

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 225**

51 Int. Cl.:

C07K 14/08 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2011 PCT/EP2011/056090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11131600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2011 E 11718312 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2560985**

54 Título: **Secuencias de ácido nucleico de un virus de pece y el uso de las mismas**

30 Prioridad:

15.10.2010 NO 20101550

21.04.2010 NO 20100571

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.10.2016

73 Titular/es:

PHARMAQ AS (100.0%)

Harbitzalléen 5

0275 Oslo, NO

72 Inventor/es:

HAUGLAND, ØYVIND;

MIKALSEN, AASE BEATHE;

EVENSEN, ØYSTEIN;

NILSEN, PÅL;

LINDMO, KARINE y

RODE, MARIT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 588 225 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 ácido nucleico de un virus de pece y el uso de las mismas

5 La presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico que se originan a partir de un virus que causa el síndrome de la cardiomiopatía (SCM) en peces y el uso de las mismas en inmunología y diagnóstico veterinario. Más específicamente, la invención proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas y el uso de las mismas en, ente otras cosas, vacunas recombinantes, vacunas de ADN y en proporcionar una vacuna viva recombinante. Las secuencias codificantes de proteínas también son útiles respecto del desarrollo de procedimientos que proporcionan determinación inmunológica de la infección por el virus del SCM. La invención por lo tanto se refiere también a anticuerpos, y al uso de los mismos en inmunoensayos.

10 La presente invención se refiere también a cebadores útiles en procedimientos para la detección del virus del SCM en una muestra de ensayo.

Finalmente, la presente invención proporciona kit de diagnóstico que comprenden proteínas recombinantes, anticuerpos y cebadores, respectivamente.

Antecedentes de la invención

15 El síndrome de la cardiomiopatía (SCM) es una enfermedad que afecta principalmente al gran salmón atlántico en el segundo año en agua marina próximo a su captura y por lo tanto, el impacto económico es significativo. Los peces afectados pueden fallecer repentinamente sin mostrar signos de enfermedad o pueden mostrar síntomas tales como un comportamiento de natación anormal y anorexia. El SCM se diagnostica basándose en la histopatología, que muestra una inflamación y degeneración grave del miocardio esponjoso en la aurícula y el ventrículo. Un posible efecto secundario de la alteración circulatoria es la necrosis hepática multifocal que se observa comúnmente.

20 La causa del SCM ha sido desconocida durante mucho tiempo. Aunque se comunicaron inclusiones intracelulares y partículas similares a virus, los informes no fueron consistentes según se evidenció por una revisión proporcionada en Kongtorp y col. *Cardiomyopathy syndrome (CMS): a literature review*, National Veterinary Institute, Noruega, noviembre de 2005. En 1997 Grotmol y col. comunicaron la presencia de partículas similares a nodavirus en las células endoteliales en el corazón de salmones atlánticos a los que se había diagnosticado que padecían SCM. Las partículas tenían un diámetro de 25 nm (Grotmol y col., 1997, *Dis Aquat Org*, vol 29, págs. 79-84).

25 Se ha comunicado la transmisión experimental del síndrome de la cardiomiopatía en el salmón atlántico, *Salmo salar*, véase Bruno y Noguera, *Disease of Aquatic Organism*, vol. 87: 235-242, 2009 y Fritsvold y col., *Disease of Aquatic Organism*, vol 87: 225-234, 2009.

30 Finalmente, se demostró la naturaleza infecciosa del SCM mediante el aislamiento y cultivo de un virus que causa el SCM en peces, según se comunicó en la solicitud de patente de Noruega NO 2008 2869. En particular, el documento NO 2008 2869 desvela un virus aislado que se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Agencia de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury, Wiltshire (RU), SP4 0JG UK el 29 de marzo de 2007 con el número de referencia 07032902.

35 El virus desvelado en la solicitud de patente de Noruega anteriormente mencionada puede tener la capacidad de introducir uno o más síntomas seleccionados entre el grupo que consiste en: hemorragias cutáneas, escamas levantadas, exoftalmos, ascitis, proyección fibrinosa sobre la cápsula hepática, sangre o coágulos de sangre que rellenan la cavidad pericárdica, roturas en la pared auricular cardíaca, dilatación de la aurícula cardíaca, compresión del ventrículo cardíaco, inflamación del miocardio esponjoso en el epicardio y endocardio, lesiones hepáticas, incluyendo necrosis multifocal a anastomosante de los hepatocitos y un recubrimiento fibrinoso de la cápsula y congestión del bazo y/o de las agallas.

40 Se ha proporcionado un entendimiento adicional del agente causante del SCM mediante el aislamiento y cultivo del virus del SCM desvelado en el documento NO 2008 2869. Las células hospedadoras para el cultivo del virus del SCM desveladas en el documento NO 2008 2869 han demostrado que dan como resultado una baja producción del virus del SCM. Sigue habiendo una necesidad de un conocimiento adicional para ser capaces de desarrollar medios eficaces para controlar la enfermedad y para ser capaces de desarrollar vacunas eficaces, tales como vacunas recombinantes. Aunque el virus se aisló de manera exitosa y se conocen células hospedadoras para el cultivo del mismo a partir del documento NO 2008 2869, ha sido difícil la identificación adicional y la provisión de conocimiento del genoma y la secuencia del mismo debido a las características inesperadas del genoma y a la organización del mismo.

45 Por lo tanto es un objeto de la presente invención proporcionar secuencias de ácido nucleico que se originan a partir del virus del SCM. Al proporcionar las secuencias de ácido nucleico de la presente invención, se proporcionan varias aplicaciones útiles de las mismas, tal como se indica a continuación.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona, por tanto, una secuencia de ácido nucleico aislada que se origina a partir del virus del SCM que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 basándose en la longitud de secuencia completa de dicha secuencia de ácido nucleico aislada.

10 De acuerdo con un aspecto, las secuencias de ácido nucleico de la invención son al menos un 80 %, preferentemente un 90 %, más preferentemente un 95 % idénticas al ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 basándose en la longitud de secuencia completa de dicha secuencia de ácido nucleico aislada.

Otro aspecto de la invención se refiere a un vector que comprende secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y células hospedadoras que comprenden dicho vector.

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan vectores que comprenden ácidos nucleicos seleccionados entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 6 basándose en la longitud de secuencia completa de dicha secuencia de ácido nucleico aislada que está unida operablemente a secuencias de control que dirigen la expresión de dichas secuencias.

20 De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporcionan vacunas de ADN que comprenden una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 6 basándose en la longitud de secuencia completa de dicha secuencia de ácido nucleico aislada.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a proteínas recombinantes codificadas por una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 6 basándose en la longitud de secuencia completa de dicha secuencia de ácido nucleico aislada. Dichas proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención tienen de acuerdo con un aspecto de la invención una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7, o una variante de las mismas que sea al menos un 70 % idéntica a cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7 basándose en la longitud de secuencia completa de dicha secuencia de ácido nucleico.

30 La presente invención también proporciona una vacuna recombinante que comprende la menos una de las proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención.

Además, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo que reconoce y se une a una proteína recombinante de acuerdo con la presente invención. El anticuerpo es, de acuerdo con un aspecto, un anticuerpo monoclonal. De acuerdo con otro aspecto, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo policlonal.

35 De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un inmunoensayo para la detección del virus del SCM con un anticuerpo específico contra el virus del SCM en una muestra biológica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto al menos una de las proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención y una muestra biológica que se sospecha que contiene anticuerpos contra un virus del SCM; y
- 40 (b) determinar si la al menos una proteína recombinante se une a un anticuerpo específico para el virus del SCM presente en la muestra biológica, en el que dicha unión representa una indicación de que el animal ha estado en contacto con el virus del SCM.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un inmunoensayo para la detección del virus del SCM en una muestra biológica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 45 (a) poner en contacto uno o más anticuerpos que reconocen específicamente y se unen a una proteína recombinante de acuerdo con la invención y una muestra biológica que se sospecha que comprende un virus del SCM; y
- (b) determinar si el anticuerpo se une al virus del SCM presente en la muestra biológica, en el que dicha unión representa una indicación de que la muestra contiene un virus del SCM.

50 La presente invención también proporciona, de acuerdo con otro aspecto, un cebador que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 10 nucleótidos, en el que dicho cebador hibrida con una secuencia de ácido nucleico que se origina a partir del virus del SCM que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 y variantes o fragmentos de las mismas que son al menos un 70 % idénticas con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 basándose en

la longitud de secuencia completa de dicha secuencia. El cebador de acuerdo con la presente invención puede consistir, de acuerdo con un aspecto, en al menos 15 nucleótidos, preferentemente al menos 20 nucleótidos.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un procedimiento para la detección del virus del SCM en una muestra biológica, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 5 a) preparar una muestra biológica que comprende secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de una muestra biológica que se sospecha que comprende virus del SCM para una reacción de transcripción inversa con un cebador específico o aleatorio;
- 10 b) someter a la mezcla de a) a reacción en cadena de la polimerasa con un par de cebadores específicos para la secuencia de ácido nucleico retrotranscrita correspondiente a la secuencia genómica del virus, en el que cada cebador de dicho par de cebadores hibrida con una secuencia de ácido nucleico que se origina a partir del virus del SCM que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 basándose en la longitud de secuencia completa de dicha secuencia; y
- 15 c) determinar si se ha producido la unión de los cebadores a secuencias de ácido nucleico en la muestra y la amplificación de la secuencia entre ellas indicando la presencia de virus del SCM en la muestra ensayada.

De acuerdo con un aspecto del procedimiento anterior, cada cebador del par de cebadores se selecciona entre un grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

Finalmente, la presente invención se refiere al uso de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la preparación de una vacuna de ADN, una vacuna recombinante o un microorganismo vivo recombinante.

Breve descripción de las figuras

- 25 La figura 1 desvela la secuencia genómica del virus del SCM correspondiente a la SEQ ID NO: 1.
- La figura 2 desvela la secuencia de ácido nucleico de la fase abierta de lectura 1 correspondiente a la SEQ ID NO: 2. La fase de lectura abierta 1 comprende la secuencia que comienza en el nucleótido en la posición 445 y que codifica hasta la posición de nucleótido 3028 de la SEQ ID NO: 1.
- 30 La figura 3 desvela la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia ilustrada en la figura 2, es decir, la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 3.
- La figura 4 desvela la secuencia de ácido nucleico de la fase abierta de lectura 2 correspondiente a la SEQ ID NO: 4. La fase de lectura abierta 2 comprende la secuencia que comienza en el nucleótido en la posición 3114 y que codifica hasta la posición de nucleótido 5292 de la SEQ ID NO: 1.
- 35 La figura 5 desvela la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia ilustrada en la figura 4, es decir, la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 5.
- La figura 6 desvela la secuencia de ácido nucleico de la fase abierta de lectura 3 correspondiente a la SEQ ID NO: 6. La fase de lectura abierta 3 comprende la secuencia que comienza en el nucleótido en la posición 5542 y que codifica hasta la posición de nucleótido 6448 de la SEQ ID NO: 1.
- 40 La figura 7 desvela la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia ilustrada en la figura 6, es decir, la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 7.
- La figura 8 muestra gráficamente la organización genómica del virus de la miocarditis piscina (VMCP). El genoma incluye tres fases de lectura abiertas (ORF). Las ORF1 y ORF2 predichas se asemejan a dos fases abiertas de lectura solapantes. La ORF2 se traduce en forma de una proteína de fusión con la ORF1 debido a un desplazamiento de fase de -1 ribosómico o en forma de una proteína individual (se indica el codón de inicio). La ORF3 es una fase no solapante.
- 45 La figura 9 muestra proteínas recombinantes codificadas por la ORF1 y la ORF3 y expresadas en *E. coli* separadas mediante electroforesis en gel. La figura 9A muestra la expresión de la ORF-1 y una ORF1 parcial (nucleótidos 1-852) en *E. coli*. La ORF1 (1-852) se expresa en forma de una proteína de aproximadamente 30 kD (carriles 3 y 4), mientras que la proteína de longitud completa es de aproximadamente 90 kD (carriles 6 y 7). Los carriles 2 y 5 son las fracciones de proteína soluble del fermentado. Se hace correr una escala de tamaño de proteína en el carril 1. La figura 9B muestra a expresión de la ORF3. La ORF3 se expresa en forma de una proteína de aproximadamente 30 kD (carriles 3 y 4). El carril 2 es la fracción de proteína soluble. Se hace correr una escala de tamaño de proteína en el carril 1.
- 50

La figura 10 es una transferencia de Western que muestra que un antisuero provocado contra la proteína recombinante de la ORF1 producida en *E. coli* reconoce una banda correspondiente a la proteína de la ORF1 en homogenizado de corazón de salmón atlántico diagnosticado de SCM (carril 2). No se reconoce una banda de este tamaño en homogenizado de corazón de un salmón atlántico sano (carril 3). Se hace correr una escala de tamaño de proteína en el carril 1.

La figura 11 está formada por transferencias de Western que muestran la unión de la ORF3 con suero de salmón atlántico de peces diagnosticados de SCM (A, panel izquierdo). El suero de control de salmón atlántico sano (B, panel derecho) no muestra unión a la ORF3. Es visible cierta unión inespecífica a una proteína de aproximadamente 10-15 kD.

La figura 12 representa una representación de dos variables que muestra la relación entre la puntuación histológica de la parte esponjosa del ventrículo cardíaco y la carga vírica (expresada como valores de Cp) en tejido cardíaco para la muestra 1 (n = 40).

La presente invención y las diversas realizaciones de la misma se describirán en detalle a continuación.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico aisladas y a variantes o fragmentos de las mismas que son al menos un 70 % idénticas a las secuencias de ácido nucleico aisladas. Debe entenderse que la expresión "% de identidad" hace referencia al porcentaje de nucleótidos contenidos que son iguales en dos o más secuencias o fragmentos de las mismas. Un porcentaje de nucleótidos puede citarse como, por ejemplo, un 70 % idéntico, 80 % idéntico, 85 % idéntico, 90 % idéntico, 95 % idéntico, 99 % idéntico o más a lo largo de una región específica cuando se compara y alinea para máxima correspondencia. El experto en la materia reconocerá que hay disponibles diversos medios para comparar secuencias. Por ejemplo, un ejemplo no limitante de un programa informático para homología útil para determinar el porcentaje de homología entre secuencias incluye el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul y col., 1990, *J. of Molec. Biol.*, 215:403-410, "The BLAST Algorithm; Altschul y col., 1997, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, Karlin y Altschul 1990, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:2264-68; 1993, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:5873-77).

