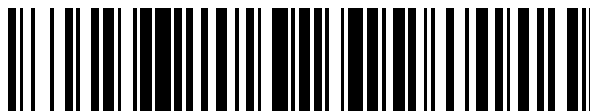


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 570**

21 Número de solicitud: 201730260

51 Int. Cl.:

**C07K 14/145** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**27.02.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.08.2018**

71 Solicitantes:

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y  
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)  
(100.0%)  
C<sup>a</sup> DE LA CORUÑA, KM.7,5  
28040 MADRID ES**

72 Inventor/es:

**GÓMEZ-CASADO, Eduardo y  
CHINCHILLA RODRÍGUEZ, Blanca**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Variantes de la proteína no viriónica del virus de la hemorragia septicémica viral y su uso en el tratamiento de desórdenes proliferativos.**

57 Resumen:

Variantes de la proteína no viriónica del virus de la hemorragia septicémica viral y su uso en el tratamiento de desórdenes proliferativos.

La presente invención se refiere a polipéptidos virales derivados de la proteína no viriónica (NV) procedentes del virus *Oncorhynchus 2* novirhabdovirus, (conocido como virus de la hemorragia septicémica viral, VHSV), y al uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades que cursen con desórdenes proliferativos, en particular, para el tratamiento del cáncer y la metástasis. Igualmente, los polipéptidos de la presente invención son útiles para inhibir in vitro la proliferación celular, así como la actividad de proteínas inflamatorias y proteínas reguladoras del ciclo celular. Asimismo, también se incluyen dentro de la presente invención la composición farmacéutica y el kit que comprende dichos péptidos.

ES 2 679 570 A1

**VARIANTES DE LA PROTEINA NO VIRIÓNICA DEL VIRUS DE LA HEMORRAGIA  
SEPTICÉMICA VIRAL Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE DESÓRDENES  
PROLIFERATIVOS**

5

**DESCRIPCIÓN**

La presente invención se refiere a un conjunto de polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la proteína no viriónica (NV) del virus *Oncorhynchus 2 novirhabdovirus*, (conocido como virus de la hemorragia septicémica viral, VHSV) que comprende la SEQ ID NO: 2, y dichos polipéptidos comprenden, además, al menos una sustitución del aminoácido natural presente en cualquiera de las posiciones 33 a 41 de dicha SEQ ID NO: 2, por el aminoácido alanina (A). Dichos polipéptidos son útiles para el tratamiento de enfermedades que cursen con proliferación celular, en particular, para el tratamiento del cáncer y la metástasis. Por lo tanto, la presente invención se incluye dentro del campo de la biología, biología molecular y medicina, en particular, en el campo del tratamiento del cáncer, así como de cualquier desorden proliferativo.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

20

Los tumores aparecen debido a desregulaciones en los programas de proliferación celular, diferenciación y muerte, teniendo un papel determinante el sistema inmune y los procesos de inflamación crónica. Las cascadas de señalización MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) están implicadas en proliferación celular, diferenciación y supervivencia o muerte celular. En mamíferos se han caracterizado cuatro vías MAPK cuyas kinasas terminales son ERK1/2, JNK1/2/3, p38 kinasas y ERK5. Estas MAPKs activan sustratos que ejercen diversas funciones como la regulación de la transcripción génica y regulación del ciclo celular resultando en un aumento de la proliferación. En el estudio de la progresión de tumores, se ha establecido el papel determinante de la vía en la que participa ERK, y los señalizadores previos en la progresión del cáncer (Shields, J.M., *et al.*, Trends Cell Biol, 2000. 10(4): 147-54) denominándose la vía RAS-RAF-MEK-ERK. Se ha estimado que ERKs pueden regular las actividades de 160 proteínas (Yoon, S. y R. Seger. Growth Factors, 2006. 24(1): 21-44) que se localizan en orgánulos, citoplasma y mayoritariamente en el núcleo. Cuando se activa ERK, éste transloca al núcleo donde regula varios factores

35

de transcripción dando lugar a cambios de expresión génica (Zuber, J., *et al.*, Nat Genet, 2000. 24(2): 144-52; Schulze, A., *et al.*, Mol Biol Cell, 2004. 15(7): 3450-63).

5 En muchos tipos de cáncer, la vía RAS–RAF–MEK–ERK está desregulada con una actividad en exceso debido a la mutación de alguno de sus componentes, tales como por ejemplo, las proteínas EGFR, RAS y RAF, lo que conduce a una proliferación descontrolada. Las mutaciones en el gen que codifica para B-RAF (BRAF) causan el 70% de los tumores de melanoma estudiados y en menor medida otros tumores (Davies, H., *et al.*, Nature, 2002. 417(6892): 949-54).

