



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 222**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/31** (2006.01)  
**C07K 14/285** (2006.01)  
**A61K 39/102** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04763575 .0**  
96 Fecha de presentación : **28.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1651765**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de *Photobacterium damsela* novedosa y sus usos.**

30 Prioridad: **29.07.2003 GB 0317733**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.09.2011**

73 Titular/es: **Novartis AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, ES**

72 Inventor/es: **Dos Santos, Nuno, Miguel, Sim Es;**  
**Do Vale, Ana, Maria, Silva;**  
**Teixeira da Silva, Manuel, Alexandre y**  
**Da Silva Azevedo, Jorge, Eduardo**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 365 222 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de *Photobacterium damsela* novedosa y sus usos.

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con una novedosa proteína secretada a partir del *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, y con el uso de la proteína o una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína en una vacuna contra la pasteurelosis en peces.

Antecedentes de la Invención

10 La mortalidad resultante a partir de infecciones con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (antiguamente *Pastourelle piscicida*) causa las pérdidas más significantes en acuicultura marina de agua caliente en todo el mundo. La enfermedad (pasteurelosis) tiene gran impacto económico en Japón, donde afecta principalmente a los cultivos de medregal del Japón, y en la zona del mediterráneo, debido a las pérdidas que causan en cultivos del besugo y de la lubina. La terapia con antibióticos por lo general no es efectiva e indeseable debido a su impacto ambiental negativo. El desarrollo de una vacuna contra esta enfermedad ha sido lento, predominantemente como resultado del patógeno que es facultativamente intracelular, y por consiguiente no se expone generalmente a mecanismos de  
15 defensa inmunes. Hasta ahora, la investigación de vacunas se ha centrado en bacterinas preparadas a partir de células muertas por formalina o calor. Una vacuna de bacterina enriquecida en productos extracelulares (ECPs) llamada "DI21" ha sido comercializada en algunos países Europeos. El grado de eficacia obtenida con estas bacterinas es muy variable y la duración de la protección, con frecuencia es corta.

20 Existe una necesidad no satisfecha en el campo para administrar una vacuna efectiva no costosa, fácil de fabricar, y reproducible contra Infección por *Photobacterium*.

Resumen de la Infección

En un primer aspecto, la invención proporciona una proteína extracelular 55kDa aislada o purificada a partir de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, y los anticuerpos construidos de esta.

25 En un segundo aspecto la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de 55kDa

También se proporcionan un vector de expresión de ADN portador de la secuencia de ácido nucleico de p55, y una célula huésped transformada con el vector de expresión de ADN.

30 En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende una proteína extracelular de 55kDa aislada o purificada a partir del *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una proteína extracelular de 55kDa aislada o purificada a partir del *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, como un medicamento.

35 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una proteína extracelular de 55kDa aislada o purificada a partir del *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la pasteurelosis en peces.

Descripción de las Figuras

Figura 1 (SEQ ID NO:1) muestra la secuencia de ADN de la proteína de p55 identificada en MT1415 (una cepa virulenta de *Ph. damsela* subsp. *piscicida*).

40 Figura 2 (SEQ ID NO:2) muestra la secuencia de aminoácido deducida de p55; la secuencia señal de aminoácido 16, que puede ser transformada para formar la proteína madura está sombreada.

Descripción Detallada de la Invención

45 La proteína que constituye el objeto de la presente invención fue purificada a partir de una preparación de productos extracelulares (ECP) a partir del *Photobacterium damsela* susp. *piscicida* virulento. Por SDS-PAGE esta proteína purificada fue juzgada para correr junto con un marcador de 55kDa. Para mayor comodidad, esta proteína se conoce como la proteína de 55kDa o p55. Se ha descubierto que esta proteína juega un papel importante en la inducción de la apoptosis en fagocitos peritoneales durante la infección. La proteína de 55kDa se ha clonado y secuenciada; la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácido deducida se describen en la Figuras 1 y 2, respectivamente. El gen p55 o secuencia del ácido nucleico "aislada" se entiende que significa el gen o la secuencia diferente de su contexto natural en el genoma de *Ph. damsela*.

La proteína de 55kDa de la presente invención es distinta del así llamado complejo de proteína ECP 55kDa a partir del *Photobacterium* revelado en WO 01/10459, que en realidad está cercana a 52kDa en tamaño. Se demostró que este complejo ECP 55kDa consiste de al menos dos diferentes entidades, ninguno de los cuales tiene una secuencia N-terminal relacionada con la secuencia de p55 revelada en este documento. El complejo ECP 55kDa de WO 01/10459 se expresa en condiciones de cultivo suplementado con hierro, mientras que la proteína de 55kDa de la presente invención es la principal proteína secretada en la fase exponencial media independiente del nivel de hierro en el medio de cultivo. Adicionalmente, cuando el antisuero construido contra el complejo ECP 55kDa de WO 01/10459 fue utilizado para tratar preparaciones de ECP para retirar esta proteína, las propiedades apoptogénicas de la preparación de ECP tratada no fueron afectadas.

Hemos querido evaluar si la inmunización de los peces con p55 nativo purificado podría provocar una respuesta inmune protectora contra la infección por *Photobacterium*. Sin embargo, se encontró que la proteína era altamente tóxica para los peces cuando se administra en la forma purificada nativa, lo que lleva a una muerte rápida. En su lugar, utilizamos un método de administración pasiva para demostrar que los anticuerpos contruidos contra esta proteína de 55kDa en conejos (que específicamente une al p55 secretado por las células de *Photobacterium* virulentas In vivo), son capaces de reducir las mortalidades relacionadas con el *Photobacterium* a un grado significante (Ejemplo 3).

Los beneficios de la inmunización pasiva pueden ser superados por la inmunización activa, por lo cual los anticuerpos se construyen para la proteína de 55kDa por los propios peces, después de la vacunación con un derivado de la proteína que es menos tóxico que la forma nativa, según se demuestra en el Ejemplo 4.