Debe entenderse que la expresión "fragmentos o variantes de las mismas" usada respecto de las secuencias de ácido nucleico y proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención abarca secuencias de ácido nucleico y proteínas recombinantes que difieren respecto de las secuencias aisladas de las SEQ ID NO: 1-7 en únicamente algunas adiciones, eliminaciones o alteraciones de aminoácidos o nucleótidos que tienen poco efecto, en caso de tenerlo, en la actividad funcional de las secuencias reivindicadas. El experto en la materia reconocerá que pueden introducirse modificaciones de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que no alteren la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, la sustitución de un nucleótido que de como resultado que el triplete afectado por la sustitución siga codificando el mismo aminoácido. Pueden introducirse dichas alteraciones para adaptar la secuencia de ácido nucleico a los codones usados preferentemente por una célula hospedadora y de este modo potenciar la expresión de una proteína recombinante deseada. Además, puede añadirse la adición de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos que facilitan la purificación sin afectar a la actividad de la proteína recombinante resultante.

El experto en la materia reconocerá además que asimismo, las alteraciones de la secuencia de ácido nucleico que dan como resultado modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante que codifica pueden tener poco efecto, en caso de tenerlo, en la capacidad de la proteína para inducir protección contra el virus del SCM si la alteración no tiene impacto en la estructura tridimensional resultante de la proteína recombinante. Por ejemplo, puede sustituirse un codón para el aminoácido alanina, un aminoácido hidrófobo, por un codón que codifica otro resto menos hidrófobo, tal como glicina, o un resto más hidrófobo, tal como valina, leucina o isoleucina. De igual forma, también puede esperarse que los cambios que dan como resultado la sustitución de un resto cargado negativamente, tal como ácido aspártico por ácido glutámico o un resto cargado positivamente por otro, tal como lisina por arginina produzcan una proteína recombinante con sustancialmente la misma actividad funcional que la proteína que tiene las secuencias de aminoácidos ilustradas en las SEQ ID NO: 3, 5 y 7 y por lo tanto esperarse que constituyan un producto biológicamente equivalente. Tampoco debe esperarse que los cambios de nucleótidos que den como resultado la alteración de las partes N-terminal o C-terminal de la molécula de proteína alteren la actividad funcional de la proteína. Cada una de las modificaciones propuestas se encuentra dentro de las capacidades rutinarias de la técnica, tales como la determinación o retención de la actividad biológica de los productos codificados. Por lo tanto, en los casos donde se usan las expresiones "secuencias de ácido nucleico de la invención" o "proteína recombinante de la invención" ya sea en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones debe entenderse que abarcan todas estas modificaciones y variaciones que dan como resultado la producción de una proteína biológicamente equivalente.

Por lo tanto, la presente invención abarca proteínas recombinantes y fragmentos de la misma que difieren en sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos respecto de las proteínas recombinantes que tienen las

secuencias de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 7, respectivamente, pero que ejercen sustancialmente la misma actividad funcional que las proteínas que tienen la secuencia de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 7.

5 Debe entenderse que las expresiones y términos "antígeno", "proteína o péptido inmunogénico", "determinante antigénico" o "epítipo", cuando se usan en relación a la presente invención se refieren a una proteína recombinante o fragmento de la misma de acuerdo con la invención que es capaz de inducir protección contra el SCM en peces o que es capaz de unirse a un anticuerpo que reconoce y se une al virus del SCM. Un fragmento de una proteína recombinante que tiene una secuencia ilustrada en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7, respectivamente, puede constituir dicho antígeno o epítipo. Un ejemplo no limitante de un fragmento de la presente
10 invención es, por ejemplo, un fragmento formado por, por ejemplo, 8-11 aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7.

El término "vacuna", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material que puede producir una respuesta inmunitaria que bloquea la infectividad, ya sea parcial o completamente, de un agente infeccioso, que con respecto a la presente invención es el virus del síndrome de la cardiomiopatía que afecta a peces, tales como, por ejemplo, los salmónidos. Por lo tanto, cuando se administran a un pez las vacunas de la invención, este se inmuniza contra la enfermedad causada por el virus del SCM. El componente inmunizante de la vacuna puede ser, por ejemplo, ADN como en una vacuna de ADN, una proteína recombinante o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención o un microorganismo vivo recombinante.

Tal como se indica a continuación, la presente invención también proporciona cebadores (es decir, secuencias de oligonucleótidos) útiles en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa para su uso como herramientas diagnósticas. El término "cebador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido bien de origen natural (por ejemplo, en forma de un fragmento de restricción) o producido sintéticamente que es significativamente complementario a una secuencia diana del virus del SCM y por lo tanto es capaz de hibridar con secuencias de ácido nucleico de la presente invención. El cebador puede estar marcado para facilitar la detección, por ejemplo, usando marcadores fluorescentes u otros medios de marcado bien conocidos por los expertos en la materia.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

Secuencias de ácido nucleico

Los presentes inventores han proporcionado las secuencias genómicas del virus del SCM. Se infectaron células GF-1 con homogenizado obtenido a partir de salmón que se sospechaba que estaba infectado con el virus del SCM. Se recogió el sobrenadante de cultivo, se sedimentó mediante centrifugación y se sometió a tratamiento de DNasa y RNasa. Se aisló el ARN y se sintetizó ADNc usando cebadores aleatorios. A continuación, se proporcionó ADN bicatenario y se amplificó mediante la PCR usando cebadores aleatorios y se secuenciaron y analizaron los productos obtenidos para obtener parte de la secuencia genómica de acuerdo con la presente invención ilustrada en la figura 1 y en la SEQ ID NO: 1. La secuencia del resto del genoma se obtuvo mediante la PCR con cebadores específicos y RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*, amplificación rápida de extremos de ADNc) 3' y 5'.

El análisis adicional de la SEQ ID NO: 1 por los presentes inventores reveló tres fases de lectura abiertas que se cree que incluyen la región codificante para tres proteínas víricas. Las comparaciones de secuencia con otras secuencias víricas conocidas ha revelado que la fase abierta de lectura 1 (SEQ ID NO: 2) de acuerdo con la presente invención muestra una homología muy débil con otras secuencias víricas. Además, El análisis de la fase abierta de lectura 1 (SEQ ID NO: 3) indica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la envuelta. La secuencia de aminoácidos de la fase abierta de lectura 1 se muestra en la figura 3 y en la SEQ ID NO: 3. Dicha secuencia muestra una homología únicamente débil con otras proteínas conocidas. (Poilos y col., 2006, Jour. General Virology, 87, 987-996, Tang y col., 2008, PNAS, 105:45, 17526-17531).

Una secuencia de ácido nucleico aislada adicional de la invención (fase abierta de lectura 2, SEQ ID NO: 4) comprende una secuencia que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN y la secuencia de aminoácidos de la misma se ilustra en la figura 5 y en la SEQ ID NO: 5. La comparación con otras secuencias codificantes de polimerasas víricas conocidas demuestra que esta secuencia es débilmente idéntica a una polimerasa de totivirus, en particular, a una de *Giardia lamblia virus* que pertenece a los Totiviridae cuando se lleva a cabo una búsqueda de homología con el programa BLAST (n.º de referencia AAB01579).

La tercera fase abierta de lectura (SEQ ID NO: 6) de la invención comprende una secuencia que se cree que también incluye la secuencia codificante de una proteína de envuelta, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en la figura 6/SEQ ID NO: 6. Sorprendentemente, dicha secuencia solo muestra una homología débil con otras proteínas de envuelta vírica y ningún otro miembro de la familia Totiviridae comprende esta fase abierta de lectura concreta. (Poilos y col., 2006, Jour. General Virology, 87, 987-996).

Al proporcionar las secuencias anteriores, se logra un progreso adicional respecto del control y prevención del síndrome de la cardiomiopatía en peces. Las secuencias de las fases abiertas de lectura 1 y/o 3 (SEQ ID NO: 2 y 6) puede conformar la base para el desarrollo de proteínas recombinantes para su uso en una vacuna, o el desarrollo

de vacunas de ADN o de un microorganismo vivo recombinante.

Las proteínas recombinantes codificadas por secuencias basadas en las fases abiertas de lectura 1 y 3 también pueden formar la base para el desarrollo de herramientas diagnósticas, es decir, mediante la producción de anticuerpos y el desarrollo de inmunoensayos para la detección de la presencia del virus del SCM en muestras biológicas.

Finalmente, las secuencias proporcionadas pueden formar la base para el desarrollo de herramientas diagnósticas en las que las secuencias de ácido nucleico o los fragmentos de las mismas se usan para detectar la presencia del virus del SCM en peces.

Las diversas realizaciones de la invención que son el resultado de proporcionar las secuencias de ácido nucleico de la invención se indican adicionalmente a continuación. El experto en la materia reconocerá que dichas realizaciones no deben entenderse como limitantes del ámbito de las secuencias de ácido nucleico reivindicadas. Se entiende que están cubiertos por el ámbito de la presente invención otros usos de las secuencias de ácido nucleico reivindicadas.

Proteínas recombinantes

De acuerdo con un aspecto de la invención, la invención proporciona proteínas recombinantes del virus de la cardiomiopatía.

El experto en la materia está familiarizado con las diversas técnicas biotecnológicas disponibles que proporcionan la expresión de secuencias de ácido nucleico aisladas para la preparación de proteínas recombinantes mediante expresión heteróloga en diversos sistemas de células hospedadoras que usan técnicas de ingeniería genética comúnmente disponibles y sistemas de expresión de ADN recombinante. Se conocen diversos protocolos para la expresión de proteínas recombinantes, véase, por ejemplo, "Recombinant Gene Expression Protocols, en Methods in Molecular Biology, 1997, Ed. Rocky S Tuan, Human Press (ISSN 1064-3745) o Sambrook y col., Molecular Cloning: A laboratory Manual (tercera edición), 2001, CSHL Press, (ISBN 978-087969577-4). Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico de las fases abiertas de lectura 1 y 3 o fragmentos o variantes de las mismas pueden insertarse en vectores de expresión adecuados que comprenden todas las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales necesarias adaptadas específicamente para dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico codificante de la proteína en una célula hospedadora adecuada. Los vectores de expresión adecuados son, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, virus o cromosomas de levadura artificiales (YAC). Una lista no limitante de ejemplos de sistemas de vector de expresión adecuados es, por ejemplo, los vectores de tipo pET (disponibles a través de Invitrogen), vectores pcDNA3.1 (disponibles a través de Invitrogen), o los vectores de expresión de tipo pBR, pUC o pGEM. Entonces se introduce el vector de expresión obtenido que incluye las fases abiertas de lectura (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6) o un fragmento de las mismas en células hospedadoras adecuadas para la producción de la proteína recombinante deseada.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un vector que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, y variantes o fragmentos de las mismas que son al menos un 70 % idénticas con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 6 unidas operablemente a secuencias de control que dirigen la expresión de dichas secuencias. La expresión "unida operablemente" significa que la secuencia deseada que codifica una proteína recombinante está unida a todas las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales necesarias adaptadas específicamente para dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico codificante de proteína deseada en una célula hospedadora.

Debe entenderse que pueden introducirse diversas modificaciones en las secuencias de ácido nucleico de la presente invención utilizando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia, por ejemplo, para facilitar la expresión. Mediante el uso de mutagénesis de sitio dirigido o de síntesis, puede introducirse una modificación para adaptar la secuencia codificante al hospedador deseado para que exprese la secuencia y de este modo produzca la proteína recombinante. El experto en la materia es consciente del hecho de que la presencia de codones específicos para el hospedador y de que la adaptación de una secuencia de ácido nucleico heteróloga para los codones específicos del hospedador aumenta la eficacia de la expresión. También pueden introducirse otras modificaciones, por ejemplo, para facilitar el aislamiento y la purificación, es decir, añadiendo una secuencia que codifica un péptido o proteína útil para dichos fines. Asimismo, también pueden unirse secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos de señal que posibilitan la secreción de la proteína recombinante deseada por la célula hospedadora a secuencias de ácido nucleico de la presente invención. En caso de que la proteína recombinante se exprese en un microorganismo vivo recombinante (véase más adelante), puede modificarse la secuencia de ácido nucleico para permitir el anclaje de la proteína recombinante en la membrana o pared celular del microorganismo, dando como resultado la presentación de la proteína recombinante sobre la superficie del microorganismo vivo recombinante. De acuerdo con dicha realización de la invención, se modifica la secuencia de ácido nucleico de la presente invención añadiendo una secuencia que codifica una proteína o péptido que da como resultado el anclaje de la proteína recombinante resultante en la membrana o la pared celular del microorganismo vivo recombinante.

La presente invención proporciona, por lo tanto, vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico ilustrada en la figura 2 y/o 6 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6) o variantes o fragmentos de las mismas. La presente invención

también proporciona células hospedadoras que comprenden los vectores de la invención.

Pueden usarse varias células hospedadoras disponibles comercialmente adaptadas específicamente a la producción de proteínas recombinantes que son tanto células hospedadoras procariontas como células hospedadoras eucariotas. Los ejemplos no limitantes de células procariontas adecuadas son, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus sp*, *Caulobacter crescentus*, *Yersinia ruckeri*, o *Vibrio anguillarum*. Los ejemplos no limitantes de células eucariotas adecuadas son, por ejemplo, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o células de ovario de hámster chino. También pueden usarse virus para la producir la expresión recombinante de una proteína deseada, véanse, por ejemplo, los sistemas de vector de alfavirus, adenovirus o baculovirus (sistemas de expresión de baculovirus Bac-to-Bac®, Invitrogen, sistema de expresión en levadura PichiaPink™, Invitrogen).

10 De acuerdo con una realización de la invención, se usa un vector pET disponible a través de Invitrogen y adaptado específicamente para la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

También puede proporcionarse una proteína recombinante usando sistemas de expresión sin células. Pueden usarse proteínas recombinantes que sean el resultado de la expresión de las fases abiertas de lectura 1 o 3 (SEQ ID NO: 2 o 6) o fragmentos o combinaciones de las mismas en una vacuna para obtener protección contra infecciones adicionales por virus CMV.

15

Composición de vacuna recombinante

Pueden usarse proteínas recombinantes preparadas mediante expresión heteróloga de secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención como componentes inmunogénicos de una composición de vacuna recombinante.

