patrones y de las muestras fueron calculadas de la siguiente forma: dividiendo la pendiente de la curva  $\Delta\text{DO}_{450 \text{ nm}}$  vs t (min) (en su intervalo lineal) entre 0,001. Se hizo la curva patrón de  $U_{\text{lisozima}}$  vs  $\mu\text{g/mL}$  de lisozima en donde se interpolaron las unidades de actividad enzimática de las muestras para hallar su concentración.

Como resultado del experimento se obtuvo que los peces tratados con el PACAP mostraron un incremento en los niveles de lisozima en suero estadísticamente muy significativo ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo placebo (Tabla 3).

**Tabla 3: Concentración de lisozima ( $\mu\text{g/mL}$ ) en el suero de los peces a los 20 días de iniciado el experimento**

25

Concentración de Lisozima	GRUPO TRATADO PACAP	GRUPO PLACEBO
$\mu\text{g/mL}$	$21.765 \pm 5.438^*$	$7.828 \pm 8.393$

La concentración está dada como el promedio  $\pm$  la desviación estándar

\* test Student. Denota diferencias significativas ( $p < 0.01$ )

30

Para determinar la presencia de lectinas en suero sanguíneo, se realizó un ensayo de hemoaglutinación. Se realizaron diluciones seriadas en PBS 1X pH 7.2 partiendo de 100  $\mu\text{L}$  del suero en una placa de 96 pocillos con fondo en U. Se añadió igual cantidad de una solución de eritrocitos de conejo al 2%. Las placas fueron

incubadas 1 hora a temperatura ambiente y se leyó el título de hemoaglutinación visualmente. La actividad de lectinas fue expresada como el recíproco de la dilución más alta que mostró hemoaglutinación completa.

Los peces tratados con el péptido mostraron un incremento en los niveles de lectinas, estadísticamente significativo, respecto al grupo placebo ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4: Título de hemoaglutinación (el recíproco de la dilución más alta que mostró hemoaglutinación completa) en el suero de los peces a los 45 días de iniciado el experimento.**

	GRUPO TRATADO PACAP	GRUPO PLACEBO
TITULO	4*	1

\* test de student. Denota diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Ejemplo 6. Experimento de estimulación del crecimiento en larvas de tilapia mediante la aplicación del PACAP recombinante contenido en el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris*.**

Realizamos un experimento para el evaluar el efecto del PACAP de *Claria gariepinus* recombinante contenido en el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* de secuencia SEQ ID No 14, sobre el crecimiento en larvas de tilapia. Se conformaron tres grupos experimentales de 50 larvas cada grupo, un grupo tratado con el PACAP, un grupo tratado con la hormona de crecimiento de tilapia y un grupo placebo. Las larvas pertenecientes a cada grupo fueron aclimatadas en canaletas independientes de 80L, a una temperatura de 28°C y con un fotoperíodo constante de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y se alimentaron con una cantidad pienso de acuerdo a la fórmula: Cantidad de alimento = # de animales X peso promedio (g) X 40% /100. Los tratamientos se realizaron por inmersión en una hora y media en un volumen de 20 litros de agua, tres veces por semana durante 30 días, se aplicaron aproximadamente 100 µg del péptido / litro de agua.

Se obtuvo como resultado que a las 5 semanas de iniciado el experimento (35 días) el grupo tratado con el PACAP mostró un aumento significativo del peso corporal promedio respecto al grupo placebo ( $p < 0.01$ ). El grupo tratado con la hormona de crecimiento de tilapia expresada en el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* mostró

también un incremento del peso corporal promedio estadísticamente significativo respecto al grupo placebo ( $p < 0.05$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5: Peso de las larvas de tilapia en gramos.**

TIEMPO (DÍAS)	GRUPO TRATADO PACAP	GRUPO TRATADO GH	GRUPO PLACEBO
0	0.1013±0.0625	0.1140±0.0457	0.1040±0.0535
35	0.9870±0.0525	0.7875±0.0422	0.4566±0.0363

5 Los datos se presentan como el promedio del peso  $\pm$  la desviación estándar.

**Ejemplo 7. Experimento de estimulación del crecimiento y de la calidad de las larvas de camarones de la especie *Litopenaeus schmitti* tratados con el PACAP recombinante contenido en el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris*.**

10 Se utilizaron larvas de camarones de la especie *L. schmitti*. Se utilizaron dos grupos experimentales, un grupo tratado con el péptido recombinante contenido en el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* de secuencia SEQ ID No. 14 y un grupo tratado con placebo (*P. pastoris* sin transformar).