10

Uno de los objetivos principales en el tratamiento del cáncer es disminuir la desregulación de la proliferación mediante la inhibición de los señalizadores iniciales, medios y finales, y así promover la apoptosis para la eliminación de las células tumorales. Se han desarrollado diferentes inhibidores para distintos señalizadores como A-RAF, BRAFV600E o MEK quinasas (Tabla 1), pero a lo largo del tiempo las células tumorales generan resistencia a dichos tratamientos, dejando por tanto de ser útiles. En el melanoma, la resistencia al tratamiento aparece al año, mientras que en los carcinomas de colon dicha resistencia aparece desde el inicio del tratamiento porque hay una retroalimentación por la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Sun, C., *et al.*, Nature, 2014. 508(7494): 118-22). Más recientemente, se han obtenido compuestos que inhiben ERK (Tabla 1) y que son funcionales en células con mutaciones BRAF, resistentes a otros inhibidores (Morris, E.J., *et al.*, Cancer Discov, 2013. 3(7): 742-50). Sin embargo, el estudio con mayor número de casos ha demostrado que también muestran resistencia a la inhibición debido a mutaciones en ERK (Jha, S., *et al.*, Mol Cancer Ther, 2016. 15(4): p. 548-59).

15

20

25

**Tabla 1.** Inhibidores utilizados en la vía RAS-RAF-MEK-ERK.

Compuesto	Empresa	Proteína - diana	Ensayo clínico	Tipo de cáncer
Sorafenib (Nexavar)	Bayer/Onyx	B-Raf, Raf-1	Fase aprobada II-II	RCC avanzado, NSCLC, Páncreas, Melanoma, Ovarios, AML, Hematológico
Raf265 (CHIR-265)	Novartis	A-Raf, B-Raf, c-Raf-1	Fase I	Melanoma
PLX4032	Roche/	Mutante B-	Fase I	Cáncer

Compuesto	Empresa	Proteína - diana	Ensayo clínico	Tipo de cáncer
	Plexxikon	Raf(V600E)		
PD0325901	Pfizer	MEK,MEK2	Fase II	Mama, CRC, NSCLC, Melanoma
AZD6244	AstraZeneca /Array	MEK,MEK2	Fase II	NSCLC, Melanoma, Páncreas, Inflamación
ARRY-142886	BioPharma			
ARRY-438162	Array BioPharma	MEK, MEK2	Fase I	Artritis reumatoide
SCH772984		ERK1/ERK2		
VX-11e		ERK2		
Ulixertinib (BVD-523, VRT752271)		ERK2	Fase I	Páncreas
GDC-0994		ERK1/ERK2	Fase I	Metástasis/ Tumores sólidos
FR 180204		ERK1/ERK2		

AML: *Acute Myelogenous Leukemia*; CRC: *Colorectal cancer*; MEK: *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase*; NSCLC: *non-small-cell lung cancer*; RCC: *renal cell cancer*.

- 5 Como se ha comentado anteriormente, además del desbalance existente en las vías MAPK y sus kinasas efectoras, en la proliferación celular y crecimiento tumoral existe además un desbalance entre las diferentes fases del ciclo celular, sus proteínas promotores del mismo (ciclinas A, B, D y E), y los inhibidores de kinasas de las ciclinas (CDKs), propiciando una división celular descontrolada. En este sentido, se ha
- 10 determinado una sobreexpresión de la ciclina B1 en tumores de mama, cáncer cervical, gástrico, colorrectal y pulmón (Banerjee, S.K., *et al.*, *Am J Pathol*, 2000. 156(1): 217-25; Wang, A., *et al.*, *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997. 123(2): 124-7; Zhao, M., *et al.*, *Exp Oncol*, 2006. 28(1): 44-8), siendo este incremento de ciclina B1 un
- 15 factor de mal pronóstico en varios tipos de cáncer, incluido el de mama (Soria, J.C., *et al.*, *Cancer Res*, 2000. 60(15): 4000-4; Suzuki, T., *et al.*, *Cancer Sci*, 2007. 98(5): 644-51; Nozoe, T., *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2002. 8(3): 817-22). Además, la sobreexpresión de ciclina B1 está involucrada en la resistencia a radioterapia en carcinoma de cabeza y cuello (Hassan, K.A., *et al.*, *Cancer Res*, 2002. 62(22): 6414-7). Estudios realizados en células de cáncer de mama y cérvix mostraron que la disminución de ciclina B1