En la preparación de productos extracelulares a partir de *Ph. damsela* subsp. *piscicida*, Hemos descubierto que p55 es la principal proteína secretada en cultivos bacterianos cultivados a una fase exponencial media, que constituye más del 85% de la proteína secretada bajo estas condiciones (sobrenadantes bacterianos más viejos - exponencial final para la fase estacionaria – tienen un patrón de proteína mucho más complejo, aunque p55 también está presente), la invención en un aspecto se relaciona en general con las preparaciones de ECP inactivadas enriquecidas en p55 para utilizar en las vacunas. Preferiblemente estas preparaciones de ECP se preparan bajo condiciones de hierro normales, i.e. las células se cultivan en medio de cultivo que no es suplementado con hierro, ni incorporando agentes quelantes de hierro. La concentración de hierro del medio es preferiblemente <15µM, más preferiblemente <10 µM, más preferiblemente <1µM, y más preferiblemente <0.1µM. Una modalidad preferida de la invención se relaciona con una vacuna que comprende un sobrenadante del cultivo concentrado a partir del *Ph. damsela* subsp. *piscicida*, preferiblemente cultivado a fase exponencial media, que ha sido inactivado. La "fase exponencial media" se refiere a una densidad óptica (OD) a 600nm de 0.5-0.7, preferiblemente 0.55-0.65, más preferiblemente aproximadamente 0.6. El sobrenadante preferiblemente se separa fuera de las células antes de la etapa de inactivación. El sobrenadante del cultivo celular opcionalmente se concentra para utilizar (antes de o después de la inactivación), por ejemplo 1.5 - 200 veces, opcionalmente 5-150 veces, por ejemplo 50-100 veces. Los métodos convencionales para la concentración del sobrenadante pueden ser empleados, incluyendo dispositivos de filtración centrífuga, la ultracentrifugación, diálisis vacío, precipitación con sulfato de amonio, y similares. El Ejemplo 1 indica un modo de preparar un sobrenadante de cultivo concentrado, y el Ejemplo 4 enseña una etapa de inactivación con formaldehído. Ejemplos apropiados de agentes de inactivación incluyen formaldehído, saponinas, beta-propiolactona (BPL), y etilenoimina binaria (BEI). Una proteína "aislada" o "purificada" se define por ser sustancialmente libre de material libre u otras proteínas contaminantes a partir de la célula o fuente de tejido a partir de la cual la proteína se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. El lenguaje "sustancialmente libre de material libre" incluye preparaciones de la proteína en las cuales la proteína se separa a partir de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce recombinantemente. En una modalidad, el lenguaje "sustancialmente libre de material libre" incluye preparaciones de proteínas de 55kDa que tienen menos de aproximadamente 30% (de peso seco) de proteína de no-55kDa (también se denomina en este documento como una "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de proteína contaminante, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de proteína contaminante, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de proteína contaminante. Cuando la proteína de 55kDa o porción biológicamente activa de esta se produce recombinantemente, también se prefiere sustancialmente libre de medio de cultivo, i.e., medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10%, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de la proteína.

Existen varios aislados geográficos diferentes de *Photobacterium damsela* susp. *piscicida*. Ejemplos de cepas familiares a los investigadores en el campo incluyen MT1415, PP3, MT1375, MT1588, MT1594, DI21, 851, EPOY 8803-11, PTAVSA95, ATCC 29690, CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) 4780, CECT 4781, CECT 5063 y CECT 5064. Existe un cierto grado de variación en la secuencia de ácido nucleico de estas cepas y en las secuencias de aminoácidos de las proteínas que expresan. La proteína de 55kDa utilizada en la invención no se restringe a ninguna fuente de cepa específica pero puede estar ausente a partir de ciertas cepas no-virulentas de *Ph. damsela*, tales como ATCC 29890 y EPOY 8803-II. Una persona de habilidad fácilmente puede probar la ausencia de esta proteína en una cepa por análisis SDS-PAGE o análisis Western blotting, por PCR, o por ensayo de replicación de la apoptosis descrito en do Vale et al. Fish & Shellfish immunology 15 (2003): 129-144. Puede ser una ventaja en el apareamiento de la variante 55kDa con la cepa prevalente en una zona geográfica particular cuando se diseña una vacuna para dicha zona.

Otro aspecto de la invención se refiere a los vectores, preferiblemente vectores de expresión, que comprenden una secuenciación del ácido nucleico que codifica p55 (o una porción de este). Como se utiliza en este documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual este ha sido unido. Un tipo de vector es un plásmido, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el cual segmentos de ADN adicionales se pueden ligar. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se ligan operativamente, tales vectores se denominan en este documento como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están en la forma de plásmidos. Sin embargo, la invención tiene la intención de incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, replicación de los retrovirus defectuosos, adenovirus y virus adeno-asociados), que prestan funciones equivalentes,

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma apropiada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped que se utilizan para la expresión, ligadas operativamente a la secuencia del ácido nucleico que se expresa. Los vectores de expresión de la invención pueden ser los vectores de expresión eucariotas utilizados para la expresión dentro del recipiente pretendido del antígeno de 55kDa (como una vacuna de ADN) o procariota o vectores de expresión eucariotas para la expresión dentro de un organismo huésped diferente del recipiente final (para la producción de vacunas de antígeno recombinante). De manera alterna, el vector de expresión recombinante puede ser transcrito y traducido *in vitro*, por ejemplo utilizando las secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimerasa T7.

Dentro de un vector de expresión, "ligado operativamente" se entiende que significa que la secuencia de nucleótido de interés se liga a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). El término "secuencia reguladora" tiene la intención de incluir promotores, potenciadores y otros elementos control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótido en muchos tipos de célula huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótido solo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas del sitio). Será apreciado por aquellos de habilidad en el oficio que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped para ser transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en las células huésped, por consiguiente, para producir las proteínas o péptidos, incluyendo péptidos o proteínas de fusión, codificados por los ácidos nucleicos como se describe en este documento (por ejemplo proteínas de 55kDa, formas derivadas de p55, proteínas de fusión de p55 con un péptido heterólogo, etc.).

Otro aspecto de la invención se refiere a las células huésped en las cuales un vector de expresión recombinante de la invención, ha sido introducido mediante la transformación. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota (incluyendo una célula eucariota dentro de un organismo eucariota multicelular), tal como *E. coli*, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Otras apropiadas células huésped, se conocen por aquellos de habilidad en el oficio (por ejemplo Goeddel, supra).

La expresión de proteínas en procariotas por lo general se lleva a cabo en *E. coli*, con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de ya sea las proteínas de fusión o no-fusión. Los vectores de fusión adicionan un número de aminoácidos a una proteína codificada en esta, usualmente al terminal amino de la proteína recombinante. A menudo, en vectores de expresión de fusión, un sitio de división proteolítica se introduce en el cruce de la fracción de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante a partir de la fracción de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognado, incluyen Factor Xa, trombina y enteroquinasa. Los típicos vectores de expresión de fusión incluyen pGEX, (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan la glutatona S-transferasa (GST), proteína de enlace de la maltosa E, o la proteína A, respectivamente, con la proteína recombinante diana.