15 Las larvas se cultivaron en tanques de fibra de vidrio con capacidad de 100 L. La alimentación se basó en diatomeas (*Chaetoceros gracilis*), el alga flagelada (*Tetraselmis suecica*), y nauplius de Artemia frescos (Aquatic Eco-Systems Inc.)

Los factores abióticos de crecimiento fueron los siguientes:

Iluminación (24:00 L/O)

Aireación constante.

20 Salinidad de 34 ppm.

Oxígeno disuelto  $5.2 \pm 0.5$  en el ciclo larval.

Recambio después de PZ<sub>III</sub> 80%

Se les aplicaron a los dos grupos experimentales cuatro baños de inmersión, uno cada tres días de una hora de duración.

25 Se obtuvo como resultado que el grupo tratado con el péptido mostró un incremento en el peso corporal promedio estadísticamente significativo respecto al grupo placebo ( $p < 0.001$ ) (Tabla 6).

**Tabla 6: Peso de las larvas de camarón en miligramos**

TIEMPO (DÍAS)	GRUPO TRATADO PACAP	GRUPO PLACEBO
0	0.3045±0.0425	0.3273±0.0420
30	12.5034±0.0455	6.5325±0.0438

Los datos se presentan como el promedio del peso ± la desviación estándar.

Se observó mayor homogeneidad en la longitud de los camarones lo cual es de vital importancia en la camaronicultura y mejor calidad de las larvas (mayor número de pares de ramificaciones branquiales y de modificaciones rostrales). La diferencia en sobrevivencia en el estadio de PL9 fue de un 40% mayor en el caso del grupo tratado con PACAP.

**Ejemplo 8. Estimulación del crecimiento en juveniles de *Claria gariepinus* mediante la formulación del PACAP recombinante en la dieta de los peces.**

El PACAP recombinante contenido en el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* de secuencia SEQ ID No. 14, fue concentrado y formulado en la dieta alimenticia de los peces a una concentración de aproximadamente 5 mg/Kg de pienso. El control negativo fue la dieta formulada con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* sin transformar. Se utilizaron 2 grupos experimentales de 100 larvas, con un peso promedio de 0.1 g. Un grupo se alimentó con pienso formulado con el sobrenadante de *P. pastoris* conteniendo al PACAP y el otro grupo con pienso formulado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* sin transformar. El experimento transcurrió durante 30 días.

El PACAP recombinante incluido en la dieta produjo un incremento en el peso corporal de los peces de aproximadamente un 30% respecto al grupo placebo, lo cual denota diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.01$ ).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para aumentar la productividad de un cultivo de peces o crustáceos que comprende la alimentación o la administración del neuropéptido PACAP, según las secuencias SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 y SEQ ID No 14, a los peces o crustáceos en cultivo en una cantidad efectiva para estimular su crecimiento o incrementar su resistencia contra enfermedades o ambas.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde dicho neuropéptido PACAP se emplea para aumentar la liberación de prolactina y mejorar la osmorregulación en peces.
3. Método según la reivindicación 1, donde dicho neuropéptido PACAP se emplea para regular el apetito en organismos acuáticos.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, donde dicho neuropéptido PACAP se emplea para favorecer el desarrollo de la coloración en peces ornamentales y en crustáceos.
5. Método según la reivindicación 1, donde dicho neuropéptido PACAP se obtiene por síntesis química.
- 20 6. Método según la reivindicación 1, donde dicho neuropéptido PACAP se obtiene por vía recombinante.
7. Método según la reivindicación 6, donde dicho neuropéptido PACAP se emplea sin purificar, contenido en el sobrenadante de ruptura de *E.coli*.
- 25 8. Método según la reivindicación 6, donde dicho neuropéptido PACAP se emplea sin purificar, contenido en el sobrenadante de cultivo de *P.pastoris*.
9. Método según la reivindicación 6, donde dicho neuropéptido PACAP se emplea purificado a partir de sistemas de producción recombinantes.
- 30 10. Método según la reivindicación 1, en el que dicho neuropéptido PACAP se le aplica a los peces o crustáceos por inyecciones periódicas con intervalos de 3 días en una concentración de 0.1 µg/g de peso del animal.