20 La presente invención proporciona, por lo tanto, una composición de vacuna que comprende al menos una proteína recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos como la ilustrada en la figura 3 o la figura 7 (SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7), o fragmentos o variantes de la misma.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la al menos una proteína recombinante usada en una vacuna consiste en un fragmento de la proteína de la envuelta codificada por las secuencias de las fases abiertas de lectura 1 o 3 que inducen una respuesta inmunitaria en el individuo al que se administra la vacuna recombinante de la invención. Dichos fragmentos pueden formar un epítipo de la proteína de la envuelta codificada por las fases abiertas de lectura 1 o 3, también conocido como un *determinante antigénico*. El experto en la materia está familiarizado con el hecho de que las proteínas de la envuelta de un virus pueden comprender uno o más epítopos que forman parte de la proteína de la envuelta que son reconocidos por el sistema inmunitario y por lo tanto dan como resultado el desarrollo de protección contra infecciones adicionales. Los epítopos pueden encontrarse como una secuencia lineal continua de aminoácidos, tal como de 8-11 aminoácidos, en una proteína de la envuelta u otra estructura de la superficie de un organismo patógeno. Dicho epítipo se denomina comúnmente epítipo lineal. Un epítipo de una proteína de la envuelta puede ser también el resultado de una estructura tridimensional de la proteína de la envuelta, por ejemplo, formado por el ensamblaje de aminoácidos de la secuencia que no son consecutivos. Dichos epítopos se denominan comúnmente epítopos discontinuos, y a menudo son mayores que un epítipo lineal.

Los epítopos lineales y continuos comprendidos en las fases abiertas de lectura 1 y 3 de la invención pueden determinarse mediante el uso de tecnologías de mapeo epitópico disponibles para los expertos en la materia, véase, *Methods in Molecular Biology: Epitope Mapping Protocols*, 1996, vol. 66, Ed. Glenn E Morris, Human Press (ISBN 978-0-89603-375-7). Debe entenderse que las vacunas que comprenden proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención que están formadas por epítopos protectores de las proteínas de la envuelta del virus del SCM preparadas mediante la expresión de fragmentos de las fases abiertas de lectura 1 o 3 o variantes o fragmentos de las mismas, están abarcadas por el ámbito de la presente invención. Más específicamente, son particularmente interesantes los epítopos que son reconocidos por anticuerpos neutralizantes.

Se prefieren los epítopos que se encuentran en aquellas partes de las proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención que son particularmente específicos para el virus del SCM.

La composición de vacuna recombinante de acuerdo con la invención que comprende proteínas recombinantes o fragmentos de las mismas tal como se ha indicado anteriormente puede comprender además un adyuvante. Los ejemplos de adyuvantes usados frecuentemente en peces y en la cría de moluscos son dipéptidos de muramilo, lipopolisacáridos, varios glucanos y glicanos, aceite mineral, Montanide™ y Carbopol®. Se proporciona una descripción general extensiva de adyuvantes útiles para vacunas para peces y moluscos en el artículo de revisión de Jan Raa, 1996, *Reviews in Fisheries Science* 4(3): 229-228.

La vacuna de la invención puede comprender además un transportador farmacéutico adecuado. En una realización actualmente preferida, la vacuna se formula como una emulsión de agua en aceite. La vacuna puede comprender además lo que se denomina un "vehículo". Un vehículo es un dispositivo al que se adhiere el antígeno, sin unirse covalentemente a este. Dichos vehículos son, entre otras cosas, nano/micropartículas o cápsulas de PLGA (ácido poli-láctida-co-glicólico), alginato o quitosano, liposomas, niosomas, micelas, múltiples emulsiones y macrosoles, todos conocidos en la técnica. Una forma especial de dicho vehículo, en la que el antígeno está parcialmente

55

incluido en el vehículo, es el denominado ISCOM (Patentes Europeas EP 109.942, EP 180.564 y EP 242.380).

Además, la vacuna puede comprender uno o más compuestos tensioactivos o emulsionantes adecuados, por ejemplo, Cremophore®, Tween® y Span®. También pueden usarse adyuvantes tales como interleucina, CpG y glicoproteínas.

- 5 Debe entenderse que la vacuna puede estar además en una formulación que comprende un antígeno de una fuente bacteriana, un material antigénico obtenido a partir de una fuente vírica distinta del virus de peces como se ha definido anteriormente, un material antigénico obtenido a partir de una fuente parasítica y/o un material antigénico obtenido a partir de una fuente fúngica. Se conocen en la técnica vacunas polivalentes que contienen antígenos de patógenos de peces típicos distintos del virus del SCM y ya están disponibles comercialmente. Además, hay
10 disponibles a través de diversas fuentes aislados representativos de patógenos de peces relevantes.

En realizaciones particulares de la invención, dicho antígeno procedente de una fuente bacteriana se selecciona entre el grupo que consiste en: bacterias vivas, atenuadas o muertas de las especies *Piscirickettsias sp.*,
15 *Aeromonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Listonella sp.*, *Moritella viscosa*, *Photobacterium damsela*, *Flavobacterium sp.*, *Yersinia sp.*, *Renibacterium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Pediococcus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Francisella sp.*, *Pseardomonas sp.*, *Cytophaga sp.*, *Nocardia sp.*, *Mycobacterium sp.*, partes o subunidades de estas bacterias y cualquier combinación de las mismas.

Hay disponibles aislados de dichas bacterias, por ejemplo, a través de LGC Promochem/repositorio y centro de distribución de la ATCC, American Type Culture Collection, incluyendo cepas de *A. salmonicida* (ATCC 33658), *V. salmonicida* (ATCC 43839), *V. anguillarum* serotipo O1 (ATCC 43305) y O2 (ATCC 19264), y *Moritella viscosa* (ATCC BAA-105). Además, se han depositado cultivos de *Piscirickettsias salmonis* en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Agencia de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury, Wiltshire (RU), SP4 OJG
20 UK el 9 de junio de 2006 con los siguientes números de registro: 06050901, 06050902, 06050903 y 07032110.

Otra realización específica se refiere a una vacuna, en la que dicho material antigénico obtenido a partir de una fuente vírica distinta del virus de peces definido anteriormente es de un virus seleccionado entre el grupo que
25 consiste en: virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV), virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), viremia primaveral de la carpa (VPC), virus del bagre de canal (VPGC), virus de la anemia del salmón infecciosa (VASI), virus de la enfermedad pancreática (VEPS), Iridovirus, y el virus de la inflamación del corazón y el músculo esquelético (VICME), partes o subunidades de uno cualquiera de estos virus, y combinaciones de los mismos. Hay
30 disponibles especies representativas de dichos virus para los expertos en la materia, por ejemplo, a través de los siguientes depósitos: virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI, ATCC VR-1318, país de origen: desconocido), virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV, ATCC VR_1389, país de origen: Dinamarca); virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI, ATCC VR-1392, país de origen: EE.UU.); virus de la necrosis pancreática; viremia primaveral de la carpa (VPC, ATCC VR-1390, país de origen: Dinamarca); virus del bagre de canal (VPGC) (ATCC VR-665, país de origen: EE.UU.); virus de la anemia del salmón infecciosa (ASI) (ATCC VR-
35 1554, país de origen: Canadá).

Anteriormente, se han efectuado depósitos de patente por los presentes solicitantes acerca de las siguientes especies víricas: virus de la inflamación del corazón y el músculo esquelético (VICME, depósito de patente n.º ECACC 04050401, país de origen: Noruega).

40 En realizaciones más específicas, dicho material antigénico obtenido a partir de una fuente vírica distinta del virus de peces definido anteriormente es del grupo que consiste en: glucoproteína del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV), nucleoproteína del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV), glucoproteína del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), proteínas estructurales del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), proteína G de la viremia primaveral de la carpa (VPC), y una proteína asociada a membrana, tegumina o
45 proteína de la cápside o glucoproteína del virus del bagre de canal (VPGC), fragmentos antigénicos de una cualquiera de estas proteínas y combinaciones de las mismas.

En otras realizaciones, dicho material antigénico de una fuente parasítica es de una fuente seleccionada entre el grupo que consiste en *Lepeophtheirus Sp.*, *Caligus Sp.*, y *Ichthyophthirius Sp.*, partes de uno cualquiera de estos parásitos, y combinaciones de los mismos.

50 En otras realizaciones más, dicho material antigénico es de una fuente fúngica seleccionada entre el grupo que consiste en *Saprolegnia Sp.*, *Branchiomyces sanguinis*, *Branchiomyces demigrans* e *Ichthyophonus hoferi*.

La vacuna de acuerdo con la invención puede formularse, en particular, para su administración a un pez. Más específicamente, la vacuna puede ser (o formularse) para su administración a un teleósteo. Los teleósteos incluyen, pero sin limitación, salmónidos, perciformes, doradas, bacalao, pargos, platijas, bagre, jureles y tilapias.

55 En una realización preferida en el presente documento, la vacuna se formula para su administración al salmón atlántico (*Salmo Salar* L.), a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y/o al salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*).

En realizaciones adicionales de la invención, la vacuna se formula para su administración a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en: baño, inmersión, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular y administración oral. Opcionalmente, la vacuna se administrará a peces jóvenes en su etapa de agua dulce.

Microorganismo vivo recombinante

5 De acuerdo con otra realización de la invención, también pueden usarse las secuencias de las fases abiertas de lectura 1 y/o 3 para desarrollar un microorganismo vivo recombinante para su uso en una vacuna contra la infección por el virus del SCM. Un organismo vivo recombinante funciona como transportador para la información genética de acuerdo con la presente invención mediante la inserción de las fases abiertas de lectura 1 o 3 o variantes o fragmentos de las mismas. Dichas fases abiertas de lectura o variantes o fragmentos de las mismas puede insertarse en el microorganismo de un modo que hace que el microorganismo sea capaz de expresar dichas secuencias de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico o las variantes o fragmentos de las mismas de acuerdo con la invención pueden insertarse en el genoma del microorganismo o mediante la introducción de un vector que comprende las secuencias de ácido nucleico deseadas. El microorganismo vivo recombinante puede ser, por lo tanto, un portador de secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas recombinantes o variantes o fragmentos de las mismas de acuerdo con la presente invención. Tal como se menciona anteriormente, el organismo vivo recombinante puede, por ejemplo, portar una o más proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención en su superficie, por ejemplo, en el que dichas proteínas recombinantes se anclan en la membrana o en la pared celular del organismo vivo recombinante.

20 El microorganismo vivo recombinante puede ser, por ejemplo, un virus, una bacteria o un parásito. El microorganismo vivo recombinante puede funcionar del mismo modo que una vacuna viva para peces, es decir, el microorganismo se replicará en el pez diana y dará como resultado una respuesta inmunológica contra las proteínas recombinantes codificadas por los ácidos nucleicos de la invención.

El microorganismo vivo recombinante puede tener la ventaja de cultivarse de manera eficaz y por lo tanto optimizarse para procedimientos de fermentación deseados y para la producción de alto rendimiento de la vacuna.

25 El experto en la materia será capaz, mediante el uso de técnicas biotecnológicas comunes para clonación y construcción de organismos recombinantes, de construir un microorganismo vivo recombinante de acuerdo con la presente invención.

30 El microorganismo vivo recombinante también puede ser el portador de ácido nucleico que codifica otros patógenos de peces, proporcionando de este modo protección contra una diversidad de patógenos. El organismo vivo recombinante puede incluir de este modo ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, proteínas de la envuelta o fragmentos de las mismas de otros virus de peces, tales como, por ejemplo, VASI, VNPI, VNHI o VICME.

35 De acuerdo con una realización de la invención, el microorganismo vivo recombinante es un virus capaz de replicarse en peces, preferentemente salmónidos. Por ejemplo, puede usarse el VNHI como microorganismo vivo recombinante, véase, el documento WO 03/097090 que comunica el uso de un novirhabdovirus modificado para obtener vacunas. También se sugiere el uso de microorganismos vivos recombinantes como portadores para ácidos nucleicos que codifican antígenos para otros patógenos de peces, por ejemplo, en el documento WO 2007/031572.

40 Una composición de vacuna que comprende un microorganismo vivo recombinante puede comprender además, respecto de la vacuna recombinante descrita anteriormente, adyuvantes, transportador, compuestos tensioactivos o emulsionantes como aquellos descritos anteriormente. Además, es igualmente aplicable la ventaja de combinar diferentes componentes de vacuna a la vacuna viva recombinante de acuerdo con la presente invención en cuanto a la composición de vacuna recombinante desvelada anteriormente.

Vacuna de ADN

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una vacuna de ADN que comprende ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención.

45 Las vacunas de ADN se basan en la administración a un paciente de secuencias de ácidos nucleico que codifican un antígeno, y el que la expresión de dichos ácidos nucleicos da como resultado una respuesta inmunitaria en dicho paciente. Para los fines de la presente invención, el paciente es un pez. Una vacuna de ADN puede consistir en un plásmido de ADN desnudo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno deseado de un patógeno unida operablemente a secuencias promotoras adecuadas y otras secuencias de control adecuadas que posibilitan la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico por células del paciente después de la administración de la misma. Una vacuna de ADN también puede estar portada en un microorganismo hospedador que esté implicado en el suministro del material genético al paciente.

55 Se conocen diversas vacunas de ADN para combatir patógenos de peces. Heppell y col. comunica la protección contra virus vivos después de la inyección de una vacuna de ADN que comprende los genes G y N del virus de la septicemia hemorrágica vírica clonados en un plásmido de expresión e inyectados en truchas arco iris (Fish and Shellfish Immunology, 1998, vol 8, 4ª edición, págs. 271-286). Lorenzen y LaPatra describen una vacuna de ADN

contra un rhabdovirus de peces en "DNA vaccines for aquacultured fish", Rev. sci.tech. Off int. Epiz., 2005 (1), 201-213. Además, se comunica una vacuna de ADN que da como resultado efectos protectores por Mikalsen y col., 2005, "Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anaemia virus hemagglutinin esterase in Atlantic salmon", Vaccine, 23:30, págs. 4895-4905.

- 5 En el documento EP 818 406 A1, se describe un sistema de expresión de ADN que puede usarse para producir una vacuna de ADN que previene enfermedades infecciosas en animales acuáticos, en el que la expresión está dirigida por un promotor de citomegalovirus.

El documento WO 2007/31572 desvela, entre otras cosas, una vacuna de ADN útil para combatir infecciones por VASI en salmónidos.

- 10 El documento WO 2009/002376 desvela una vacuna de ADN útil para combatir infecciones víricas en carpas (virus de la viremia primaveral de la carpa).

El documento EP 2 011 876 se refiere al desarrollo de vacunas de ADN para peces útiles para combatir la enfermedad del Herpes KOI que afecta a las carpas.

- 15 Basándose en la técnica anterior y el conocimiento general común citado anteriormente, el experto en la materia es capaz de construir una vacuna de ADN que comprende la fase abierta de lectura 1 o 3 de la presente invención o fragmentos o variantes de la misma que utilizan procedimientos usados comúnmente en el campo de la ingeniería genética.