El p55 nativo purificado, también se abarca dentro del alcance de la invención, y puede ser extraído o purificado a partir de cultivos celulares *Ph. damselae* utilizando procedimientos convencionales de purificación de proteína.

El gen p55 se puede incorporar en una Vacuna del Ácido Nucleico (NAV), por lo cual la NAV se lleva por las células huésped de un animal vivo, y la expresión del gen p55 toma lugar dentro del citosol. Un gen p55 insertado en un vector de ADN se puede inocular directamente en un pez (por ejemplo, por vía intramuscular) la expresión *in vivo* dentro de las células de peces. De esta manera, en un aspecto de la invención se proporciona una vacuna de ácido nucleico que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un plásmido de ADN en el cual una secuencia de ácido nucleico que codifica p55 se liga operativamente a una secuencia reguladora transcripcional. Las secuencias reguladoras transcripcionales incluyen secuencias promotoras, de poliadenilación y otras secuencias de

nucleótidos tales como los oligonucleótidos inmuno-estimulantes que tienen dinucleótidos CpG no-metilados, o secuencias de nucleótidos que codifican para otras proteínas antigénicas o citoquinas adyuvantes. La presencia de secuencia(s) reguladora(s) transcripcional(s) eucariota o viral permite la expresión del gen p55 en células de peces. El plásmido de ADN por sí mismo puede ser replicado en células bacterianas con el fin de preparar una composición de una vacuna, pero generalmente carece de secuencias reguladoras transcripcionales que permiten la expresión del gen p55 dentro de las células procariontas. Para la óptima expresión *in vivo* puede ser preferido seleccionar las secuencias reguladoras transcripcionales endógenas a los peces que se vacunan. Por ejemplo, promotores del gen actina o citoquina endógena se pueden considerar. El ADN puede estar presente en forma desnuda o puede ser administrado junto con un agente que facilita la absorción celular (por ejemplo liposomas o lípidos catiónicos). La tecnología de la vacunación de ADN de peces se explica con más detalle en US 5,780,448, que se incorpora en este documento por referencia. La vacuna de la invención está destinada a la administración a cualquier pez en riesgo de, o que sufre de, pasteurelisis. Ejemplos de especies susceptibles incluyen: medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), besugo rojo (*Acanthopagrus schlegelii*), besugo negro (*Pagrus major*), pez de cabeza de serpiente (*Channa maculata*), mero rojo (*Epinephelus akaara*), pez lija oval (*Navodon modestus*), róbalo rayado (*Morone saxatilis*), róbalo rayado híbrido (*M. saxatilis x M. chrysops*), la dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), salmonete (*Mugil sp.*), blenio yatabe (*Pictiblennius yatabei*), limanda Japonesa (*Paralichthys olivaceus*) y lenguado (*Solea senegalensis*).

Las típicas rutas de administración de la vacuna son por inyección en el músculo (en particular, músculo apical) o cavidad peritoneal (para peces más grandes), por vía oral en el alimento, o por inmersión en agua de mar o en agua fresca. Una ruta de vacunación preferida de una vacuna antigénica es por inyección intraperitoneal. Se recomienda que los peces tengan por lo menos 2 gramos, preferiblemente 10 gramos o más de peso corporal para la administración de la vacuna de la invención por inyección. Porque ciertas especies de peces son más vulnerables a la pasteurelisis cuando jóvenes (tales como el pargo dorado y la lubina), puede ser preferido vacunar los peces a un peso de 50g o menos, opcionalmente por inmersión. Por inmersión o administración oral, un peso corporal de al menos 2 gramos se prefiere.

La vacuna de la invención puede ser administrada a los peces para propósitos profilácticos o terapéuticos.

La dosificación efectiva de la vacuna puede variar dependiendo del tamaño y especie del sujeto, y de acuerdo con el modo de administración. La dosificación óptima se puede determinar mediante ensayo y error por un veterinario o especialista en acuicultura. Debido al estrés sufrido por los peces en respuesta a la vacunación, se prefiere que la vacuna se proporcione como una vacuna de dosis única, en una forma de dosificación unitaria. Las vacunas apropiadamente pueden comprender entre aproximadamente 1µg y 1000µg, preferiblemente entre aproximadamente 10µg y 200µg, más preferiblemente entre aproximadamente 50µg y 100µg de proteína recombinante o purificada en una dosificación unitaria. Preferiblemente una dosificación unitaria única se administra a los peces que se tratan. Para vacunas inyectables, una dosificación unitaria única apropiada es 0.025 a 0.5 ml, preferiblemente 0.05 a 0.2 ml, opcionalmente aproximadamente 0.1 ml, en volumen.

Para vacunas de ADN, una dosificación mínima de 10µg hasta dosificaciones de 1000µg del plásmido por animal debería ser suficiente para la expresión apropiada del antígeno *in vivo*.

Por lo general, las vacunas se preparan como soluciones líquidas, suspensiones, o emulsiones para inyección o para la administración a través del agua del ambiente. Por ejemplo; una emulsión líquida o concentrado emulsificable se puede preparar con el fin de ser adicionado a un tanque de agua, baño, o jaulas marinas donde los peces de mantienen. Las formas sólidas (por ejemplo polvo) apropiadas para la disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos, o para mezclar con el alimento sólido, antes de la administración también se puede preparar. La vacuna puede ser liofilizada, opcionalmente liofilizada, en una forma lista para su uso para la reconstitución con un diluyente o solvente estéril. Por ejemplo, la vacuna liofilizada puede ser reconstituida en solución salina (opcionalmente proporcionada como parte del producto de la vacuna envasada). Las vacunas de ácidos nucleicos, particularmente son apropiadas para la liofilización debido a la estabilidad y una larga vida de almacenamiento de las moléculas. Las composiciones de vacunas farmacéuticas de la invención, se pueden administrar en una forma de liberación inmediata o liberación prolongada.

En una modalidad de la invención, p55 o un vector de expresión de ADN portador de la secuencia codificante de p55 se combina con un portador farmacéuticamente aceptable o vehículo en una composición farmacéutica. Los portadores o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen excipientes convencionales, y pueden ser, por ejemplo, solventes tales como agua, aceite, o solución salina, dextrosa, glicerol, sacarosa, tricaina, agentes de humectación o emulsificación, agentes de carga, cubiertas, aglutinantes, rellenos, desintegrantes, diluentes, lubricantes, agentes reguladores de pH, o adyuvantes convencionales tales como muramil dipéptidos, avridina, hidróxido de aluminio, aceites (por ejemplo aceite mineral), saponinas, co-polímeros bloqueadores y otras sustancias conocidas en el oficio. En una modalidad preferida de la invención, una composición de una vacuna comprende p55 aislado o purificado o un derivado de este, y un adyuvante. El adyuvante preferido es el adyuvante incompleto de Freund. Opcionalmente la proteína de p55 o el derivado se suspende en una solución salina (tal como PBS) y se emulsifica con el adyuvante incompleto de Freund en una relación de aproximadamente 1:1 en volumen.