- 5 11. Método según la reivindicación 1, en el que dicho neuropéptido PACAP se le suministra a los peces o crustáceos por baños de inmersión con intervalos de 1 a 4 días en agua dulce o agua de mar teniendo una concentración de péptido de entre 100 a 200  $\mu\text{g}$ /por litro de agua.
12. Método según la reivindicación 1, en el que dicho neuropeptido PACAP se le suministra a los peces o crustáceos en el alimento formulado en una concentración de 5mg/Kg de pienso.
- 10 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1-12, en el que dicho neuropeptido PACAP se le suministra a la tilapia *Oreochromis sp.*
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1-12, en el que dicho neuropeptido PACAP se le suministra al pez gato *Claria sp.*
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1-12, en el que dicho neuropeptido PACAP se le suministra al salmon *Salmon sp.*
- 15 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1-12, en el que dicho neuropeptido PACAP se le suministra a los camarones *Penaeus sp.*
17. Método según la reivindicación 1, en el que dicho neuropéptido PACAP se le suministra a los peces o crustáceos para prevenir o tratar infección por agentes patógenos.
- 20 18. Uso del neuropéptido PACAP, según las secuencias SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 y SEQ ID No 14, en la preparación de una composición para tratar peces o crustáceos en cultivo para estimular su crecimiento.
- 25 19.. Uso del neuropéptido PACAP, según las secuencias SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 y SEQ ID No 14, en la preparación de una composición para tratar peces o crustáceos en cultivo para incrementar su resistencia contra enfermedades.
- 30 20. Uso del neuropéptido PACAP, según las secuencias SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 y SEQ ID No 14, en la preparación de una composición para tratamiento preventivo o terapéutico de una infección por agentes patógenos en peces o crustáceos en cultivo.

21. Uso del neuropéptido PACAP, según las secuencias SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 y SEQ ID No 14, para estimular el crecimiento de peces y crustáceos en cultivo para mejorar la productividad.

5

22. Uso del neuropéptido PACAP, según las secuencias SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 y SEQ ID No 14, para incrementar la resistencia a enfermedades de peces y crustáceos en cultivo para mejorar la productividad.

10

23. Uso del neuropéptido PACAP, según las secuencias SEQ ID No 12, SEQ ID No 13 y SEQ ID No 14, para la prevención o tratamiento de infecciones por agentes patógenos de peces y crustáceos en cultivo para mejorar la productividad.