- 20 Las vacunas de ADN que consisten en un plásmido desnudo que comprende las fases abiertas de lectura 1 o 3 o fragmentos o variantes de las mismas pueden administrarse a peces mediante inyección intramuscular o suministro mediado por partículas mediante un cañón de genes. Este último implica el recubrimiento de pequeñas partículas de oro con la vacuna de ADN, y después se efectúa la administración mediante suministro intradérmico mediado por aire a presión. Se prefiere la inyección intramuscular de una vacuna de ADN de acuerdo con la presente invención ya que es más económico que el procedimiento del cañón de genes, véase, Lorenz y LaPatra, anteriormente citado.
- 25 Además, se desvelan procedimientos para la administración de vacunas de ADN a peces en "Intramuscular Injection of DNA vaccines in Fish" por Heppel y Davis en "DNA Vaccines: Methods and Protocols", Methods of Molecular Medicine, 2000, vol. 29 (ISBN 978-0-89603-508-5).

Anticuerpos e inmunoensayos

- 30 Las proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención pueden usarse para obtener anticuerpos capaces de unirse a un virus del SCM y por lo tanto son útiles en procedimientos inmunológicos diseñados para la determinación del virus del SCM en muestras biológicas.

- Otro aspecto de la invención se refiere, por lo tanto, a un antisuero o a un anticuerpo o anticuerpos aislados (monoclonales o policlonales) que se unen selectivamente a un virus del SCM o a un componente o parte de dicho virus. El antisuero se obtiene de manera convencional, por ejemplo, inmunizando a un animal de laboratorio con el determinante antigénico adecuado. Una vez que la concentración de anticuerpos en el suero del animal ha alcanzado un nivel deseado, se exanguina al animal. El suero obtenido de este modo debe contener anticuerpos producidos en respuesta al estímulo inmunogénico.
- 35

Igualmente, los expertos en la materia conocen técnicas para la preparación de anticuerpos. Las técnicas incluyen la tecnología de hibridoma tradicional y técnicas alternativas, tales como presentación de ARNm, presentación ribosómica, presentación en fagos y presentación covalente.

- 40 En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo aislado comprende un marcador, por ejemplo, una radioetiqueta, una etiqueta fluorescente, una etiqueta quimioluminiscente o una enzima. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. Los expertos en la materia conocen protocolos para el etiquetado de anticuerpos mediante el acoplamiento de los diversos marcadores mencionados anteriormente.

- 45 Para una protección suficiente y el control de la enfermedad causada por el virus del SCM, se necesitan medios para el diagnóstico eficaz del virus del SCM. La presente invención proporciona, por lo tanto, inmunoensayos útiles para el diagnóstico del virus del SCM en peces. Un inmunoensayo dentro del significado de la presente invención es una prueba bioquímica que mide la presencia y/o concentración del virus del SCM en una muestra biológica, tal como, por ejemplo, suero. Por lo tanto, un inmunoensayo utiliza la unión específica de un anticuerpo a su antígeno. Tanto la presencia de antígenos (por ejemplo, presentes en el virus del SCM) como la presencia de anticuerpos contra el virus del SCM puede medirse en la muestra biológica.
- 50

- La presente invención proporciona además un inmunoensayo para la detección del virus del SCM en una muestra biológica, que comprende (a) poner en contacto las proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención y una muestra biológica que se sospecha que contiene anticuerpos contra un virus del SCM; y (b) determinar si los uno o más anticuerpos se unen a un virus del SCM presente en la muestra biológica, en el que dicha unión representa una indicación de que la muestra contiene un virus del SCM.
- 55

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un inmunoensayo para la detección del virus del SCM en una muestra biológica, que comprende (a) poner en contacto uno o más anticuerpos que reconocen específicamente y se unen a una proteína recombinante de acuerdo con la invención y una muestra biológica que se sospecha que comprende un virus del SCM; y (b) determinar si el anticuerpo se une al virus del SCM presente en la muestra biológica, en el que dicha unión representa una indicación de que la muestra contiene un virus del SCM.

El complejo formado en el inmunoensayo de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, la unión de un anticuerpo a un virus CMV en una muestra biológica o la unión de un anticuerpo presente en una muestra biológica a una proteína recombinante o fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención, puede determinarse mediante, por ejemplo, densitometría, fluorimetría, colorimetría o similares.

Los inmunoensayos de la invención tal como se ha descrito anteriormente pueden ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) convencional. El experto en la materia será capaz de proporcionar protocolos de ELISA usando anticuerpos desarrollados contra las proteínas recombinantes de acuerdo con la presente invención, o las proteínas recombinantes. A este respecto, se hace referencia a la guía de ELISA, *Methods in Molecular biology*, vol. 149, editado por John R Crowther, Humana Press, 2001.

La presente invención también proporciona un kit diagnóstico para llevar a cabo los inmunoensayos de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con otra realización, el kit de acuerdo con la invención comprende anticuerpos que reconocen una proteína recombinante de acuerdo con la invención y medios habituales para llevar a cabo un inmunoensayo, tales como, por ejemplo, pocillos de una placa de ELISA, reactivo para producir una reacción de color tras la unión de los anticuerpos a un virus del SCM en una muestra biológica que va a ensayarse. De acuerdo con otra realización, se proporciona un kit que comprende una o más proteínas recombinantes de acuerdo con la invención y medios habituales para llevar a cabo un inmunoensayo, tales como, por ejemplo, pocillos de una placa de ELISA, reactivo para producir una reacción de color tras la unión de dichas proteínas recombinantes a anticuerpos en una muestra biológica que va a ensayarse.

Secuencias de cebador y procedimiento para la detección de la infección por virus del SCM

Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden usarse además para detectar la presencia del virus del SCM en peces. La presente invención se refiere también, por lo tanto, a un procedimiento diagnóstico en el que los cebadores se hibridan a un ácido nucleico en una muestra de ensayo que es similar a las secuencias de ácido nucleico de la invención. Dichas pruebas pueden ser en forma de una prueba PCR o una prueba de hibridación sin amplificación.

La detección de ácidos nucleicos presentes en una muestra biológica se aplica ampliamente en diagnósticos tanto humanos como veterinarios, en los que se aíslan ácidos nucleicos de, por ejemplo, patógenos presentes en muestras biológicas y se hibridan a uno o más cebadores. Los uno o más cebadores para su uso en los procedimientos de detección basados en hibridación se construyen de tal forma que son capaces de unirse específicamente a una secuencia de ácido nucleico en caso de que esté presente en la muestra que se va a ensayar. Los cebadores pueden estar unidos a una unidad de señalización, tal como, por ejemplo, una radioetiqueta, una molécula luminiscente o una molécula fluorescente que permite la visualización de la unión de los cebadores a una secuencia diana.

Un cebador, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que puede usarse como sonda en un procedimiento de detección de la presencia del virus del SCM en peces. Los cebadores de acuerdo con la presente invención consisten en al menos 10, preferentemente de al menos 15, y más preferentemente al menos 20 nucleótidos que son capaces de hibridar a secuencias de ácido nucleico aisladas de un virus del SCM.

El cebador de acuerdo con la presente invención es capaz de hibridarse a otra molécula de ácido nucleico, tal como ARN genómico que se origina a partir del virus del SCM o ADNc preparado a partir de dicho ARN genómico, en condiciones adecuadas de temperatura y fuerza iónica de la solución, véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (tercera edición), 2001, CSHL Press, (ISBN 978-087969577-4). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan lo que el experto en la materia reconoce como "rigurosidad" de la hibridación. La rigurosidad adecuada para la hibridación de un cebador a ácidos nucleico diana depende, entre otras cosas, de la longitud del cebador y del grado de complementación, variables bien conocidas por los expertos en la materia. Una longitud mínima de un cebador hibridable es normalmente de al menos aproximadamente 10 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 15 nucleótidos y más preferentemente de aproximadamente 20 nucleótidos.

Hay disponibles varios protocolos para la detección de secuencias de ácido nucleico mediante la PCR; véase, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, vol. 226, PCR protocols, segunda edición, Ed. Barlett and Stirling, Humana Press, 2003. El experto en la materia será capaz además, cono el conocimiento de la secuencia genómica del virus del SCM ilustrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) de proporcionar cebadores adecuados con el fin de usar dichos cebadores en un procedimiento para la detección de la presencia del virus del SCM de acuerdo con la presente invención. A este respecto, se hace referencia al libro de texto *PCR Primer Design*, vol. 402 de la serie *Methods in*

Molecular Biology, Ed. A. Yuryev, 2007, Humana Press.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporcionan los siguientes cebadores:

5'-TCCAGTGCCTTGATGTCTG-'3 (SEQ ID NO: 8)
5'-CATCTCCATCCGCTAAGTACG-'3 (SEQ ID NO: 9)
5'-TGCCGTGCGTTGAGTTTAGC-'3 (SEQ ID NO: 10)
5'-CCCGAATGAAGCAAGATGG-'3 (SEQ ID NO: 11)
5'-GAAAGCCCAGACTCAGGATG-'3 (SEQ ID NO: 12)
5'-ACACCAGGTGACCGAAAAG-'3 (SEQ ID NO: 13)
5'-ACATGGTGCGAGGTAACGAC-'3 (SEQ ID NO: 14)
5'-AGTTCCTGCCCGTAGATGG-'3 (SEQ ID NO: 15)
5'-GGCGAGAATGGTGTGTTGTG-'3 (SEQ ID NO: 16)
5'-CCTGGTCTCACTCCCAAGAG-'3 (SEQ ID NO: 17)
5'-AGGGAACAGGAGGAAGCAGAA-'3 (SEQ ID NO: 18)
5'-CGTAATCCGACATCATTTTGTG-'3 (SEQ ID NO: 19)
5'-GGAAGCAGAAGTGGTGGAGCGT-'3 (SEQ ID NO: 20)
5'-CCGTTTTGCGCCCTTCGTC-'3 (SEQ ID NO: 21)

Experimentos

5 Ejemplo 1. Identificación de secuencias víricas.

Aunque se comunicó el aislamiento del virus que causa el SCM en la solicitud de patente NO2008 2869, la identificación del genoma de este virus ha resultado difícil. El virus es cultivable en células GF-1, pero la producción de virus es muy baja en este sistema. Se han probado muchos procedimientos diferentes para clonar secuencias de genomas víricos desconocidos, pero ninguno con éxito.

- 10 Los estudios previos indican el SCM es una enfermedad crónica que se desarrolla a lo largo de varios meses antes de la fase clínica terminal. Se observan cambios histopatológicos consistentes únicamente en el corazón y en ocasiones se observan cambios histopatológicos también en el hígado. Nada se sabe acerca de la distribución del virus en los diferentes estadios de la enfermedad. A menudo es difícil proporcionar un diagnóstico claro de SCM en salmones, ya que otras muchas enfermedades proporcionan los mismos signos clínicos, es decir, enfermedad
- 15 pancreática e inflamación del corazón y músculo esquelético (Kongtorp RT, Halse M, Taksdal T, Falk K, J Fish Dis. abril de 2006;29(4):233-44.

Se infectaron células GF-1 con homogenizado producido a partir de salmón atlántico procedente de un sitio de acuicultura que estaba experimentando problemas compatibles con el SCM. Después de 14 días, los cultivos celulares comenzaron a mostrar un cpe leve (efecto citopatogénico), y este se desarrolló en un cpe más fuerte

20 después de 21 días. No fue posible reproducir el cpe en más de tres pases, y se hizo más débil en cada pase.

Se recogieron 50 ml de sobrenadante de cultivos infectados, se pasaron a través de un filtro de 0,22 µm y se centrifugaron a 100.000 x g durante tres horas para recoger el virus en forma de un sedimento. Después de retirar prácticamente todo el sobrenadante del sedimento de virus resultante, se resuspendió el sedimento y se ajustó el volumen con medio de cultivo nuevo dando como resultado una suspensión de virus de 500 µl. Este se digirió con

25 250 U de DNasa I y 5 µg de RNasa A en tampón RDD (incluido con la DNasa I de Qiagen) durante 1 h a 37 °C.

El ARN se preparó a partir de la muestra usando el kit vírico QIAamp (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc monocatenario usando el kit de transcriptasa inversa SuperScript® III (Invitrogen) y cebadores aleatorios con un saliente 5' fijo (cebador FR26VRN 5' GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN 3'; Djikeng y col., BMC Genomics 2008, 9:5). El ARN se incubó a 95 °C antes de la síntesis del ADNc para evitar los

30 problemas causados por una posible estructura secundaria del ARN. Después de la síntesis, se digirió la hebra de ARN usando RNasa H antes de producir el ADN bicatenario usando una combinación de los componentes del tampón de la 2ª hebra del sistema de síntesis de ADNc Universal RiboClone® (Promega) y polimerasa Exo-Klenow e incluyendo un suministro adicional de los cebadores aleatorios. Se llevó a cabo una reacción PCR de un solo cebador usando cebador contra el saliente fijo del cebador aleatorio (FR20RV 5' GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC

35 3'; Djikeng y col., BMC Genomics 2008, 9:5) y polimerasa *Taq* convencional (Invitrogen) (desnaturalización inicial del ADNc a 95 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, hibridación del cebador a 60 °C durante 15 segundos y síntesis a 72 °C durante 1 minuto y después síntesis final a 72 °C durante 10 minutos), y los productos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se cortaron del gen de una pieza los productos de la PCR en el intervalo de tamaño de 500 - 1000 pb, se purificaron y se clonaron usando el

40 sistema de clonación TOPO-TA (Invitrogen). Se secuenciaron aproximadamente 300 clones y se sometieron a

análisis.

Las secuencias sin coincidencias relacionadas con el virus de las células hospedadoras/tejidos después del análisis con Blastn o BlastX del NCBI se sometieron a análisis en el programa ContigExpress de Vector NTI Software, dando como resultado la identificación de dos secuencias diferentes sin solapamiento. Una secuencia incluyó dos cóntigos (cóntigo 1 = 2,4 kB, cóntigo 2 = 4,0 kB con una coincidencia inicial de BlastX de ARN polimerasa de varios totivirus (mejor coincidencia E = 1e-04 sobre aprox. 430 pb).