Para inmunizar un pez, un antígeno de p55 o vector del gen p55 puede ser administrado por vía parenteral, usualmente por inyección intramuscular en un vehículo apropiado, inyección en la cavidad peritoneal, vía oral en el alimento, o por inmersión. Las preferidas composiciones de vacuna antigénica de la invención están en una forma apropiada para la administración por inyección o inmersión. La vacunación de ADN, generalmente es por inyección intra-muscular.

En algunos casos puede ser deseable combinar la vacuna de la invención con otro antígeno o antígenos en una vacuna de combinación, o en un kit que comprende uno o más componentes para la administración por separado, secuencial o de forma simultánea, para el tratamiento o prevención de infecciones con *Photobacterium damselae* subespecies *piscicida* (antiguamente *Pasteurella piscicida*) o una multitud de enfermedades a las cuales los peces son susceptibles.

Otros antígenos con los cuales la vacuna de la invención se pueden combinar incluyen, por ejemplo, antígenos derivados a partir de los siguientes patógenos: *Photobacterium damselae* subespecies *piscicida*., *Iridovirus* spp., *Nodavirus* spp., *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Streptococcus* spp. *Lactococcus* spp y *Nocardia* spp.

Los novedosos antígenos revelados como parte de la presente invención también son útiles en la selección de anticuerpos contra *Ph. damselae*, por ejemplo en la preparación de un kit de diagnóstico para la prueba de la exposición de los peces a esta bacteria.

Los anticuerpos construidos contra el antígeno de p55 purificado también se comprenden dentro de la invención. Se contempla que tales anticuerpos podrían tener tanto aplicaciones de diagnóstico como terapéuticas en el manejo de la enfermedad y salud de los peces. Ambos los anticuerpos policlonales y los anticuerpos monoclonales pueden ser útiles en este sentido. Los procedimientos para la inmunización de animales, por ejemplo ratones, con proteínas y selección de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales inmunogen-específicos son bien conocidos en el oficio (ver por ejemplo Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495-497). Ensayos en sándwich y ELISA pueden ser mencionados como ejemplos específicos de ensayos de diagnóstico.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Clonación y secuenciación de p55 a partir de *Ph. Damselae* subsp. *piscicida*

Las bacterias *Ph. damselae* (cepa MT1415) se cultivan en caldo de soja tríptico (TSB) suplementado con NaCl a una concentración final de 1% (peso/v) (TSB-1) a 22°C con agitación (100 rpm) a una densidad óptica a 600nm de aproximadamente 0.6 (fase exponencial media). Las células bacterianas se eliminan por centrifugación y la posterior filtración a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22µm. Los sobrenadantes libres de células se concentran 100-veces utilizando un concentrador Vivaflow 200 (Sartorius AG, Goettingen), y se dializan contra Tris-HCl 20mM (pH 8.0).

Los sobrenadantes de cultivo concentrado se someten a SDS-PAGE. La banda de 55kDa se retira a partir del gel después de la tinción de azul de Coomassie. La digestión tríplica *in situ* de la proteína purificada y la degradación de Edman de dos péptidos purificados por HPLC se realiza.

Los fragmentos produjeron las siguientes secuencias: NNDKPDASDDKYADYVVR y YTAAATEYTVIDALFHSPTFR. Las regiones subrayadas se utilizan para diseñar cebadores redundantes A1 y B, respectivamente. El ADN bacteriano total se prepara a partir de la cepa MT1415 de acuerdo con técnicas convencionales y se utiliza como plantilla para amplificaciones de PCR utilizando el cebador A1 y B. El fragmento amplificado de 200bp se retira de un gel de agarosa, purificado utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), clonado en el Vector pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenció para confirmar si corresponde al fragmento deseado.

El fragmento de 200bp derivado del PCR, descrito anteriormente se marca con AlkPhos Direct (Amersham Biosciences) y se utiliza como una sonda para el análisis de Southern blot de ADN total digerido con enzima de restricción a partir de la cepa MT1415. El ADN de cortes de agarosa que contienen los fragmentos de reactivos relevantes se extrae utilizando el kit QIAquick Gel extraction (Qiagen). Un fragmento HindIII-HindIII de 3100bp se inserta en pBluescript II KS (Stratagene); un fragmento NcoI-BamHI de 4100bp se clona en pET-32b (Novagen). Los transformantes se seleccionan por PCR utilizando los cebadores A1 y B, y se secuenciaron.

Otra sonda de ADN se genera por PCR utilizando el plásmido recombinante que contiene el fragmento NcoI-BamHI de 4000bp y los cebadores P4 (5'-GGCCATGATGAATCTGAAGG-3') y T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'). Este fragmento de ADN se utiliza como una sonda en análisis Southern blotting de ADN total de MT1415, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. La región de un gel de agarosa que contiene un fragmento reactivo HindIII-HindIII de 1000bp se retira, el ADN se extrae utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y se clona en el vector pBluescript II KS (Stratagene). Los transformantes con la construcción deseada se identifican por PCR utilizando los cebadores P4 y T7 y se secuenciaron.

La secuencia de ADN completa de p55 se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO:1), y la estructura primaria deducida se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO:2). La proteína tiene 513 aminoácidos de largo, y muestra un perfil

hidropático típico de una proteína no-membrana. El análisis de la secuencia de aminoácido utilizando SignalP, versión 1.1 ([www.cbs.dtu.dk/services/signalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP)), revela la existencia de un péptido señal putativo con un sitio de división entre los residuos de aminoácidos 16 y 17. Por casualidad, una de las secuencias obtenidas por degradación de Edman de péptidos tripticos a partir de p55 inicia en el residuo de aminoácido 17, una asparagina. Considerando que la tripsina no divide los enlaces peptídicos en el lado carboxilo de la alanina (residuo 16), se puede concluir que la asparagina 17 representa el N-terminal de la proteína madura. La masa molecular pronosticada de la forma madura de la proteína (56.185 kDa) está en concordancia con el tamaño estimado por SDS-PAGE. Las búsquedas de bases de datos utilizando la estructura primaria de p55 revela alguna homología entre los primeros 340 residuos de aminoácidos de p55 y una proteína profágica putativa de función desconocida a partir de *E. coli* 0157:H7.