15

20

25

Figura 1 A

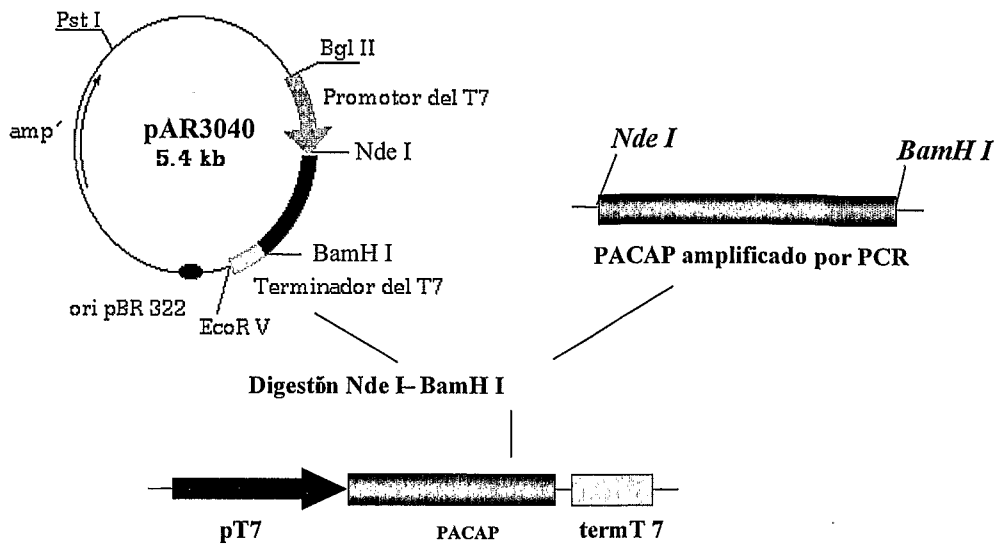


Figura 1B

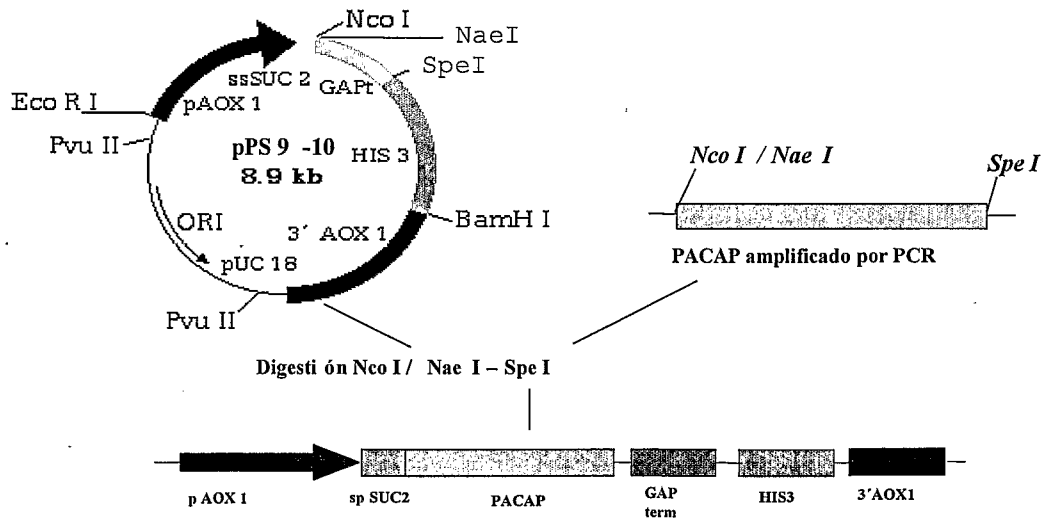


Figura 2

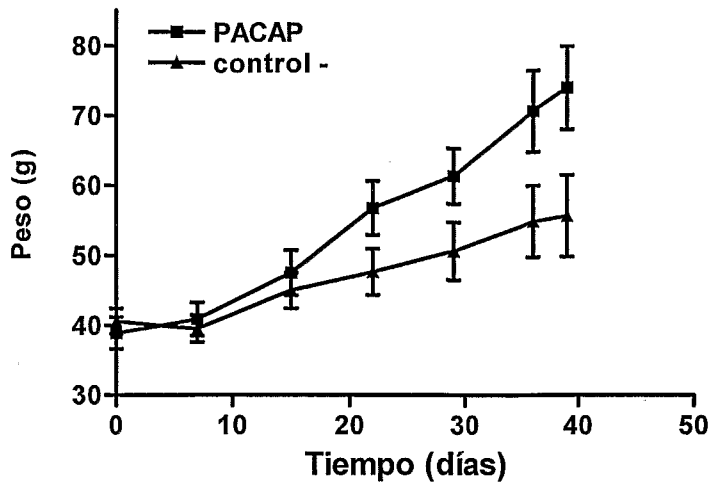


Figura 3

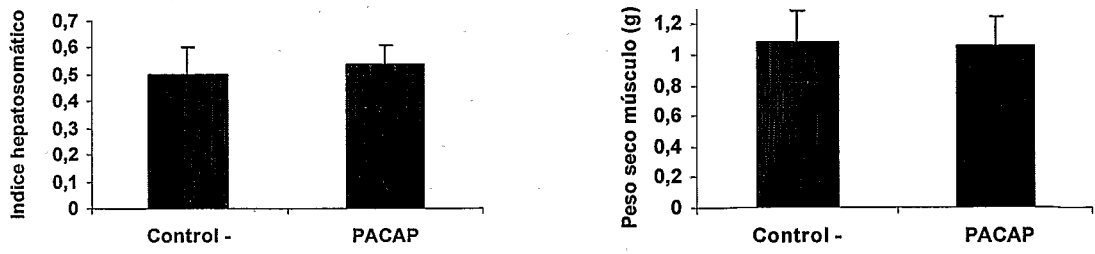


Figura 4A

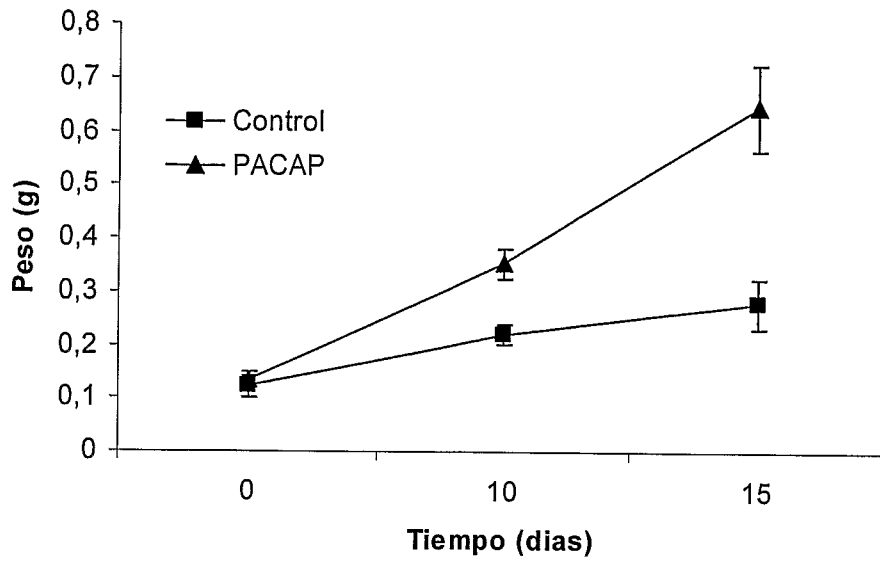


Figura 4B

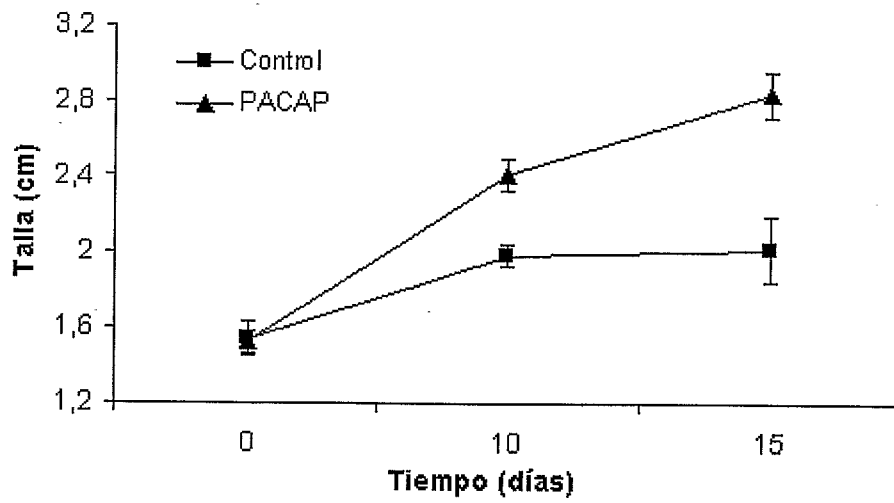


Figura 5