mediante inhibición transcripcional (inhibición por siRNA) conducía a una menor proliferación celular y mayor sensibilización de las células a compuestos proapoptóticos (Androic, I., *et al.*, BMC Cancer, 2008. 8: 391). Alternativamente a la disminución de la proliferación celular, se observó que la inhibición de ciclina B1  
5 también induce un aumento del número de células en la fase G2/M, sugiriendo un arresto en este punto del ciclo celular (Androic, I., *et al.*, BMC Cancer, 2008. 8: 391).

El papel de la ciclina B1 como promotor de la proliferación celular en cáncer se ha puesto de manifiesto en otros estudios. Así, se ha establecido relación inversa entre la  
10 concentración del microRNA miR-379, la concentración de ciclina B1 y el pronóstico de cáncer de mama. Los pacientes con cáncer de mama mostraban menos concentración de miR-379 que los controles, y esta concentración disminuía aún más en estadios avanzados de la enfermedad. Además, se observó que a menor concentración de miR-379 se incrementaba la concentración de ciclina B1 (Khan, S.,  
15 *et al.*, PLoS One, 2013. 8(7): e68753).

En vista de lo expuesto en los párrafos anteriores, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar nuevos compuestos alternativos a los descritos en el estado de la técnica, capaces de inhibir la proliferación celular, actuando tanto sobre  
20 las proteínas de las vías de las MAPKs, como sobre las proteínas del ciclo celular, que sean capaces de disminuir la resistencia a los tratamientos ya utilizados en desórdenes proliferativos, tales como el cáncer, y de mejorar la eficacia de tratamientos clásicos como la radioterapia.

## 25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han descubierto que variantes (también denominadas mutantes) de la proteína no viriónica (NV) del virus *Oncorhynchus 2 novirhabdovirus*, (conocido como virus de la hemorragia septicémica viral, VHSV) que comprende la SEQ ID NO: 2, y  
30 que es codificada por la secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 1, inhibe la expresión génica y proteica de genes y proteínas implicados en la proliferación celular y en el ciclo celular, tales como proteínas de la vía MAPK, proteínas inflamatorias y ciclinas, respectivamente. Adicionalmente, las variantes de la proteína NV del virus VHSV descritas en la presente invención inducen un incremento  
35 en la muerte celular de las células que las expresan y por lo tanto, dichas variantes pueden ser útiles en el tratamiento de desórdenes proliferativos, tales como el cáncer,

utilizándose en terapias antitumorales bien solas y/o en combinación con otras terapias antitumorales. Las variantes descritas en la presente invención son capaces de mejorar la efectividad de los tratamientos antitumorales, incluyendo aquellos resistentes a la radioterapia.

5

Para demostrar la efectividad de las variantes polipeptídicas descritas en la presente invención, los inventores transfectaron diferentes líneas celulares tumorales y no-tumorales con un vector conteniendo los diferentes polipéptidos aquí descritos, y observaron que la expresión de dichas variantes inhibía la actividad de proteínas de la vía MAPK, proteínas inflamatorias y ciclinas, y como consecuencia de dicha inhibición, se producía un menor proliferación celular y también se induce un incremento en la muerte celular.

10

El empleo de las variantes polipeptídicas descritas en la presente invención tienen la ventaja añadida de que es posible unirles secuencias de internalización celular para que, cuando son administrados a un individuo, estos puedan internalizarse en la célula para ejercer su efecto sin necesidad de emplear técnicas de terapia génica.

15

En base a este descubrimiento, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que se describen a continuación.

20

#### *Polipéptidos de la invención*

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con variantes polipeptídicas de la proteína NV del virus VHSV que comprende la SEQ ID NO: 2, y que es codificada por la secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 1, donde dichas variantes polipeptídicas comprenden al menos un 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

25

En el contexto de la presente invención se entiende por polipéptido a aquella molécula formada por la unión, en un orden definido, de alfa-aminoácidos mediante un enlace peptídico, e incluye modificaciones o derivados del mismo, por ejemplo, glicosilación, fosforilación, acetilación, amidación, etc. Los aminoácidos del polipéptido de la invención, en función de la orientación del grupo amino que lleva el átomo de carbono alfa, pueden pertenecer a la serie L o a la serie D.