### Ejemplo 2: Expresión de p55 en *E. coli*

Los fragmentos de PCR que contienen el gen p55 de longitud completa se clonan en dos diferentes vectores de expresión: pET-28a (+) (Novagen) y pQE-31 (Qiagen), produciendo los plásmidos recombinantes pETp55 y pQEp55, respectivamente. Las células de *E. coli* se transforman por métodos convencionales y los transformantes se cultivan a 37°C con agitación durante 8 horas en Caldo de Luria (LB) suplementado con 50µg/ml de canamicina o con 50µg/ml de canamicina más 200µg/ml de ampicilina para la cepa *E. coli* BL21 (pET-28 (+) vectores) y la cepa *E. coli* M15 (vectores pQE-31), respectivamente. Estos cultivos se diluyeron 1:100 en LB recién preparado con los respectivos antibióticos y se cultivaron por 3 horas a 37°C con agitación. IPTG luego se adiciona a una concentración final de 1 mM y el cultivo continúa durante 5 horas a 37°C. Las células inducidas por IPTG se peletizan por centrifugación.

El análisis SDS-PAGE de células de *E. coli* portadoras del plásmido pETp55 revela una expresión robusta de una proteína de 57kDa no-soluble (presente en la fracción de cuerpos de inclusión). El análisis Western blotting de estas células utilizando el anticuerpo dirigido a p55 (descrito en el Ejemplo 3) confirma la identidad de esta proteína. La masa molecular aparente de esta proteína es 2kDa mayor de la mostrada por el p55 auténtico, indicando que la secuencia señal de la forma precursor de p55 no se divide en estas células de *E. coli*. La proteína insoluble de 57kDa no posee actividad apoptogénica.

El análisis Western blotting de la célula M15 de *E. coli* que hospeda el vector de expresión pQEp55 utilizando el anticuerpo contra p55 (descrito en el Ejemplo 3), revela un bajo nivel de expresión de p55. Sin embargo, el p55 producido por estas células recombinantes muestra el peso molecular correcto por SDS-PAGE. Adicionalmente, la proteína expresada se encuentra en la fracción soluble obtenida después de la centrifugación de células sonicadas, sugiriendo que el p55 producido en estas células se plega correctamente. Cuando estos extractos solubles se inyectan en lubina, números altos de células apoptóticas pueden ser observados en las cavidades peritoneales 6 horas después de la inyección. Los efectos apoptóticos de la proteína recombinante son morfológicamente indistinguibles de aquellos vistos en la inyección con p55 nativo purificado. El p55 nativo purificado se prepara mediante la dilución de sobrenadantes de cultivo concentrado de *Ph. damselae* 1:1 en 2x solución reguladora de PAGE-nativa (la misma composición que la solución reguladora de la muestra SDS-PAGE, excepto que no se incluye SDS y la concentración de beta-mercaptoetanol se reduce a 5mM) y la posterior separación por 10% de PAGE-Nativa. Los carriles en las extremidades del gel se cortan, se tiñen con azul de Coomassie y se utilizan para localizar la posición de las principales bandas de proteína. El corte que contiene la proteína de p55 se corta y pica en trozos para la extracción por difusión (a 4°C con agitación suave) utilizando Tris-HCl 20mM (pH 8.0) como solución reguladora de elución,

### Ejemplo 3: Inmunización pasiva utilizando antisueros de conejo para proteína de 55kDa de *Photobacterium* (Tres experimentos independientes se llevan a cabo)

Peces: Lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*) que tiene un peso corporal de aproximadamente 100g se mantienen en acuario de vidrio con agua de mar esterilizada con UV, suministrada a través de un biofiltro en un sistema de recirculación. La temperatura del agua es una constante 23±1 °C y la salinidad es 35‰.

Producción de suero inmune: El suero hiperinmune contra la proteína de 55kDa se construye en conejos utilizando 3 dosis de la proteína purificada emulsificada en adyuvante incompleto de Freund. La proteína purificada de p55 se prepara de la siguiente manera. Los sobrenadantes de cultivo concentrado a partir de la cepa MT1415 preparada como se describe en el anterior Ejemplo 1, se someten a SDS-PAGE con azul de Coomassie. Después de la separación electroforética, la banda de 55kDa se retira del gel, se pica en trozos en solución reguladora de elución (0.02% de SDS, beta-mercaptoetanol 10mM, 34 mg/ml de PMSF) y se incuba durante la noche a 4°C con agitación. La suspensión de acrilamida luego se centrifuga a 3000g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recolecta y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. El sobrenadante se recolecta, se congela a -80°C y se liofiliza. A continuación la proteína liofilizada se resuspende en 2ml de agua destilada y la proteína se precipita con acetona (90% v/v) durante la noche a -20°C. La proteína precipitada se recupera por centrifugación a 3000g durante 10 min a 4°C, se lava con 90% (v/v) de acetona, se seca durante la noche a temperatura ambiente y se resuspende en PBS. Se tomo sangre de los conejos, 1 semana después de la inmunización final. El suero control es suero pre-inmune a partir del mismo conejo.

Desafío: La cepa PTAUSA95 de *Ph. damselae* subsp. *piscicida* se descongela e inocula en agar de soja de triptona que contiene 1% de NaCl (TSA-1). Los cultivos se cultivan durante la noche y luego se resuspenden en agar de caldo de soja de triptona que contiene 1% de NaCl (TSB-1). La densidad bacteriana se mide por espectrofotometría (Beckman DU-65) a 600nm y las diluciones se hicieron hasta el número esperado de unidades formadoras de colonia (CFU) pronosticadas por una curva absorbancia/CFU determinada previamente. CFU real utilizada como una dosis de desafío se chequean por recuentos viables de diluciones en TSB-1 esparcido en placas TSA-1 48h después de la inoculación a 24°C. El inóculo del desafío se introduce en las jeringas y cada pez se inocula por inyección intraperitoneal (i.p.) con 100µl. Para la confirmación de la causa de muerte del patógeno se vuelve aislar del riñón cefálico y/o peces muertos mediante el cultivo en TSA-1.

10 Antes de la vacunación y del desafío todos los peces se anestesiaron en 0.003% (v/v) de etileno glicol monofenil éter.

Experimento 1

15 Un grupo de 8 peces recibe 100µl por pez de antisuero de conejo del primer sangrado, construido contra la proteína de 55kDa, por inyección intraperitoneal. Un grupo de 8 peces recibe 300 µl por pez de antisuero de conejo del primer sangrado de la misma manera. Un grupo control final de 8 peces recibe 300 µl por pez de suero de conejo normal. No se requieren grupos control negativos debido a las mortalidades altamente características resultantes de la infección con *Photobacterium*. Los peces de cada grupo de prueba se mantienen en tanques independientes. Inmediatamente después de la vacunación, mientras que aún están bajo anestesia, cada pez recibe una dosis de desafío de  $2.24 \times 10^7$  unidades formadoras de colonia (CFUs) de *Photobacterium*.