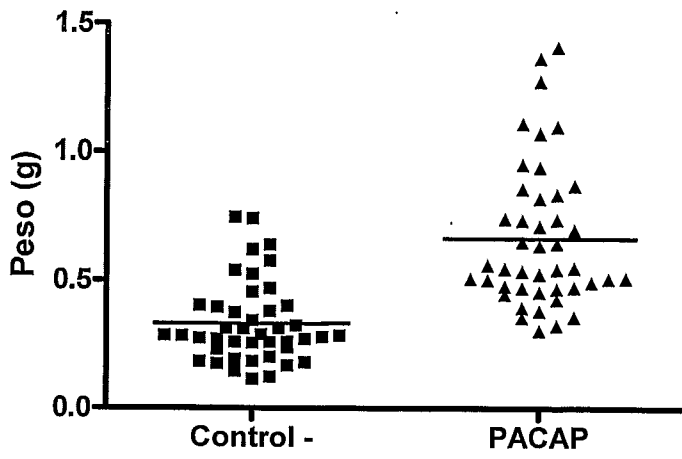


Figura 6

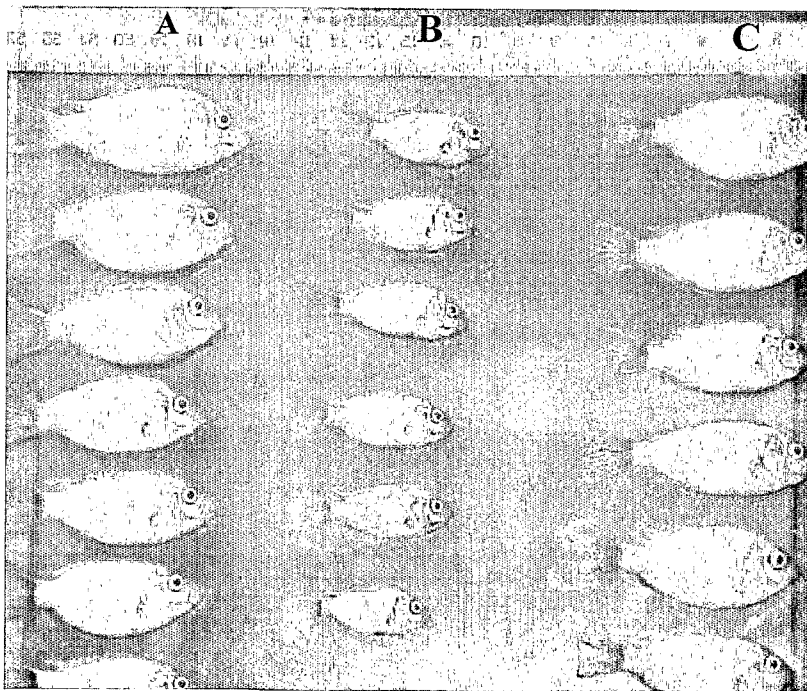


Figura 7

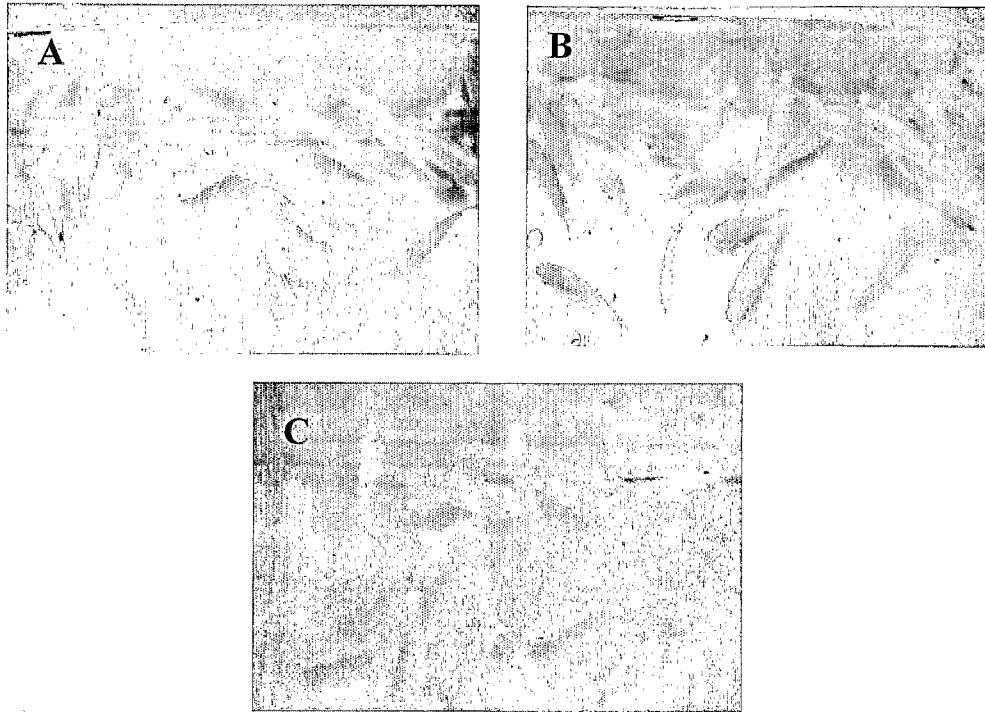
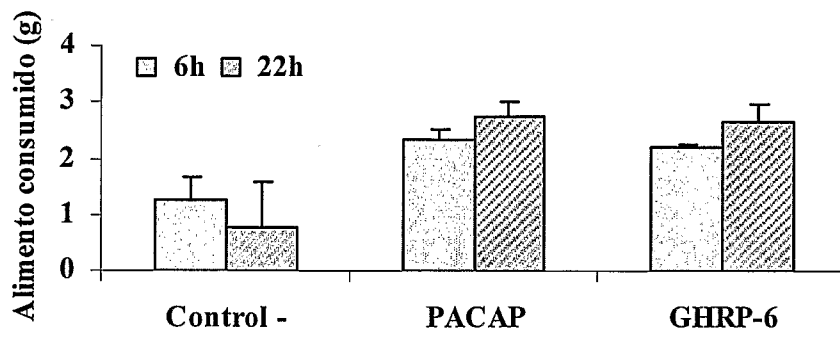


Figura 8



## Lista de Secuencias

<110> CENTRO DE INGENIERIA GENENTICA Y BIOTECNOLOGIA  
 <120> NEUROPEPTIDOS PARA EL CULTIVO DE ORGANISMOS ACUATICOS  
 <130> Juana Maria  
  
 <140>  
 <141>  
  
 <150> CU 2005- 0231  
 <151> 2005-11-22  
  
 <160> 14  
  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
  
 <210> 1  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligo cebador  
  
 <220>  
 <221> 5'UTR  
 <222> ()..)  
 <223> Oligo cebador para amplificar la secuencia nucleotídica completa del gen que codifica para GHRH-PACAP.  
  