El cóntigo 1 (2,4 kb) de la secuencia más pequeña no mostró homología con otras secuencias conocidas, mientras que la secuencia mayor mostró una homología débil con la ARN polimerasa de un totivirus en una región de 870 pb (Esperado = 7e-15, identidades de aminoácidos = 81/312 (25 %), Positivos = 138/312 (44 %), Huecos = 32/312 (10 %). El ensamblaje de ambas secuencias mostró varios números de secuencias de clon individuales en diferentes regiones que dieron como resultado solapamientos de baja calidad en algunas regiones. Cuando se analizaron las secuencias mediante la PCR, se hizo evidente que algunas partes de las secuencias son difíciles de amplificar mediante la PCR, lo que indica fuertes estructuras secundarias en estas regiones. Especialmente, se predice que la PCR en la región entre la parte terminal de la ORF1 y la primera parte de la ORF2 contendrá fuertes estructuras secundarias ya que la PCR en esta región es muy ineficaz y difícil de llevar a cabo (aproximadamente los nucleótidos 2800 - 3200). [Sin ligarse a cualquier teoría específica, se cree que esto puede explicar en parte las dificultades experimentadas con el aislamiento y caracterización del genoma del virus del SCM].

Se identificó una secuencia que une las dos partes de secuencia mediante PCR usando cebadores. Se diseñaron dos cebadores, VMCP-puente F (5'-AGCAGGAGCAACAGCACAC-3') y VMCP-puente R (5'-TACCCGCCAAATGGTACTTC-3'), para abarcar la región entre los dos cóntigos, dando como resultado un producto de 96 pb. Al analizar manualmente las secuencias no asignadas obtenidas, se identificó una secuencia 3' del cóntigo 2. Los extremos 5' y 3' del genoma se identificaron usando RACE 5' y 3'.

Finalmente, se ensambló un genoma de 6688 pb, que contiene tres fases abiertas de lectura. Esta es la primera vez que se identifica un supuesto miembro de los *Totiviridae* en un vertebrado. También fue muy sorprendente el hallazgo de la fase de lectura 3 (SEQ ID NO: 6). Ningún otro miembro de los *Totiviridae* tiene esta fase abierta de lectura.

Ejemplo 2

Expresión de proteína recombinante en un sistema de expresión de procariota.

ORF1

Se produjeron sintéticamente las secuencias génicas de la fase abierta de lectura 1 en forma de una secuencia optimizada para *E. coli* y se clonaron en un sistema de vector pET usando procedimientos convencionales. Se transformó una célula hospedadora de *E. coli* adecuada, y la proteína recombinante se expresó y purificó tal como se desvela en detalle a continuación.

Se clonaron la ORF1 y una ORF1 parcial que consistía en los primeros 852 nucleótidos (ORF1 (1-852)) en la fase abierta de lectura en el vector pET14b (Novagen) usando técnicas convencionales. El plásmido se transformó en *E. coli* químicamente competentes OneShot® BL21(DE3)pLysS de Invitrogen (n.º de cat. C606003). Para la preparación de un pre-cultivo, se cogieron 2 colonias de cada transformante y se cultivaron en 3 ml de LB + antibióticos ((ampicilina (50 mg/ml), cloranfenicol (34 mg/ml)).

Después de cultivar durante aproximadamente 7,5 horas, se transfirió 1 ml de cada pre-cultivo a 50 ml de medio precalentado que contenía antibióticos.

Los cultivos se indujeron mediante la adición de IPTG (0,5 mM) después de crecimiento durante aproximadamente 2 horas a una DO entre 0,7 y 1 y se redujo la temperatura a 16 °C. Los cultivos crecieron durante toda la noche a esta temperatura.

Construcción	DO de inducción	DO recogida
ORF1(1-852)	0,8	3,09
ORF1(1-852)	0,78	3,18
ORF1	0,7	4,2
ORF1	0,76	4,2

Los cultivos se recogieron 15 h después de la inducción y se precipitaron las bacterias a 3300 x g durante 20 min. Se desecharon los sobrenadantes y los sedimentos se almacenaron a -20 °C hasta la purificación de los cuerpos de inclusión. El aislamiento de los cuerpos de inclusión se efectuó usando los reactivos de extracción de proteínas B-PER® (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las proteínas aisladas separadas mediante electroforesis en gel usando el sistema de gen Phast de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare Life Sciences) se muestran en la figura 9A.

B. ORF3

5 Se construyó un vector de expresión para la ORF3 usando un sistema de vector con un sistema de inducción Pm/xyIS (Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., y Valla, S. 1997a. Construction and use of a versatile set broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. Appl. Environ. Microbiol. 63:370-379, Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Karunakaran, P., y Valla, S. 1997b. Improved broad-host-range RK2 vectors for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria. Plasmid 38:35-51).

10 El vector tenía la versión cop 271 de la proteína de replicación TrfA, proporcionando un número de copias de 15-30 en *E. coli*, y una etiqueta c-myc y 6xHis fusionada al extremo 3' de la ORF3.

15 El plásmido se transformó en *E. coli* RV308 y se fermentó de acuerdo con Sletta y col., 2007 (Sletta, H., Tøndervik, A., Hakvåg, S., Aune, T. E. V., Nedal, A., Aune, R., Evensen, G., Valla, S. y Brautaset, T. 2007. The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 73:906-912).

Los cuerpos de inclusión se aislaron del fermentado usando el kit de extracción de proteínas B-PER® (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas aisladas separadas mediante electroforesis en gel usando el sistema de gen Phast de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare Life Sciences) se muestran en la figura 9B.

20 Ejemplo 3

Expresión de proteína recombinante en un sistema de expresión de eucariota.

Se clonaron las secuencias génicas de las fases abiertas de lectura 1 y 3 en un sistema de vector usando procedimientos convencionales. Se transformó una célula hospedadora eucariota adecuada, y la proteína recombinante se expresó y purificó entonces tal como se describe en detalle a continuación.

25 Se clonaron una ORF1 parcial que consistía en los primeros 852 aminoácidos de la fase abierta de lectura y la ORF3 completa en el vector pcDNA4 (Invitrogen) usando técnicas convencionales. Se transfectaron células HeLa cultivadas sobre portaobjetos usando FuGENE® (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para determinar si se expresaron las fases abiertas de lectura, se fijaron las células transfectadas en paraformaldehído al 3 % durante 15 minutos, se lavaron en PBS y se inactivaron con NH₄Cl durante 15 min, se lavaron en PBS y se incubaron con anticuerpo primario anti-His (anticuerpo disponible comercialmente a través de Qiagen, 1:100) durante 30 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, se incubaron las muestras con Ac secundario disponible comercialmente a través de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. durante 45 min (IgG de cabra anti-ratón-CY3 1:500 e IgG de burro anti-ratón-CY3 1:500, respectivamente). Después de lavar con PBS, se empaparon los portaobjetos en H₂Odd antes de montarlos en un medio anti-decoloración de alcohol polivinílico de alta calidad 35 Mowiol® (Polysciences, Inc.) que contenía 2 µg/ml de Hoechst para la tinción del núcleo.

No se observaron estructuras un día después de la transfección. Después de dos días de la transfección, las células transfectadas con la ORF1(1-852) mostraron estructuras bastante grandes que contenían la proteína etiquetada con His expresada. Un número menor de células transfectadas con la ORF3 mostraron las mismas estructuras. Las células de control negativo no mostraron tinción específica. Esto demuestra que las proteínas de la ORF1 y la ORF3 40 pueden expresarse en sistemas de expresión eucariotas.

Ejemplo 4

Inmunogenicidad de las proteínas de la ORF1 recombinantes

45 Se inmunizó a ratones con la ORF1 recombinante producida como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2 usando procedimientos convencionales. Se inyectó a los ratones 60-100 mg de proteína y se les reforzó tres veces consecutivas. Se recogió el suero tras 10 semanas y se ensayó mediante transferencia de Western.

50 Se sometió a homogenizado de corazón de salmón atlántico diagnosticado de SCM y a homogenizado de corazón de pez sano a PAGE y se transfirió a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) usando un aparato PhastGel® (GE Healthcare). La membrana se incubó con antisuero (1:250) durante 120 minutos, se lavó en PBS y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (1:500, DAKO, Dinamarca) durante 60 minutos. La transferencia se visualizó con NBT-BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitroazul de tetrazolio) (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las transferencias de Western muestran la presencia de una banda específica con un peso molecular de aproximadamente 90 kD en el carril con homogenizado de corazón de salmón atlántico diagnosticado de SCM (figura 10). Esto se corresponde bien con el peso molecular estimado de la OFR1. Estos resultados demuestran que

la proteína de la ORF1 recombinante provoca una respuesta inmunitaria que produce un antisuero que reconoce una proteína del virus del SCM. Por lo tanto, la ORF1 es un buen candidato a antígeno en una vacuna contra el SCM.

Ejemplo 5.

Inmunogenicidad de las proteínas de la ORF3 recombinantes.

5 Se produjo la proteína de la ORF3 recombinante tal como se describe en el ejemplo 2 y se sometió a PAGE y se transfirió a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) usando un aparato PhastGel® (GE Healthcare). Las membranas se transfirieron durante 2 horas a 37 °C en TBS-Tween al 0,05 % (TTBS) que contenía leche desnatada en polvo al 5 %.

10 Se diluyó a una razón de 1:2 el suero de pez de salmón atlántico diagnosticado de SCM o de pez de control sano con TTBS + leche en polvo desnatada al 5 % y se incubó la membrana O/N a 4 °C. Las membranas se lavaron 3 x 5 min en TTBS + leche en polvo desnatada al 1 % antes de la incubación de 1 h con IgM de ratón anti-trucha 4C10 (1:1000) 3 x 5min en TTBS + leche en polvo desnatada al 1 % a TA. Las membranas se lavaron 3 x 5 min en TBS-Tween antes de una incubación de 1 h con IgG de cabra anti-ratón-AP (1:500) solo en TTBS. Entonces la membrana se lavó 3 x 5 min en TTBS antes de la incubación a TA durante 5 minutos en tampón de sustrato NBT/BCIP antes de
15 añadir NBT/BCIP (Promega) para visualizar las proteínas.

El suero del salmón atlántico diagnosticado de SCM reconoció las proteínas recombinantes de la ORF3, mientras que el suero del pez sano no (figura 11). Esto demuestra que la proteína de la ORF3 recombinante tiene epítomos comunes con el virus que causa el SCM. Por lo tanto, la ORF3 es un buen candidato a antígeno en una vacuna contra el SCM.

20 **Ejemplo 6**

Vacuna de ADN que protege contra el SCM

Se clonaron la fase abierta de lectura 1 (nucleótidos 1-852) y la 3 en un vector de vacuna de ADN adecuado, pcDNA4 (Invitrogen) usando técnicas convencionales. El vector resultante se inyectó por vía intramuscular en salmón atlántico que había mostrado estar libre del virus del SCM a una dosis de 100 µg/pez. Después de un
25 periodo de inmunización de 6 semanas a 12 grados Celsius, se expuso por vía i.p. al pez con virus de la cardiomiopatía del salmón. Se incluyó como control un grupo al que se había inyectado PBS en lugar de vacuna. Se recogieron muestras de tejido de peces vacunados expuestos y no vacunados para su análisis mediante RT-PCR en tiempo real para evaluar la carga vírica en el riñón tres semanas después de la exposición. Las muestras se mantuvieron en RNeasy® (Qiagen) hasta su análisis. El ARN se extrajo usando el kit RNeasy® (Qiagen). Todas las
30 muestras de ARN se diluyeron hasta 50 ng/µl antes de la síntesis de ADNc. Para la síntesis de ADN y la PCR en tiempo real, se usó el kit para PCR en tiempo real en dos etapas SuperScript® III Platinum® con SYBR® Green. Para la PCR en tiempo real, se usaron los cebadores VMCP ORF2-3F/ORF2-3R (ORF2-3F= (5'-GGAAGCAGAAGTGGTGGAGCGT-3') y ORF2-3R= (5'-CCGGTTTTGCGCCCTTCGTC-3'), y las condiciones de ciclado fueron: 50 °C - 2 min, 95 °C - 2 min, (95 °C - 15 s, 60 °C - 1 min) x 45 ciclos.

35 Ya que la carga vírica máxima a causa de la infección por el virus del SCM se observa en el riñón, esta se usó como medida para la eficacia de la vacuna. La carga vírica en el riñón de los peces infectados y los peces de control comunicada como ciclo umbral (Schmitgen TD, Llvak KJ, Nat. Protoc. 2008; 3(6): 1101-8 "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method"), Ct, fueron las siguientes:

	Promedio de Ct
ORF1(1-852)	27,33
ORF3	26,27
Control de PBS	24,62

40 Una diferencia de valor de Ct de 3 representa una diferencia de 100 veces en la carga vírica. El valor promedio de Ct del análisis de tejido de riñón para el grupo de control fue de 24,62. Tanto el grupo vacunado con ORF1 (1-852) como con ORF3 tuvo mayores valores de Ct que el control. Un mayor valor de Ct indica que la carga vírica era menor en los grupos vacunados que en el grupo de control. Este resultado demuestra que las construcciones de vacuna de ADN de ORF1(1-852) y de ORF3 fueron eficaces para reducir la carga vírica en los peces y por lo tanto
45 tienen potencial como vacunas de ADN contra el SCM.

Ejemplo 7Diagnósticos por PCR

Se ensayaron los siguientes cebadores y se vio que eran adecuados para el diagnóstico por PCR para el virus del SCM.

CEBADOR	DIRECTO (5' - 3')	INVERSO (5' - 3')	LONG. PRODUCTO
VMCP	ACACCAGGTGACCGAAAAG	TCCAGTGCCTTGATGTCTG (SEQ ID NO: 8)	237 pb
A01	ACATGGTGCAGGTAACGAC	CATCTCCATCCGCTAAGTACG (SEQ ID NO: 9)	124 pb
B04	AGTTCCTGCCCGTAGATGG	TGCCTGTCGTTGAGTTTAGC (SEQ ID NO: 10)	531 pb
F02	GGCGAGAATGGTGTGGTG	CCCGAATGAAGCAAGATGG (SEQ ID NO: 11)	269 pb
A09	GAAAGCCCAGACTCAGGATG	CCTGGTCTCACTCCCAAGAG (SEQ ID NO: 17)	242 pb
ORF2-3	GGAAGCAGAAGTGGTGGAGCGT	CCGGTTTTGCGCCCTTCGTC (SEQ ID NO: 21)	107 pb

5

También es posible diseñar procedimientos de PCR en tiempo real usando cebadores y sondas, por ejemplo:

CEBADOR	DIRECTO (5' - 3')	INVERSO (5' - 3')	PROBE
VMCP-F2	AGGGAACAGGAGGAAGCAGAA	CGTAATCCGACATCATTTTGT (SEC ID NO: 19)	TGGTGGAGCGTTCAA

10 La mitad 5' del genoma del virus es mucho más rica en contenido de GC que la parte 3'. Se predice que la PCR en la parte 3' del genoma es más eficaz que en el extremo 5'. También hay una parte en medio del genoma en la región entre y parcialmente solapante con la ORF1 y la ORF2 que forma un seudonudo, haciendo que la PCR en esta región sea difícil.