20 Experimento 2

25 Un grupo de 8 peces recibe 300µl por pez de antisuero de conejo del primer sangrado, construido contra la proteína de 55kDa, por inyección i.p.. Un grupo de 8 peces recibe 300µl por pez de antisuero de conejo del segundo sangrado. Un grupo control de 8 peces recibe 300µl por pez de suero de conejo normal. Los peces de cada grupo de prueba, se mantienen en tanques independientes. Inmediatamente después de la vacunación, mientras que aún están bajo anestesia, cada pez recibe una dosis de desafío de  $1.87 \times 10^7$  unidades formadoras de colonia (CFUs) de *Photobacterium*.

Experimento 3

30 Un grupo de 8 peces recibe 300µl por pez de antisuero de conejo del segundo sangrado, construido contra la proteína de 55kDa, por inyección i.p.. Un grupo control de 8 peces recibe 300µl por pez de suero de conejo normal. Los peces de cada grupo de prueba se mantienen en tanques independientes. Inmediatamente después de la vacunación, mientras que aún están bajo anestesia, cada pez recibe una dosis de desafío de  $2.24 \times 10^7$  unidades formadoras de colonia (CFUs) de *Photobacterium*.

35 Las primeras mortalidades ocurren el día 1 después del desafío, mientras que la mortalidad final ocurre el día 5. No ocurren otras modalidades por 8 días consecutivos, por lo que la prueba se termina 15 días después de la inmunización y del desafío.

Resultados

40 Si bien esto es solo un estudio a pequeña escala, las indicaciones son que los anticuerpos contra la proteína de 55kDa a partir de ECP de *Ph. damselae* son efectivos en la protección contra un desafío experimental (Tabla 1). El efecto protector se pronuncia, particularmente cuando se considera que las inmunoglobulinas de conejo no son capaces de activar la cascada del complemento en los teleósteos. Adicionalmente, los peces aumentarán una respuesta inmune contra las inmunoglobulinas de conejo, reduciendo los números de anticuerpos y por lo tanto reduciendo además su eficacia. De esta manera, el nivel de protección indicado en este estudio es altamente significativo y hace que la proteína de 55kDa un potencial clave dirigido para el desarrollo de vacunas contra esta enfermedad importante económicamente.

Tabla 1

Experimento	Vacuna	Mortalidad acumulativa (%)	RPS	RPS calculado en relación con:
1	100µl de suero inmune/primer sangrado	63	17	suero normal de conejo control
1	300µl de suero inmune/primer sangrado	38	50	suero normal de conejo control
1	300µl de suero normal	75	-	n/a

2	300µl de suero inmune/primer sangrado	25	50	suero normal de conejo control
2	300µl de suero inmune/Segundo sangrado	0	100	suero normal de conejo control
2	300µl de suero normal	50	-	n/a
3	300µl de suero inmune/Segundo sangrado	13	67	suero normal de conejo control
3	300µl de suero normal	38	-	n/a

#### Ejemplo 4: Vacunación con p55 como cuerpos de inclusión y en ECPs inactivados con formalina

Peces: Lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*) jóvenes que tienen un peso corporal de aproximadamente 25g en el momento de la vacunación se mantienen a  $26 \pm 1$  °C con UV y, cuando sea necesario, agua salada esterilizada con ozono (30%) suministrada a través de un biofiltro en un sistema de recirculación.

Vacunas: Cuerpos de inclusión de p55 - cepa BL21 *E. coli* transformada con el plásmido pETp55 (ver Ejemplo 2) se cultivan durante la noche con agitación (120 rpm) en Caldo de Luria (LB) suplementado con 50µg/ml de canamicina. El cultivo luego se utiliza para inocular (1:100) LB recién preparado suplementado con 50µg/ml de canamicina y cultivado durante 2 horas a 37°C con agitación. Las células se inducen por la adición de IPTG a una concentración final de 0.1 mM y el cultivo continúa por 3 horas como antes. Las células inducidas por IPTG se peletizan por centrifugación (15 min, 5000 rpm), se resuspenden en 10ml de Solución reguladora A (NaPO<sub>4</sub> 10mM pH 7.2, NaCl 0.2M, EDTA 1mM, 1:1000 PMSF a 50 mg/ml, 1:10000 beta-mercaptoetanol) y se somete a ultra sonido 3 veces durante 25 segundos (intervalo de 1 minuto) en hielo. Después de transferir a tubos de Eppendorf (1 ml/tubo) y centrifugación (15 min, 13000g) el sobrenadante se descarta y 1ml de solución reguladora A se adiciona a cada tubo. El pellet luego se resuspende por sonicación en hielo 4 veces durante 10 segundos (intervalo de 1 min) y después de la centrifugación (15 min, 13000g) el sobrenadante se descarta. El pellet se resuspende por la adición de 1ml de solución reguladora B (= Solución reguladora A + 1% de Triton X-100) y la sonicación en hielo 4 veces durante 10 segundos (intervalo de 1 minuto). Después de la centrifugación como antes y de descartar el sobrenadante, el pellet se resuspende en 1ml de Solución reguladora A, por sonicación en hielo 4 veces 10 segundos (intervalo de 1 minuto). Los cuerpos de inclusión se recolectan por centrifugación, se resuspenden como antes en PBS (concentración final de p55 1mg/ml) y se emulsifica 1:1 en adyuvante incompleto de Freund.

ECPs enriquecidos con p55 - productos extracelulares (ECPs) enriquecidos con la proteína de 55kDa (>85%) a partir de *Ph. damselae* subsp. *piscicida* a una fase de crecimiento exponencial media, se preparan como se describe en el Ejemplo 1. Antes de la inmunización, los ECPs se diluyeron a 2pg de proteína/µl y se inactivan por la adición de 0.5% (v/v) de formaldehído (37% de solución de formalina, Sigma) durante 24 horas a 4°C. Cualquier formalina remanente se neutraliza por la adición de 0.04% (v/v) de una solución 2M de tiosulfato de sodio. ECPs enriquecidos con 55kDa, luego se emulsifican 1:1 en adyuvante incompleto de Freund.