 <220>  
 <221> 5'UTR  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 1  
 gcagccatgg ccaaactctag tagagctac 29  
  
 <210> 2  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligo cebador  
  
 <220>  
 <221> 3'UTR  
 <222> ()..)  
 <223> Oligo cebador para amplificar la secuencia completa del gen que codifica para GHRH-PACAP  
  
 <220>  
 <221> 3'UTR  
 <222> (1)..(31)  
 <400> 2  
 ggaattcctt taatggcttg acttcgtaca t 31  
  
 <210> 3  
 <211> 32  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligo cebador

<220>

<221> 5'UTR

<222> ()..)

<223> Oligo cebador para amplificar el gen exacto que codifica para el PACAP

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(32)

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(32)

<400> 3

catccatgatg cactcggacg gcattttcac gg

32

<210> 4

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligo cebador

<220>

<221> 3'UTR

<222> ()..)

<223> Oligo cebador para amplificar el gen exacto del PACAP

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1)..(38)

<400> 4

cgggatcctt atttgtttct aaacctctgt ctgtacct

38

<210> 5

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligo cebador

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(22)

<223> Oligo cebador para amplificar el gen exacto del PACAP para su expresion en Pichia pastoris

<400> 5

cactcggacg gcattttcac gg

22

<210> 6

<211> 31

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligo cebador

<220>  
 <221> 3'UTR  
 <222> (1)..(31)  
 <223> Oligo cebador para amplificar el gen exacto del  
 PACAP para su expresión en Pichia pastoris

<400> 6  
 actagtttat ttgtttctaa acctctgtct g 31

<210> 7  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligo cebador

<220>  
 <221> 5'UTR  
 <222> (1)..(30)  
 <223> Oligo cebador para amplificar el gen exacto del  
 PACAP para su expresión en Pichia pastoris

<400> 7  
 ccatgggaca ctgggacggc attttcacgg 30

<210> 8  
 <211> 727  
 <212> ADN  
 <213> Clarias gariepinus

<220>  
 <221> gene  
 <222> (1)..(727)  
 <223> Secuencia nucleotídica completa del gen que  
 codifica para el PACAP

<400> 8  
 atggccaaat ctagtagagc tactttgggt ctgctcatct acgggatctt aatgcgctac 60  
 acgcccattg cacacccatc ggaatggggt tcccgaatat gaggctagaa aacgacgtgt 120  
 tcggggacga gggaaactcg ttaagtgagc tgtctacga gccggacacg atgagcgcgc 180  
 gcagtgtccc agccctccct gaagacgcct acacactgta ctaccgccc gagagaagag 240  
 ccgaaacgca tgcagacgga ttgttagata gagccttgag ggacatcctg gttcagttat 300  
 cagcccgaaa atatctgcat tctctgacgg cagttcgcgt aggtgaggaa gaagaggatg 360  
 aagaggactc ggagccactg tccaagcggc actcggacgg cattttcacg gacagctaca 420  
 gccgctaccg gaaacaaatg gccgtaaaaa aataccttgc agcagtgtctg ggaagaaggt 480  
 acagacagag gtttagaaac aaaggacgccc gctttgotta tttgtagcgg ataggaagaa 540  
 aaggaaagaa agaaaaaac gcgagagaga gagagagaga gagaaataga gcaactgccc 600  
 tcccttgtgt ccattcaatc atacagtcag aagtctggta tctaactta cactgagcag 660  
 tcagtcgggt gatctcgctt gtgttctttt aaacatgtat tttatgtacg aagtcaagcc 720  
 attaaag 727

<210> 9  
 <211> 86  
 <212> PRT

<213> Clarias gariepinus

<220>

<221> PROPEP

<222> ( )..)