Ejemplo 8El SCM clínico se correlaciona con la presencia del VMCP en el tejido cardíaco.

15 Para examinar si el SCM clínico en peces criados coincide con la presencia de VMCP en el tejido cardíaco, se recogieron muestras de tres piscifactorías. Dos de estas (1 y 2) tenían un diagnóstico de SCM, mientras que la del tercer sitio no tenía un historial previo de SCM. La RT-PCR en tiempo real en las muestras de campo se llevó a cabo en el dispositivo MXpro 3000P (Stratagene) efectuándose todas las reacciones por triplicado usando los siguientes cebadores:

ORF2-3F (5'-GGAAGCAGAAGTGGTGGAGCGT-3') y

20 ORF2-3R (5'-CCGGTTTTGCGCCCTTCGTC-3').

25 Se observaron cambios histomorfológicos en los peces recogidos de la muestra 1 (al sacrificar el pescado) típicos del SCM con puntuaciones en el intervalo de 0,6 a 4 (abarcando la escala completa; fig. 12). La relación entre las puntuaciones histológicas y los valores de Cp evaluados mediante RT-PCR en tiempo real muestra que hay una tendencia clara a encontrar mayor cantidad de virus en el tejido cardíaco con mayores puntuaciones histológicas ($r^2 = 0,76$). Como se ha sugerido que los peces mayores mueren más frecuentemente a causa del SCM, también se representaron los valores de Cp frente al factor de condición (peso x 100/longitud) de los peces sin encontrarse correlación alguna ($r^2 = 0,08$).

Para la muestra 2 (SCM clínico), 10 de 10 peces fueron positivos mediante RT-PCR en tiempo real y todos mostraron los cambios histopatológicos del SCM.

30 Para la muestra 3 (historial previo de HSMI), no se observaron peces positivos a VMCP mediante RT-PCR en tiempo real, mientras que todos fueron positivos mediante RT-PCR en tiempo real para VRP. Ninguno de los peces tenía cambios típicos del SCM.

Estos hallazgos demuestran que los casos clínicos del SCM se correlacionan con la presencia de VMCP en el tejido cardíaco y sustentan además que el VMCP es el agente causante del SCM.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una secuencia de ácido nucleico aislada que se origina a partir del virus del SCM que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas a lo largo de la secuencia completa con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.
2. Una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia es al menos un 80 %, preferentemente un 90 %, más preferentemente un 95 % idéntica a lo largo de la secuencia completa al ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.
3. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1-2.
- 10 4. Un vector de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 6 y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas a lo largo de la secuencia completa con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 6, en el que dicha secuencia de ácido nucleico aislada está unida operativamente a secuencias de control que dirigen la expresión de dichas secuencias.
- 15 5. El vector de acuerdo con la reivindicación 3-4, en el que el vector es un vector pET.
6. Una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-5.
7. Una vacuna de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas a lo largo de la secuencia completa con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 6.
- 20 8. Una proteína recombinante codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas a lo largo de la secuencia completa con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 6.
- 25 9. Una proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 8 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7 o una variante de las mismas que es al menos un 70 % idéntica a lo largo de la secuencia completa con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7.
10. Una vacuna recombinante que comprende al menos una proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 8-9.
- 30 11. Un anticuerpo que reconoce específicamente y se une específicamente a una proteína recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 8-9.
12. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
13. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo es policlonal.
14. Un inmunoensayo para la detección de anticuerpos específicos para el virus del SCM contra el virus del SCM en una muestra biológica, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:
 - 35 a) poner en contacto al menos una de las proteínas recombinantes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9 y una muestra biológica sospechosa de comprender anticuerpos contra un virus del SCM; y
 - (b) determinar si la al menos una proteína recombinante se une a un anticuerpo específico para el virus del SCM presente en la muestra biológica, en el que dicha unión representa una indicación de que el animal ha estado en contacto con el virus del SCM.
- 40 15. Un inmunoensayo para la detección del virus del SCM en una muestra biológica, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:
 - (a) poner en contacto uno o más anticuerpos que reconocen específicamente y se unen a una proteína recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 8-9 y una muestra biológica que se sospecha que comprende un virus del SCM; y
 - 45 (b) determinar si los uno o más anticuerpos se unen al virus del SCM presente en la muestra biológica, en el que dicha unión representa una indicación de que la muestra contiene un virus del SCM.
16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
17. Un cebador que comprende una secuencia de al menos 15 nucleótidos, en el que dicho cebador hibrida específicamente con una secuencia de ácido nucleico que se origina a partir del virus del SCM, que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6
- 50

y variantes de las mismas que son al menos un 70 % idénticas a lo largo de la secuencia completa con cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.

18. Un cebador de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho cebador tiene al menos 20 nucleótidos.

5 19. Un cebador de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho cebador se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

20. Un procedimiento de detección del virus del SCM en una muestra biológica **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:

- 10 a) preparar una muestra biológica que comprende secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de una muestra biológica que se sospecha que comprende virus del SCM para una reacción de transcripción inversa;
- b) someter a la mezcla de a) a una reacción en cadena de la polimerasa con un par de cebadores seleccionados entre los cebadores de acuerdo con las reivindicaciones 17-19; y
- 15 c) determinar si se ha producido la unión de los cebadores a secuencias de ácido nucleico en la muestra y la amplificación de la secuencia entre ellas indicando la presencia de virus del SCM en la muestra ensayada.

21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que cada cebador del par de cebadores se selecciona entre un grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

20 22. Un kit diagnóstico que comprende al menos una secuencia de cebador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-19.

23. El uso de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la preparación de una vacuna de ADN, una vacuna recombinante o un microorganismo vivo recombinante.

Figura 1

```

1  AAAAAGACAA CAGAAAAACC GAGAAAATCT CTCTTTTTTCC TGAACTAAAC TGGTGCATAG
61  TTCAGTAAACA AACCATCCGC TTTGCAACAG GGAAGCGGGC CGTAACTCCA GTGGTGACAT
121 GGGGAACGGA CATTAGCTTA CTCCGCTAAG GGAGTGAGGA GACCTGACTG AGGAAGTAGG
181 ATGCACCTCA GGACTTAGAA TTCGGTTTAG TCATCTATGG TAGTGACCCC AAAACGACTA
241 GTTCGGGAAC GGGGGACCCC ACTGCCGCAG GGGTATCGAC GGGCTACTAC ACCCACTTCA
301 GCCTTCCCTC CGGGGGGGGT AGAAAAGGTGG GTCGAGCGGT GAGGAGAAGG GTTGTCAAAT
361 TAAAACAACCT CTCCGACTGC GATCTTATTT CGGTAGTCCC GGGCCGGCGT TGATACTCAG
421 GTAAGGTCCG GATGTCAACC AACTATGGAA CCAAACACAT CTGTCAATTGC AACGGAGCAG
481 CAGCAGGCTG CCATGAGAGA GGTGGAGGCC GAGGCGGCGG CCAGAGACGA AGTGGTGGAG
541 AAGATCGCAT TCGTGAAGG AGCGATGATG GTACAGACGA GGAGGTACC ATCAGGAAAG
601 TCGTCCGTAG GAGGTTTTCT CGGCGAAGTGC GCACAGAACA TACGTGCCAT GAATCGGTCA
661 TTGCACACAG ATACCAACAT GCTGACCGAA GGGGCGATGG TGGACAGAGC GAGGGCAAAA
721 GTACACAAAA TCATTAGGGA AGGGAATTTG GACTCTAGGG TATTTTCAAA CACGGGGAGC
781 AACACTATGT TGTCACTGTG GGTACCAGCA GTACCGGGAC CACCGGCAGT ACCGGAGCAT
841 TGGGACGTTG CGCGTCCCTG GTTCGTATGC AGACCGGGGA AAAAGGGGGG GATAAAGATC
901 ACACAAAGCG CATCAATGGC AGCATTAAAC CCACTATTTA GAGGCGCAGA CGTGGGGCCA
961 ATCGGGACAG CAGTCAGGGC GGATGTA AAC GCATTTTCAA TGAATGCAGT TCTGGGAGCA
1021 CTAAGAGCCG GGGGATTTAA CACCGAACAT TCCCTGGTGT CATTCTGTGA ACCCTAATT
1081 CCGATCTTGC TAATGGGGGT ACAAACACAA GACAGGGGGA CCAGCCCATG GGATTGGGTT
1141 GGAGGGATGA GTTCGCGAAT AGTCAATCCC CTAGTATTCA CAACAAGCGG GAACTTCTTC
1201 CCAGGGGGAC CAAATTTGAG GGTGTGGGGA GCCAACGATA CAGTGGCCAG GATAGTAAAC
1261 GTTGAGGACT ACATGCGCGA GGCGGCCGGG GAGGGGAGGT TCGACGCTGG ATCGGGACCG
1321 GAATTCGTTG GTGGGACAGG GGACGACGCA GTGGCCGTTG TACCGATAAG GGCAGTAGAA
1381 GCAGGGCTAG GAGAAGTAAA CGCAGGGTGG ACATTGGCAC ACATGGAATA CCCAGTCAAG
1441 GTTAGACTAC TTGACGTCGA CGACCGAACA ATTGGACCAG GGGGGAGCCT GCCCTAAAC
1501 GCAAACAGAG AATACACGGC GGCAGGAGCT ACGCATGTAC CCGGGCCCTA TGCCAGGGTA
1561 CTGTACGTCG TCGTGGACCA AAACGCAGAC AGGTGTGTGG GGGTGTAGAGT GCAGGGACAG
1621 GGTGCTGTAA TTGACGTGGA TCCGGCGTTG AATTACGTGA TAGGGGGAGC GGATTTGGGG
1681 ATGTTGCCGT TGATACAGTG GAGTGTAGGG CTGGGGGCCG AGGACATGGC GCAGGGATCG
1741 ATTGCACAGA CGCAGCGATG GGTGAGGATG TATGGAAAAC AGGACGATTG GGAAATCAGCG
1801 TGGCATCTAG TGTCTAGCGC GTACACAGTG TACAGCCCGG CATTCAAGAG ATCGGGTGTG
1861 GCAGTGGAGG GAGGATTCTG GGCGCAACCA GCTGCAGGGG CAGCACCGTT TCCACTAGGA
1921 GGATTGGCAG GGTGGGTGAG GTACGACAAT CAGGCACGGG CGGCGCAGGT TGCACTTTGC
1981 AGAGAGAGGG CGGATATGGC GGAGTGTCTT TGGGGGGGGT ACAGGGAGAG AGGGGTGAGA
2041 CCGGGGAGTG TGGCAAAC TGAGTCCATG AGGTTCGATC CCACATGGC TGTAGGAGTA
2101 GCTGCTCACT TCTGTCGGT AGTGAAGGTG ATGGTGGCTC CCGTCCAGA CAGAGCGGCT
2161 GCTCTGGCGG ACATGGCGTG GGGGAAGGGG AAGGTGCAAG CCATGGGTGA GGATGTGATC
2221 AACGGGCAGA TGGACAACC TGAGTCCATG ATGAGAGGGG TGGCGCTGAA CGAGAACCAG
2281 GCACTAGCGG CGGCTACAGT CAGGAGGGTG GTTGGGCTGG AGAACCAGTC GATGCAAAACA
2341 ACGCACTGGA GTACAACGGA GGTAGCAATG AACGGGTACT ACGGGAGAGC AGGAGCAACA
2401 GCACACCACG CTGCATTTCC GTTGTCCGAG GGGGGGACAA TGCGAAAACG AATACCAGCT
2461 ATAGAGATGA GGGAGAACGG GGTGGAGGGG GACCTGATGA ACGATGATCT CTATTCAATT
2521 GGAACGGCAG CGGGGTACCT GGCGGTAGAG GGGATGGCAG GTGCGCAGGG GGGTATCTGG
2581 GACGTGGTCC AGTACCAGCT GCCTGGGCCT GACGATGAGG CGAGGGGGGT GATGAACACG
2641 GTGGGGGCGA TGGGGGGATG GACGAGGGCG GTGACACCAG TAGACAATGT GGCCACCATG
2701 AGGGACAACG GGGTTGAGGG GGAACCTTGT GGAATAGTGA TGTCTTACC AACAAAGTGGG
2761 ACCGCTGTGG TGGATAGGTT AGCTAATTTT GGATTACCAC CAGCGAGGGC GGAAATTAAGA
2821 GAAGTACCAT TTGGCGGGTA CCAAAGATCA GTCACAAACA CCAACCACAG AGTCAAGGTG
2881 AGTGTGAGTG GGGGGCGAGC AGTTGTTCAA AAAGGGAACA AAGCCGAGAT GAATCCAGTC
2941 TTTGTCAATA GGACACCAGG ACAAACGACC CTAGGCCAAC CAACAACAGA CACTACAGGG
3001 ATGACAACTG CAGATTTTTT AGATATATAG ACCCCTGGGC ACCAAAAAGA AGTAGAAAAGA
3061 GGAATGCAGT TGGAGCACTA CTACAATTAG ACCCAAATTT AGGACTTAAG AGAATGATAA
3121 CCAAAGCATT GGGCCAGGGA CGAGAAGAAG ATTGGATTAA GATAACCACC AATACTACAA
3181 AGATCAAATT GAAATCACTA AGGCCACTGG ATGGATGGGA GCATTCAAGG TGGGGACTGG
3241 GACTGAGGTT AGCCTTAGAA CTAGTTTCTG AGCCAACGAG AGAGACAATG TCAGGGGTAA
3301 TTAGACAAAT TAGGATAGGG AAGCTAGATC CAACCAAGGT ATTTAATCA ATTAGTAACC
3361 AGGCGAAAAG TAGCGGGTGC GGGCTATGTA GGGAGTGGAA GGAGTACGTA AATTGGGAAT
3421 TACTAGGGGG GTACCAGATG ATAACAGCCC AACAGATGGG TGAAGAGGTA GCACACCAGG
3481 TGACCGAAAA GGCTAAAAGC GAGGAAGCGG GAAGCGATAG GATAAATAGG GCATTAGAAT