Vacunación: Un grupo de 54 peces recibe 50µl de la vacuna de cuerpos de inclusión por pez por inyección i.p.. Un grupo de 43 peces recibe 50µl de vacuna de ECPs enriquecidos con 55kDa por pez de la misma manera. Un grupo control de 42 peces (adyuvante control) recibe 50µl de PBS se emulsifica 1:1 en adyuvante incompleto de Freund por pez por inyección i.p., y otro grupo de 26 peces (control sin inyectar) se deja sin tratar. Los peces de cada grupo de prueba se mantienen en tanques independientes.

Desafío: la misma cepa y el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 se utilizan para preparar el inóculo de desafío excepto que la dosis de desafío es  $5.2 \times 10^6$  CFUs en 50µl por pez. El desafío se realizó 650° D después de la vacunación. Para la confirmación de la muerte el patógeno se vuelve a aislar, a partir del riñón cefálico de peces moribundos y/o muertos mediante el cultivo en TSA-1.

Las primeras mortalidades ocurren el día 2 después del desafío, mientras que la mortalidad final ocurre el día 8. No ocurren otras modalidades durante los 8 días consecutivos, por lo que la prueba se termina 15 días después del desafío.

#### Resultados

Los resultados (mostrados en la Tabla 2) indican claramente que ambas la vacuna de cuerpo de inclusión de p55 y la vacuna de ECP enriquecido con p55 inactivada son efectivas para proteger los peces contra infecciones experimentales con *Ph. damselae*. El hecho que niveles similares de la protección fueran logrados, sugiere que p55, y no cualquier otro contaminante de proteína de *E. coli* o *Ph. damselae*, es el antígeno protector.

Tabla 2

Vacuna	Mortalidad acumulativa (%)	RPS (relativo al adyuvante control)	RPS (relativo al control sin inyectar)
Cuerpos de inclusión p55	24	61	63
ECPs enriquecidos con p55	19	70	72
Adyuvante control	62	n/a	5
Control sin inyectar	65	-6	n/a

**Ejemplo 5: Vacunación con p55 como cuerpos de inclusión para demostrar la protección contra cepas Japanese *Ph. Damselae*.**

5 Peces: Lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*) jóvenes que tienen un peso corporal de aproximadamente 7-10g en el momento de la vacunación se mantienen a  $22\pm 1^\circ\text{C}$  con UV y, cuando sea necesario, agua salada esterilizada con ozono (30%) suministrada a través de un biofiltro en un sistema de recirculación.

10 Vacunas: cuerpos de inclusión de p55 - cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pETp55 (ver Ejemplo 2) se cultivan durante la noche con agitación (120 rpm) en Caldo de Luria (LB) suplementado con 50µg/ml de canamicina. El cultivo luego se utiliza para inocular (1:100) LB recién preparado suplementado con 50µg/ml de canamicina y cultivado durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  con agitación. Las células se inducen por la adición de IPTG a una concentración final de 0.1 mM y el cultivo continúa por 3 horas como antes. Las células inducidas por IPTG se peletizan por centrifugación (15 min, 5000 rpm, SORVAL rotor GS-3), se resuspenden en Solución reguladora A de 20ml por litro de medio de cultivo ( $\text{NaPO}_4$  10mM pH 7.2, NaCl 0.2M, EDTA 1mM, 1:1000 PMSF a 50 mg/ml, 1:10000 beta-mercaptoetanol), transferido a tubos SORVAL SS-34 (10ml/tubo) y se someten a ultra sonido 3 veces durante 15 30 segundos (intervalo de 1 minuto) en hielo. Después de la centrifugación (15 min, 13000g), el sobrenadante se descarta y 10ml de la solución reguladora A, se adicionan a cada tubo. El pellet luego se resuspende por sonicación en hielo 4 veces durante 30 segundos (intervalo de 1 min) y después de la centrifugación (15 min, 13000g) el sobrenadante se descarta. El pellet se resuspende por la adición de 10ml de solución reguladora B (= Solución reguladora A + 1% Triton X-100) y la sonicación en hielo 4 veces durante 30 segundos (intervalo de 1 minuto). 20 Después de la centrifugación como antes y de descartar el sobrenadante, el pellet se resuspende en 1ml de Solución reguladora A por sonicación en hielo 3 veces 30 segundos (intervalo de 1 minuto). Los cuerpos de inclusión se recolectan por centrifugación, se resuspenden como antes en PBS y se almacenan a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. El contenido de p55 de los cuerpos de inclusión se determina por análisis de densitometría de un gel SDS-Page utilizando estándares de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Los cuerpos de inclusión de P55 se diluyeron a la 25 concentración necesaria en PBS y se emulsifica 1:1 en adyuvante incompleto de Freund con el fin de proporcionar una concentración final de aproximadamente 25 microgramos de proteína recombinante de p55/dosis.

30 Vacunación: Existen dos tratamientos, con dos repeticiones (63 más 65 peces, respectivamente) para el grupo vacunado y un grupo único (70 peces) utilizado como control. Cada uno de los peces vacunados recibe 100µl de la vacuna de cuerpos de inclusión por inyección i.p.. Cada uno de los peces control recibe 100µl de PBS emulsificado 1:1 en adyuvante incompleto de Freund por pez por inyección i.p.. Los peces de cada grupo de prueba se mantienen en tanques independientes.

35 Desafío: El inóculo del desafío se prepara como se describe en el Ejemplo 3 pero el *Ph. damselae* utilizado es la cepa PP3 Japanese, y la dosis de desafío es  $5.0 \times 10^3$  CFUs en 100µl por pez. Para la confirmación de la muerte, el patógeno se vuelve a aislar a partir del riñón cefálico de peces moribundos y/o muertos, mediante el cultivo en TSA-1.

Las primeras mortalidades ocurren el día 3 después del desafío, mientras que la mortalidad final ocurre el día 7 (grupo vacunado) y día 11 (grupo control). No ocurren otras modalidades para los 19 días consecutivos, por lo que la prueba se termina 30 días después del desafío.

Resultados

40 Los resultados (mostrados en la Tabla 2) indican claramente que la vacuna de cuerpo de inclusión de p55, es efectiva en proteger los peces contra las infecciones experimentales con la cepa PP3 Japanese de *Ph. damselae*.