<223> Secuencia aminoacidica traducida del gen del PACAP

<400> 9

```

Met His Ala Asp Gly Leu Leu Asp Arg Ala Leu Arg Asp Ile Leu Val
 1           5           10           15
Gln Leu Ser Ala Arg Lys Tyr Leu His Ser Leu Thr Ala Val Arg Val
           20           25           30
Gly Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Ser Glu Pro Leu Ser Lys Arg
           35           40           45
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 50           55           60
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg
 65           70           75           80
Gln Arg Phe Arg Asn Lys
           85
    
```

<210> 10

<211> 114

<212> ADN

<213> Clarias gariepinus

<220>

<221> gene

<222> (1)..(114)

<223> Secuencia nucleotídica exacta del gen del PACAP

<400> 10

```

cactcggacg gcattttcac ggacagctac agccgctacc ggaaacaaat ggccgtaaaa 60
aaataccttg cagcagtgct gggaagaagg tacagacaga ggtttagaaa caaa 114
    
```

<210> 11

<211> 114

<212> ADN

<213> Tilapia nilotica

<220>

<221> gene

<222> (1)..(114)

<223> Secuencia nucleotídica exacta del gen del PACAP

<400> 11

```

cactcggacg gcattttcac ggacagctac agccgctacc ggaaacaaat ggcagtaaaa 60
aagtatcttg cagcagtgct gggaagaagg tacagacaga ggtttagaaa caaa 114
    
```

<210> 12

<211> 40

<212> PRT

<213> Clarias gariepinus

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(40)

<223> Secuencia aminoacidica obtenida para el PACAP a partir de Pichia pastoris

<400> 12

```

Met Gly His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg
    
```

```

1           5           10           15
Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg
                20                25                30
Tyr Arg Gln Arg Phe Arg Asn Lys
                35                40

```

```

<210> 13
<211> 39
<212> PRT
<213> Claria gariepinus

```

```

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(39)
<223> Secuencia aminoacídica del PACAP obtenida a partir de E. coli
<400> 13
Met His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys
 1           5           10           15
Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr
                20                25                30
Arg Gln Arg Phe Arg Asn Lys
                35

```

```

<210> 14
<211> 38
<212> PRT
<213> Clarias gariepinus

```

```

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(38)
<223> Secuencia aminoacidica exacta del PACAP a partir
      de Pichia pastoris
<400> 14
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 1           5           10           15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg
                20                25                30
Gln Arg Phe Arg Asn Lys
                35

```

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CU2006/000013

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. C07K14/575

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 A01K A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 477 181 A1 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH [CU]) 17 November 2004 (2004-11-17) claims	1-23
A	WO 94/26897 A (UNIV VICTORIA INNOVAT DEV [CA]) 24 November 1994 (1994-11-24) claims	1-23
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2007

Date of mailing of the international search report

05/03/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sommer, Birgit

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/CU2006/000013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MATSUDA K ET AL: "Anorexigenic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: Feeding-induced changes in the expression of mRNAs for PACAP and its receptors in the brain, and locomotor response to central injection" NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol. 386, no. 1, 23 September 2005 (2005-09-23), pages 9-13, XP004986031 ISSN: 0304-3940 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2006/000013

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1477181	A1	17-11-2004	AT 347369 T 15-12-2006
			AU 2003210124 A1 08-10-2003
			BR 0307092 A 28-12-2004
			CA 2473973 A1 02-10-2003
			CN 1622821 A 01-06-2005
			WO 03080102 A1 02-10-2003
			JP 2005519972 T 07-07-2005
			MX PA04006940 A 06-12-2004
			US 2006234905 A1 19-10-2006
WO 9426897	A	24-11-1994	AU 6791594 A 12-12-1994
			CA 2165051 A1 24-11-1994
			EP 0699238 A1 06-03-1996
			NO 954559 A 12-01-1996
			US 5695954 A 09-12-1997



# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/CU2006/000013

## C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	<p>MATSUDA K ET AL: "Anorexigenic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: Feeding-induced changes in the expression of mRNAs for PACAP and its receptors in the brain, and locomotor response to central injection"</p> <p>NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol. 386, no. 1, 23 septiembre 2005 (2005-09-23), paginas 9-13, XP004986031 ISSN: 0304-3940 resumen</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-23

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
Información relativa a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº  
**PCT/CU2006/000013**

EP 1477181	A1	17-11-2004	AT	347369	T	15-12-2006
			AU	2003210124	A1	08-10-2003
			BR	0307092	A	28-12-2004
			CA	2473973	A1	02-10-2003
			CN	1622821	A	01-06-2005
			WO	03080102	A1	02-10-2003
			JP	2005519972	T	07-07-2005
			MX	PA04006940	A	06-12-2004
			US	2006234905	A1	19-10-2006
-----						
WO 9426897	A	24-11-1994	AU	6791594	A	12-12-1994
			CA	2165051	A1	24-11-1994
			EP	0699238	A1	06-03-1996
			NO	954559	A	12-01-1996
			US	5695954	A	09-12-1997
-----						