35

El polipéptido de la invención puede obtenerse por técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica, tales como síntesis química, recombinación genética, expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención, etc. Todas estas técnicas son práctica de rutina para el experto en la materia.

5

Adicionalmente, los extremos carboxilo y amino terminal del polipéptido de la invención pueden estar protegidos contra la proteólisis. Por ejemplo, el extremo amino terminal puede estar en forma de grupo acetilo y/o el extremo carboxilo terminal puede estar en forma de grupo amida. También cabe la posibilidad de llevar a cabo modificaciones internas de los péptidos para que sean resistentes a la proteólisis. Ejemplos de estas modificaciones internas incluyen, sin limitar a, modificaciones en las que al menos un puente peptídico –CONH– se modifica y reemplaza por un enlace reducido (CH<sub>2</sub>NH), un enlace retroinverso (NHCO), un enlace oximetileno (CH<sub>2</sub>-O), un enlace tiometileno (CH<sub>2</sub>-S), un enlace cetometileno (CO-CH<sub>2</sub>), un enlace hidroxietileno (CHOH-CH<sub>2</sub>), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o un enlace –CH=CH–. Los péptidos también pueden estabilizarse por cruzamiento intramolecular, por ejemplo, mediante la modificación al menos de dos residuos de aminoácidos con cadenas laterales de oleofina, preferiblemente, cadenas alqueno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, preferiblemente, cadenas pentel-2-il, seguidas de un entrecruzamiento de las cadenas tal como se describe en la tecnología denominada “staple” (Walensky et al., 2004, Science 205: 1466-1470). Todos estos péptidos modificados de forma química para resistir a la proteólisis también están contemplados dentro de la presente invención.

Modificaciones adicionales al polipéptido de la invención comprenden la unión covalente a una molécula de polietilenglicol (PEG) por su extremo carboxilo terminal o a un residuo de lisina, con la finalidad de disminuir su eliminación urinaria y la dosis terapéutica, y de incrementar la vida media del polipéptido en el plasma sanguíneo. La vida media del polipéptido también puede incrementarse mediante la inclusión del polipéptido en un material polimérico biodegradable y biocompatible para formar microesferas que son empleadas como un sistema de administración de fármacos. Polímeros y copolímeros incluyen, sin limitar a, poli (D, L-lactido-co-glicólico) o PLGA. Las técnicas y procedimientos de cómo fabricar microesferas o nanocápsulas lipídicas para su empleo en la administración de fármacos son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Cualquier método de administración de fármacos dirigidos selectivamente a una población tumoral puede ser empleado en el contexto de la presente invención.

5 A efectos de la presente invención, el término "variante" o "mutante" utilizados indistintamente a lo largo de la presente invención y referidos a las proteínas NV de los virus VHSV y que tienen al menos una mutación, según se describe en la presente invención y que resultan en una mayor actividad en la inhibición de la proliferación celular, modificando la expresión de proteínas de la ruta MAPK y del ciclo celular, así como en un incremento de la muerte celular, respecto de la proteína NV de tipo salvaje (*wild-type*) del virus VHSV.

10 Las variantes o mutantes polipeptídicas de la proteína NV del virus VHSV descritas en la presente invención, comprenden la sustitución del aminoácido natural presente en cualquiera de las posiciones 33 a 41 de la SEQ ID NO: 2, por el aminoácido alanina (A), dando lugar a las variantes descritas en la Tabla 2.

15 **Tabla 2.**

Nombre	Mutación	Secuencia nucleotídica	Secuencia polipeptídica
wt-NV VHSV	-	SEQ ID NO: 1 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCAACTGTGACTTTGATCGG TCGGACATATCCACCGTGG ACTTCTTTGAAACGACCCTC CCCAGGATCCTAGATGATCT GAGGGCCAGTACACGGCTT CCTCACCTCCATGTGCTCG ACATGAGGATAAGTCTCCTA GAGAGAACCCACTACATGTT CAGGAACGTCCCCTCTAGT CCCGCCACAACCGGTAGGC TGACAGATCCTGGACTCGT CATCATTTACATGCAGAGG	SEQ ID NO: 2 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNY <b>LNCDF</b> <b>DRSD</b> ISTVDFFETTLPRILD DLRASTRLPHLHVLDMRIS LLERTHYMFRNVPPSPAT TGRLTDPGLVIISHAEVGLL TRGSG LTS)