Tabla 3

Vacuna	Mortalidad acumulativa (%)	RPS calculado en relación con el Adyuvante control
Cuerpos de inclusión de p55	18	62
Adyuvante control (PBS/FIA)	49	N/A

**REIVINDICACIONES**

1. Una secuencia de aminoácido aislada a partir de *Photobacterium damselae* subsp. *Piscicida*, que comprende la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Una secuencia de aminoácido aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha secuencia comprende la SEQ ID No.2, sin la secuencia señal de aminoácidos 1 a 16, MTAIFSLAINSNFVLA.
3. Una secuencia de ácido nucleico aislada a partir de *Photobacterium damselae* subsp. *Piscicida*, que comprende la SEQ ID NO: 1.
4. Una vacuna que comprende una secuencia de aminoácido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 5. Secuencia de aminoácido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para utilizar como un medicamento.
6. Uso de una secuencia de aminoácido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la pasteurelisis en peces.
- 15 7. Los anticuerpos contruidos contra una secuencia de aminoácido aislada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
8. Un vector de expresión de ADN, que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 3, en donde dicha secuencia de ácido nucleico se liga operativamente a una secuencia reguladora transcripcional.
9. Una célula huésped transformada con el vector de expresión de ADN de la reivindicación 8.
- 20 10. Una vacuna que comprende el vector de expresión de ADN de la reivindicación 8, y un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Uso de una secuencia de aminoácido aislada de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2; o una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 3; o los anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 7, en la fabricación de una prueba para el diagnóstico de la infección con *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* o de la pasteurelisis en peces.
- 25 12. Un kit de prueba de diagnóstico que comprende una secuencia de aminoácido aislada de acuerdo con la reivindicación 1; o una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 3; o los anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 7, fijados a una matriz.

**Figura 1      Secuencia del Ácido Nucleico de p53 (SEQ ID NO:1)**

```
ATGACAGCAATATTTTCTCTAGCCATAAACTCAAATTTTGTGTTAGCGAACCAACGATAA
ACCAGATGCAAGCGATGACAAGTACGCAGACTACGTGGTACGTCTAGGTTTCGGAACATC
CACTAAACCATACTCAGATCATTGAACTTTCCTCTGCAGTATCGAGGGCTGTCCTTCTT
AGTTACCCAAATATAATAGACCGATACACCGCTGCAGCAACTGAATATACGGTGATCGA
TGCTTTATTTTCATTCGCCTACCTTTCGACATATCGTTTCTTTTGGTCTTCATAATCAGC
AAGAGAACCCTTGGTCATATTCGATATACTAATGAATATGAAATTAACAATAATCGCGAA
GATGAGTTCTCCTTAGTGAGCGAGGTAAGCTACGACGATATAAAAAGCTCTAATGCTCA
GCAAGTTCCCCTAGTTGCATTTTATGAAGCGCGAGAGGACCGCGGACGGGCACGCCTA
TCGTAAATATGGGTGTAGCTCCTAGTCTTTTTTCTGGCAGATATAGTTGGTGGCAAGAA
GCATTAATCCATGAAATTGTTTCATCACGTTACAGGCTCTAGTGATACTCATGAAGAAA
TAAGCAAGGGCCTACTGAAATTTTAGCTCAAATGGTCGCGGCGGAACTTCATTGGGCGA
TACCAACCTTTAAAGGATATTCAGATCCTGCGAGGGTTCGAAGCGATACAAGAGCGCGAT
TTCCACTCCTTGTTGAATATGTTCCAGAGACACGGCAGTGAATTAGGCTTTCTGTTTAC
CAGATTAGCTACGATTGCCAAAGGTAAGAAAGCTTCGCCTGACTTCGGCACCCTGACCT
CTTTTTGCTCGGAAGGTATTAGCAGTTTTTCCTAAATATCCCGATCACGATGATGATTTT
AACGGGGGCGGCGCCTTTTTTCTCCCTAGCGCTAGCGCCGACAGTTCAGTTGAATGCAC
TTTTGATGTACTAAATCGAATCGAGCCTGTTGATGACTCAATTAATTTGAAGGGGGGA
ATTTGCTAATTAATAAATGACTTCAAAAACCTAAATTTACGTGTTGCACAGCTTAGCTTT
TTGAACGCAAAAAAAGGTAGCGGATTTTACAGAAAAAATTGGGATTCTTGAAATCCTG
GTATCAAGCTTCTTCATGGAAGAATGGGCTCAATTCGGTCTATATGGGTACGGCCATG
ATGAATCTGAAGGAAACCTCATTATTTCTCCATATGGCATAACCTTCAATGATGGTTCA
TTCTCTATTGGCTTTTCATCGAGAAAGCATATTAATGACAACACGAAGGATGACAATTT
CGTGAAGTTAAATAACGCTAATTGGAGTTCGTTCTACTACGCAGGTCAAATGTTTTTTG
ACAAAACAAAAGACCTGTAGCGCTTGTTATTACGGAGCCTTTAAATGCTGCTTTTGGC
GCAGGATGGTCTTATATTTATAAAGATGGGAAATGGCACTATGAAGCTCAAGACGATTG
GGATCAGCGTCTATTTAAAGATTCGACCTTGTCGTTGGATCCCCACGCGCCACAATTCA
TTAATTAA
```

Figura 2: Secuencia de Aminoácidos de p55 (SEQ ID NO:2)

~~MHTAIFRSIFAINSIQVME~~NNDKPDASDDKYADYVVRLGSEHPLNHTQIIELSSAVSRVLLSYPN  
IIDRYTAAATEYTVIDALFHSPTFRHIVSFGLHNQQENLGHIRYTNEYEINNNREDEFSLVSE  
VSYDDIKSSNAQQVPLVAFYEAREDRATGTPIVNMGVAPSLFSGRYSWWQEALIHEIVHHVTG  
SSDTHEENKQGPTTEILAQMVAELHWAIPTFKGYSDPARVEAIQERDFHSLNMFQRHGSELG  
FLFTRLATIAGKKASPDFGTLTFCSEGISSFPKYPDHDDDFNGGGAFFLPSASADSSVECT  
FDVLNRIEPVDDSIKFEGGNLLIKNDFKNLNLRVAQLSFLNAKKGSGFYRKNWDSWKSQAS  
SWKNGLNGLYGYGHDESEGNLIYSPYGITFNDGSFSIGFSSRKHINDNTKDDNFVKLNNANW  
SSFYAGQMFFDKNKR PVALVITEPLNAAFAGWSYIYKDGKWHYEAQDDWDQRLFKDSTLSL  
DPHAPQFIN-

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

*Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.*

5 Documentos de patentes citadas en la descripción

- WO 0110459 A [0012]
- WO 011045955 A [0012]
- US 5780448 A [0023]

Literatura no-patente citada en la descripción

- 10
- Vale et al. *Fish & Shellfish immunology*, 2003, vol. 15, 129-144 [0016]
  - Goeddel. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*. Academic Press, 1990, vol. 185 [0019]
  - Smith, D. B. ; Johnson, K. S. *Gene*, 1988, vol. 67, 31-40 [0021]
  - Kohler ; Milstein. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0034]