```

ES 2 588 225 T3

3541 CAATTTTAGG GCCACTAAGG GGTACATGCA CCGTACCGTG CTCACAAAGG GAATTTTTTAT
 3601 TATGTAGGGA TAAATGGGCC AAAAAACGCT CCGGGTACAT AGGGTTAGGG CAAAATTTAG
 3661 GGCGACAGAA GATAGACGTA GCACTTAATT CAGACATCAA GGCACTGGAA AGGATGATGG
 3721 AGGGAGAATT CGAGAACAGA CCATTTATTA AAAGTGAACC AGGGAAAAGC AGGCCGGTAG
 3781 TTAATAGTAA TATATCGTGT TACCTAAATT TAGAGTATGG GTGGGTAACC ATTA AAAAAGA
 3841 CACTGAAAAA ATACTTAGGC AAGAGGACAA CAATTTTCGA CGACGCAAGC CAAAAGGTAC
 3901 TGTTATGGCA AGAAATGATA ATTGGAGCAG ATAACCATAG GGAGATTAAA GTGCCACTAG
 3961 ACTACICGCG GTTCGATTCA ACAATTGGGA AAACGCAAAT CATGAAAGTGT GTTAGACTGC
 4021 TATTAGACAT GGTGCGAGGT AACGACAATT GGAAAAGGTC AGTTACTGAA AGATTCGAGA
 4081 GACAAACGGT GTACATTGAC GGTACGGAA AACTCAGGTG GGAAAACAGC GTACTTAGCG
 4141 GATGGAGATG GACAAGTATA ATCACATCTG TAATAAATTT GGCCATTCTT AAGGCCACCG
 4201 GAGCCGATGC GAGCGGAGTA GGGATTAAAAG TCCAGGGAGA TGATGTTAAA ATCAGCTTCC
 4261 AAACAATTCC AGAAGCGGAA AGGTGTGTCG AAGAAATTAA CGCTTTAGGG TATGAAATTA
 4321 ACCCGGGTAA AGTATTTGCG TCAAGGAAAA GGGACGAGTA TCTCAGGATG GTAGCGGAAG
 4381 AGGGGAAAAT GGCAGGTTAT GTAATTAGGT GTCTACCGAA AATTGTATTT ACATCACCAA
 4441 CAGAAGAGGT TACCACATGG GAAGAACGAA TIAGGGGAAC AGTGTCAAAA TGGATGAGGG
 4501 TGTTATCACG GGGGGGGGAT AGGGAAAGTAG CTAATATTTG GATGAAACGC GATTTGTGTG
 4561 GATTGAGTGG AGAGAATTCC GAATTAATAG ATAGCTGGTT ACGTACTCCA GCATCCGTGG
 4621 GGGGGGGTGG TTGTGCATGG TTACTTGGGG AGGGAAAATTT GTGGACGGGA TTAGTACTTA
 4681 GGGAACAGGA GGAAGCAGAA GTGGTGGAGC GTTCAAATCA CAAAATGATG TCGGATTACG
 4741 GGGGGTCAGT TCCTGCCCGT AGATGGATCA AGAGTGTGAC GAAGGGCGCA AAACCGGCTT
 4801 TTGGGTTCAA GAGGATAGAG AGGGTAAAAG CACTAGGGAA CTGGTTAAAA GATCTAAGGC
 4861 CAGTGGCGGA ATCAATTAAA TCAATTAGTG ACTTAGTCGA AACATCACAG GTACCAAAT
 4921 TCAGATTTAA GGAAATTTAT GATTGGACAC CATTTCATGGT ACACAAGAGG AACGCGCTCA
 4981 TAGAAGAAAA GAACTGGGAC AAATTGTGCT CGCTTTATCA TAATGAAGGG GAAGTGAGAC
 5041 TATATAAAAAG GATATTACCC AGGTGGATGT GGCTGAGTAT GATAAAAAAT GAGTTAACAT
 5101 GGGTAAGTAT GCCACCAAAC ATTGCTAATT CCGAAGTTGC TTCACTTGCA AAAGAAAGAG
 5161 TGGAGTCAA AGTGTGAGT AAAGTATTGA GGTATCACCG AACCGTCTCA AGAGAAACGC
 5221 TCACTCGTTT TTCTATTGGT GGGGAGTATG TACTGAGTGC TAAACTCAAC GACAGGCAAA
 5281 GGATATTACA GTAGGACGGT GGTAGCTGAA ACAGGGGCTA CTAGCACAAA GAAGCTATCT
 5341 GGAATAGGGG ATAGTGTAAC CTGATCACGG AACTAATACG CACCGTGTAC CTATTAGTAA
 5401 GGCGTATATG GTAGGTGCCG GAGGAGGCGA CGATCCCGGG ACTTCACTTA CCGCAGAGGC
 5461 AGCTATAGTA GGTTAGGCGT GGAATTCCGG CCAITTTAGA GGACCTATTC GGACCGGCGT
 5521 GGTTGTCGAA GTAAGACCCG GATGTCAAAC AAGATGAAGA GTTTTTTACT GGTGCTTTTA
 5581 TGTTTGTGTG TAGGGGAAGG GATTGTTCCA ATGTTCAGGC GAGAATGGTG TTTGTGCACT
 5641 GCAGGGAATG CGAGAGTACC CTTGGTGGGA GAGGGAAAGG CTGAGAAGAT CGAGCTATTC
 5701 AATCAGAGCG CCACATGTGG GAAGAAAGAG CTAATAATAA CGTGAAGGG AAAGAGGTGG
 5761 TGCTACGATA TTGAGAGCAA GCGAGGGAAA ATACTAGTAA AGACACTGAG CGGAGGGGGA
 5821 CATCTGGAAC GAGAGGGAAA GGGGTACAAG TIAGTTAGGA ACGGGTTCCA TCTTGCTTCA
 5881 TTCGGGGGTA AAAAAGAGGA AATACAGGAT TCAAGTCACA TAGAGAAAGT AAACGGGAAA
 5941 GACGCGATAG TTAAGAAAGG GCAACACGTA GAACATCTTC CAGGGGGGAA CGATTTAATT
 6001 GTTACAGAGG GCGGGAACCT GTGTGGGAAC GTGGGGTTCT TCGATAATAC GCAGTGTACA
 6061 TACAACAGTG TTATAAATAT AGGAGGGGGA AGTGTGACA ATTCACAAGA AGCCAAGAAC
 6121 GATAAATCAA ACACAATTGA CAATTTAATT GATATGTTAC CTTAGTTGT AGGAATAGCC
 6181 GGGGCTGTC TCATAGTGAT AGTAGTCTTA TACTTAACAA TTAATACTG TAAATGCAAG
 6241 AAGAAGAGGA CCAACCCAGA ACCAGCGGAA CCGGAGGAAC ACGAGATGAG GGAATCAGG
 6301 AGAAGGTTAG AGCCACGCC TCCATACCAA AGACAGATGG GTGTTGAGTT TGAATAAAT
 6361 GAAGCTCTCG AATTCATGGG CGTCGAAGGG AGTGAAAGCC CAGACTCAGG ATGTCAGTCA
 6421 GATGAAGAGG GATTCAGAGT AGGAGTCTAG ATGGAACGAA GAGATAGGTC ACCACTATCG
 6481 TCCGCATATA ATTTTACACA ATTGGACTAG TACTATTGTA CAGGGGTACC ATTTACCCTG
 6541 CCAGACCGAC AAATAGGTCG GGTGTTTAGT GAGAAAGTCG CTAGCACCTG GGCGAAAGAT
 6601 GGGGCAACAT ACTGACTCTT GGGAGTGAGA CCAGGGGGAA GTATGTAAGG CATGGTTAGG
 6661 CCTGACCCCG TGGGTCAAGG CCGTGCTG

Figura 2

```

445                               ATGGAA CCAAACACAT CTGTCATTGC AACGGAGCAG
481 CAGCAGGCTG CCATGAGAGA GGTGGAGGCC GAGGCGGCCG CCAGAGACGA AGTGGTGGAG
541 AAGATCGCAT TCGCTGAAGG AGCGATGATG GTACAGACGA GGAGGTTACC ATCAGGAAAG
601 TCGTCGGTAG GAGGTTTTCT CGGCGAACTG GCACAGAACA TACGTGCCAT GAATCGGTCA
661 TTGCACACAG ATACCAACAT GCTGACCGAA GGGGCGATGG TGGACAGAGC GAGGGCAAAA
721 GTACACAAAA TCATTAGGGA AGGGAATTTG GACTCTAGGG TATTTTCAAA CACGGGGAGC
781 AACACTATGT TGTCACTGTG GGTACCAGCA GTACCGGGAC CACCGGCAGT ACCGGAGCAT
841 TGGGACGTTG CGCCGTCTCT GTTCGTATGC AGACCGGGGA AAAAGGGGGG GATAAAGATC
901 ACACAAAGCG CATCAATGGC AGCATTAAAC CCATTATTTA GAGGCGCAGA CGTGGGGCCA
961 ATCGGGACAG CAGTCAGGGC GGATGTAAAC GCATTTTCAA TGAATGCAGT TCTGGGAGCA
1021 CTAAGAGCCG GGGGATTTAA CACCGAACAT TCCCTGGTGT CATTCTGTTGA ACCACTAATT
1081 CGGATCTTGC TAATGGGGGT ACAAACACAA GACAGGGGGG CCAGCCCATG GGATTGGGTT
1141 GGAGGGATGA GTTCGCGAAT AGTCAATCCC CTAGTATTCA CAACAAGCGG GAACTTCTTC
1201 CCAGGGGGAC CAAATTTGAG GGTGTGGGGA GCCAACGATA CAGTGGCCAG GATAGTAAAC
1261 GTTGAGGACT ACATGCGCGA GCGGGCCGGG GAGGGGAGGT TCGACGCTGG ATGGGGACCG
1321 GAATTCGGG GTGGGACAGG GGACGACGCA GTGGCGGTGG TACCGATAAG GGCAGTAGAA
1381 GCAGGGCTAG GAGAAGTAAA CGCAGGGTGG ACATTGGCAC ACATGGATA CCCAGTCAAG
1441 GTTAGACTAC TTGACGTCGA CGACCGAACA ATTGGACCAG GGGGGAGCCT GCCCCTAAAC
1501 GCAAACAGAG AATACACGGC GGCAGGAGCT ACGCATGTAC CCGGGCCCTA TGCCAGGGTA
1561 CTGTACGTCG TCGTGGACCA AAACGCAGAC AGGTGTGTGG GGGTGAAGAT GCAGGGACAG
1621 GGTGCTGTAA TTGACGTGGA TCCGGCGTTG AATTACGTGA TAGGGGGAGG GGATTTGGGG
1681 ATGTTGCCGT TGATACAGTG GAGTGTAGGG CTGGGGGCCG AGGACATGGC GCAGGGATCG
1741 ATTGCACAGA CGCAGCGATG GGTGAGGATG TATGGAAACG AGGACGATTG GGAATCAGCG
1801 TGGCATCTAG TGTCTAGCGC GTACACAGTG TACAGCCCGG CATTCAAGGAG ATCGGGTGTC
1861 GCAGTGGAGG GAGGATTCTG GCGCAACCA GCTGCAGGGG CAGCACCGTT TCCACTAGGA
1921 GGATTGGCAG GGTGGGTGAG GTACGACAAT CAGGCACGGG CGGCGCAGGT TGCACTTTGC
1981 AGAGAGAGGG CGGATATGGC GGAGTGTCTT TGGGGGGGGT ACAGGGAGAG AGGGGTGAGA
2041 CCGGGGAGTG TGGCAAACCT GCAGTACGTA AGGTTTCGATC CCACAGTGCC TGTAGGAGTA
2101 GCTGCTCACT TCTGGTCCGT AGTGAAGGTG ATGGTGGCTC CCGTCCCAGA CAGAGCGGCT
2161 GCTCTGGCGG ACATGGCGTG GGGGAAGGGG AAGGTGCAAG CCATGGGTGA GGATGTGATC
2221 AACGGGCAGA TGGGACAACC TGAGTCCATG ATGAGAGGGG TGGCGCTGAA CGAGAACCAG
2281 GGACTAGCGG CGGCTACAGT CAGGAGGGTG GTTGGGCTGG AGAACGAGTC GATGCAAACA
2341 ACGCACTGGA GTACAACGGA GGTAGCAATG AACGGGTACT ACGGGAGAGC AGGAGCAACA
2401 GCACACCACG CTGCATTTCC GTTGTCCGAG GGGGGGACAA TGCGAAAACG AATACCAGCT
2461 ATAGAGATGA GGGAGAACCG GGTGGAGGGG GACCTGATGA ACGATGATCT CTATTCAATT
2521 GGAACGGCAG CGGGGTACCT GGCGGTAGAG GGGATGGCAG GTGCGCAGGG GGGTATCTGG
2581 GACGTGGTCC AGTACCAGCT GCCTGGGCCT GACGATGAGG CGAGGGGGGT GATGAACACG
2641 GTGGGGGCGA TGGGGGGATG GACGAGGGCG GTGACACCAG TAGACAATGT GGCCACCATG
2701 AGGGACAACG GGGTTGAGGG GGAACCTTGT GGAATAGTGA TGCTCTTACC AACCAAGTGGG
2761 ACCGCTGTGG TGGATAGGTT AGCTAAITTC GGATTACCAC CAGCGAGGGC GGAATTAAGA
2821 GAAGTACCAT TTGGCGGGTA CCAAAGATCA GTCACAAACA CCAACCACAG AGTCAAGGTG
2881 AGTGTGAGTG GGGGGCGAGC AGTTGTTCAA AAAGGGAACA AAGCCGAGAT GAATCCAGTC
2941 TTTGTCAATA GGACACCAGG ACAAACGACC CTAGGCCAAC CAACAACAGA CACTACAGGG
3001 ATGACAACTG CAGATTTTTT AGATATATAG

```

Figura 3

MEPNTSVIATEQQQAAMREVEAEAAARDEVVEKIAFAEGAMMVQTRRLPS 50
 GKSSVGGFLGELAQNIRAMNRSLHTDTNMLTEGAMVDRARAKVHKI IREG 100
 NLDSRVFSNTGSNTMLSLWVPAVPGPPAVPEHWDVAPSWFVCRPGKKGGI 150
 KITQSASMAALNPLFRGADVGPIGTAVRADVNAFMSNAVLGALRAGGFNT 200
 EHSLSVSEPLIRILLMGVQTQDRGTSPWDWVGGMSSRIVNPLVFTTSGN 250
 FFPGGPNLRVWGANDTVARIVNVEDYMREAAGEGRFDAGWGPEFWGGTGD 300
 DAVAVVPIRAVEAGLGEVNAGWTLAHMEYPVKVRLLDVDDRTIGPGGSLP 350
 LNaNREYTAAGATHVPGPYARVLYVVVDQNADRCVGVVRVQGGGAVIDVDP 400
 ALNYVIGGADLGMLPLIQSVGLGAEDMAQGSIAQTQRWVRMYGNEDDWE 450
 SAWHLVSSAYTVYSPAFRRSGVAVEGGFWAQAAGAAPPPLGGLAGWVRY 500
 DNQARAAQVALCRERADMAECPWGGYRERGVPRGVSANWQYVRFDPTVAV 550
 GVAAHFWSVVKVMVAPVPDRAAALADMAWGKGVQAMGEDVINGQMGQPE 600
 SMMRGVALNENQGLAAATVRRRVGLENE SMQTTHWSTTEVAMNGYYGRAG 650
 ATAHHAAPPLSEGGMTRKRI PAIEMRENGVEGDLMNDDLYSIGTAAGYLA 700
 VEGMAGAQQGIWDVVQYQLPGPDDEARGVMNTVGAMGGWTRAVTPVDNVA 750
 TMRDNGVEGEPCGIVMSLPTSGTAVVDRLANFGLPPARAELREVPFGGYQ 800
 RSVTNTNHRVKVSVSGGRAVVQKGNKAEMNPVFNRTPGQTTLGQPTTDT 850
 TGMTTADFLDI *

Figura 4

```

3114
3121 CCAAAGCATT GGCCCAGGGA CGAGAAGAAG ATTGGATTAA GATAACCACC AATACTACAA ATGATAA
3181 AGATCAAATT GAAATCACTA AGGCCACTGG ATGGATGGGA GCATTCAGGA TGGGGACTGG
3241 GACTGAGGTT AGCCTTAGAA CTAGTTTCTG AGCCAACGAG AGAGACAATG TCAGGGGTAA
3301 TTAGACAAAT TAGGATAGGG AAGCTAGATC CAACCAAGGT ATTTAAATCA ATTAGTAACC
3361 AGGCGAAAGT TAGCGGGTGC GGGCTATGTA GGGAGTGGAA GGAGTACGTA AATTGGGAAT
3421 TACTAGGGGG GTACCAGATG ATAACAGCCC AACAGATGGG TGAAGAGGTA GCACACCAGG
3481 TGACCGAAAA GGCTAAAAGC GAGGAAGCGG GAAGCGATAG GATAAATAGG GCATTAGAAT
3541 CAATTTTAGG GCCACTAAGG GGTACATGCA CCGTACCGTG CTCACAAAGG GAATTTTTTAT
3601 TATGTAGGGA TAAATGGGCC AAAAAACAGT CCGGGTACAT AGGGTTAGGG CAAAATTTAG
3661 GCGCAGAGAA GATAGACGTA GCACTTAATT CAGACATCAA GGCCTGGAA AGGACTGGG
3721 AGGGAGAAAT CGAGAACAGA CCATTTATTA AAAGTGAACC AGGGAAAAGC AGGCCGGTAG
3781 TTAATAGTAA TATATCGTGT TACCTAAATT TAGAGTATGG GTGGGTAACC ATTA AAAAGA
3841 CACTGAAAAA ATACTTAGGC AAGAGGACAA CAATTTTCGA CGACGCAAGC CAAAAGGTAC
3901 TGTTATGGCA AGAAATGATA ATTGGAGCAG ATAACCATAG GGAGATTAAA GTGCCACTAG
3961 ACTACTCGCG GTTCGATTCA ACAATTGGGA AAACGCAAAT CATGAAGTGT GTTAGACTGC
4021 TATTAGACAT GGTGCGAGGT AACGACAATT GGAAAAGGTC AGTTACTGAA AGATTTCGAGA
4081 GACAAACGGT GTACATTGAC GGTTACGGAA AACTCAGGTG GGAAAACAGC GTACTTAGCG
4141 GATGGAGATG GACAAGTATA ATCACATCTG TAATAAATTT GGCCATTCTT AAGGCGACCG
4201 GAGCCGATGC GAGCGGAGTA GGGATTAAG TCCAGGGAGA TGATGTTAAA ATCAGCTTCC
4261 AAACAATTCG AGAAGCGGAA AGGTGTGTCTG AAGAAATTA CGCTTTAGGG TATGAAATTA
4321 ACCCGGGTAA AGTATTTGCG TCAAGGAAAA GGGACGAGTA TCTCAGGATG GTAGCGGAAG
4381 AGGGGAAAAAT GGCAGGTTAT GTAATTAGGT GTCTACCGAA AATTGTATTT ACATCACCAA
4441 CAGAAGAGGT TACCACATGG GAAGAACGAA TTAGGGGAAC AGTGTCAAAA TGGATGAGGG
4501 TGTTATCACG GGGGGGGGAT AGGGAAGTAG CTAATATTTG GATGAAACGC GATTTGTGTG
4561 GATTGAGTGG AGAGAATTCG GAATTAATAG ATAGCTGGTT ACGTACTCCA GCATCCGTGG
4621 GGGGGGGTGG TTGTGCATGG TTAGTTGGGG AGGGAAATTT GTGGACGGGA TTAGTACTTA
4681 GGGAACAGGA GGAAGCAGAA GTGGTGGAGC GTTCAAATCA CAAAATGATG TCGGATTACG
4741 GGGGTCAGT TCCTGCCCGT AGATGGATCA AGAGTGTGAC GAAGGGCGCA AAACCGGCTT
4801 TTGGGTTCAA GAGGATAGAG AGGGTAAAGC CACTAGGGAA CTGGTTAAAA GATCTAAGGC
4861 CAGTGGCGGA ATCAATTAAA TCAATTAGTG ACTTAGTCGA AACATCACAG GTACCAAAT
4921 TCAGATTTAA GGAAATTTAT GATTGGACAC CATTATGTTG ACACAAGAGG AACCGCTCA
4981 TAGAAGAAAA GAACTGGGAC AAATTGTGCT CGCTTTATCA TAATGAAGGG GAAGTGAGAC
5041 TATATAAAAG GATATTACCC AGGTGGATGT GGCTGAGTAT GATAAAAAAT GAGTTAACAT
5101 GGGTAAGTAT GCCACCAAAC ATTGCTAATT CGGAAGTTGC TTCACTTGCA AAAGAAAAGAG
5161 TGGAGTACAA AGTGTGAGT AAAGTATTGA GGTATCACCG AACCGTCTCA AGAGAAAACGC
5221 TCACTCGTTT TTCTATTGGT GGGGAGTATG TACTGAGTGC TAAACTCAAC GACAGGCAAA
5281 GGATATTACA GTAG

```

Figura 5

MITKALAQGREEDWIKITTNNTTKIKLKSRLPLDGWEHSGWGLGLRLALEL 50
VSEPTRETMSGVIRQIRIGKLDPTKVFKSISNQAQVSGCGLCREWKEYVN 100
WELGGYQMITAQQMGEEVAHQVTEKAKSEEAGSDRINRALESILGPLRG 150
TCTVPCSQREFLLCRDKWAKNTSGYIGLGQNLGRQKIDVALNSDIKALER 200
MMEGEFENRPFKSEPGKSRPVVNSNISCYLNLEYGWTIKKTLKKYL GK 250
RTTIFDDASQKVLLWQEMIIGADNHREIKVPLDYSRFDSTIGKTQIMKCV 300
RLLLDMVRGNDNWKR SVTERFERQTVYIDGYGKLRWENSVLSGWRWTSII 350
TSVINLAILKATGADASGVGIKVQDDVKISFQTIREAERCVEEINALGY 400
EINPGKVFASRRDEYLRMVAEEGKMAGYVIRCLPKIVFTSPTEEVTTWE 450
ERIRGTVSKWMRVLSRGGDREVAKYWMKRDLCGLSGENSELIDSWLRTPA 500
SVGGGGCAWLLGEGNLWTGLVLRQEEAEVVERSNHKMMSDYGGSPARR 550
WIKSVTKGAKPAFGFKRIERVKPLGNWLKDLRPVAESIKSISDLVETSQV 600
PKFRFKEIYDWT PFMVHKRNALIEEKNWDKLC SLYHNEGEVRLYKRILPR 650
WMWLSMIKNELTWVSMPPNIANSEVASLAKERVEYKVL SKVLRYHRTVSR 700
ETLTRFSIGGEYVLSAKLNDRQRILQ*

Figura 6

```

5542                ATGTCAAAC AAGATGAAGA GTTTTTACT GGTGCTTTTA
5581 TGTTTGTGTG TAGGGGAAGG GATTGTTCCA ATG TTCAGGC GAGAATGGTG TTTGTGCACT
5641 GCAGGGAATG CGAGAGTACC CTTGGTGGGA GAGGGAAGGG CTGAGAAGAT CGAGCTATTC
5701 AATCAGAGCG CCACATGTGG GAAGAAAGAG CTAATAATAA CGTGAAGGG AAAGAGGTGG
5761 TGCTACGATA TTGAGAGCAA GCGAGGAAA A TACTAGTAA AGACACTGAG CGGAGGGGGA
5821 CATCTGGAAC GAGAGGGAAA GGGGTACAAG TTAGTTAGGA ACGGGTCCA TCTTGCTTCA
5881 TTCGGGGTA AAAAAGAGGA AATACAGGAT TCAAGTCACA TAGAGAAAGT AAACGGGAAA
5941 GACGCGATAG TTAAGAAAGG GCAACACGTA GAACATCTTC CAGGGGGGAA CGATTTAATT
6001 GTTACAGAGG GCGGGAACCT GTGTGGGAAC GTGGGGTCT TCGATAATAC GCAGTGTACA
6061 TACAACAGTG TTATAAATAT AGGAGGGGGA AGTGTGACA ATTCACAAGA AGCCAAGAAC
6121 GATAAATCAA ACACAATTGA CAATTTAATT GATATGTTAC CTTTAGTTGT AGGAATAGCC
6181 GGGGGCTGTC TCATAGTGAT AGTAGTCTTA TACTTAACAA TTAAATACTG TAAATGCAAG
6241 AAGAAGAGGA CCAACCCAGA ACCAGCGGAA CCGGAGGAAC ACGAGATGAG GGATCTCAGG
6301 AGAAGGTTAG AGCCACGCC TCCATACCAA AGACAGATGG GTGTTGAGTT TGAAATAAAT
6361 GAAGCTCTCG AATTCATGGG CGTCGAAGGG AGTGAAAGCC CAGACTCAGG ATGTCAGTCA
6421 GATGAAGAGG GATTCAGAGT AGGAGTCTAG

```

Figura 7

MSNKMKSFLLVLLCLCVGEGIVPMFRREWCLCTAGNARVPLVGEGRAEKI 50
ELFNQSATCGKKELIITWKGKRWCYDIESKRGKILVKTLSGGGHLEREGK 100
GYKLVRNGFHLASFGGKKEEIQDSSHIEKVNGKDAIVKKGQHVEHLPGGN 150
DLIVTEGGNLCGNVGFDDNTQCTYNSVINIGGSVDNSQEAKNDSNTID 200
NLIDMLPLVVGIAGGCLIVIVVLYLTIKYCKCKKKRTNPEPAEPEEHMR 250
DLRRRLEPRPPYQRQMGVEFEINEALEFMGVEGSESPDSGCQSDEEGFRV 300
GV*

Figura 8

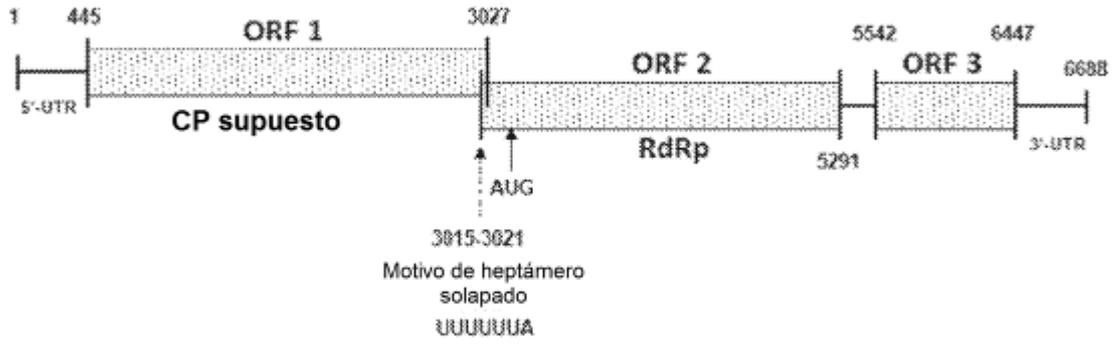


Figura 9A

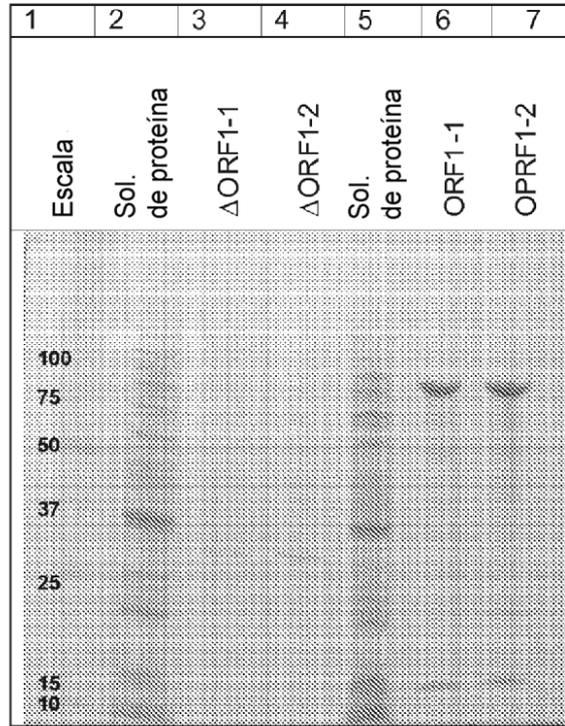


Figura 9B

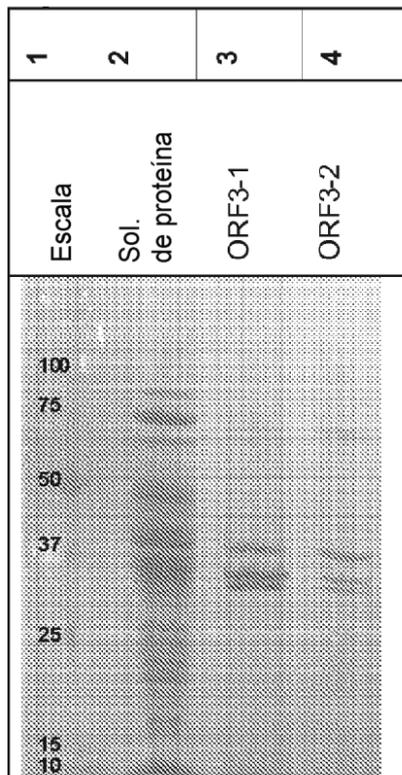


Figura 12