Nombre	Mutación	Secuencia nucleotídica	Secuencia polipeptídica
		TGGGGCTATTGACAAGAGG CTCTGGGCTCACCTCCTGA)	
NV33	L33A	SEQ ID NO: 3 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACg ctAACTGTGACTTTGATCGGT CGGACATATCCACCGTGGA CTTCTTTGAAACGACCCTCC CCAGAATCCTAGATGATCTG AGGGCCAGTACACGGCTTC CTCACCTCCATGTGCTCGA CATGAGGATAAGTCTCCTAG AGAGAACCCACTACATGTTC AGGAACGTCCCCTCTAGTC CCGCCACAACCGGTAGGCT GACAGATCCTGGACTCGTC ATCATTTCACATGCAGAGGT GGGGCTATTGACAAGAGGC TCTGGGCTCACCTCCGCTA GCTCCGGAGTTTAA)	SEQ ID NO: 4 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNY <u>A</u> NCDF FDRSDISTVDFFETTLPRIL DDLRASTRRLPHLHVLDMRI SLLERTHYMFRNVPSSPA TTGRLTDPGLVIISHAEVG LLTRGSGLTSASSGV)
NV34	N34A	SEQ ID NO: 5 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCGCCTGTGACTTTGATCG GTCGGACATATCCACCGTG GACTTCTTTGAAACGACCCT CCCCAGAATCCTAGATGATC TGAGGGCCAGTACACGGCT	SEQ ID NO: 6 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNY <u>L</u> ACDF DRSDISTVDFFETTLPRILD DLRASTRRLPHLHVLDMRIS LLERTHYMFRNVPSSPAT TGRLTDPGLVIISHAEVGLL TRGSGLTSASSGV)

ES 2 679 570 A1

Nombre	Mutación	Secuencia nucleotídica	Secuencia polipeptídica
		TCCTCACCTCCATGTGCTCG ACATGAGGATAAGTCTCCTA GAGAGAACCCACTACATGTT CAGGAACGTCCCCTCTAGT CCCGCCACAACCGGTAGGC TGACAGATCCTGGACTCGT CATCATTTACATGCAGAGG TGGGGCTATTGACAAGAGG CTCTGGGCTCACCTCCGCT AGCTCCGGAGTTTAA)	
NV35	C35A	SEQ ID NO: 7 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCAACGCCGACTTTGATCG GTCGGACATATCCACCGTG GACTTCTTTGAAACGACCCT CCCAGAAATCCTAGATGATC TGAGGGCCAGTACACGGCT TCCTCACCTCCATGTGCTCG ACATGAGGATAAGTCTCCTA GAGAGAACCCACTACATGTT CAGGAACGTCCCCTCTAGT CCCGCCACAACCGGTAGGC TGACAGATCCTGGACTCGT CATCATTTACATGCAGAGG TGGGGCTATTGACAAGAGG CTCTGGGCTCACCTCCGCT AGCGCTAGCTCCGGAGTTT AA)	SEQ ID NO: 8 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNYLN <u>A</u> DF DRSDISTVDFEFTLPRILD DLRASTRPLHLHVLDMRIS LLERTHYMFRNVPSSPAT TGRLTDPGLVIISHAEVGLL TRGSLTSASASSGV)
NV36	D36A	SEQ ID NO: 9 (ATGGCGACCCAACCCGGG	SEQ ID NO: 10 (MATQPGLSTTSFSPLVLR

ES 2 679 570 A1

Nombre	Mutación	Secuencia nucleotídica	Secuencia polipeptídica
		CTCAGCACAAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCAACTGT <sub>gct</sub> TTTGATCGGT CGGACATATCCACCGTGGA CTTCTTTGAAACGACCCTCC CCAGAATCCTAGATGATCTG AGGGCCAGTACACGGCTTC CTCACCTCCATGTGCTCGA CATGAGGATAAGTCTCCTAG AGAGAACCCACTACATGTTC AGGAACGTCCCCTCTAGTC CCGCCACAACCGGTAGGCT GACAGATCCTGGACTCGTC ATCATTTCACATGCAGAGGT GGGGCTATTGACAAGAGGC TCTGGGCTCACCTCCGCTA GCTCCGGAGTTTAA)	EMITHRLKFDPSNYLNCA <u>F</u> DRSDISTVDFEFETTLPRILD DLRASTRRLPHLHVLDMRIS LLERTHYMFRNVPSSPAT TGRLTDPGLVIISHAEVGLL TRGSGGLTSASSGV)
NV37	F37A	SEQ ID NO: 11 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCAACTGTGACGCCGATCG GTCGGACATATCCACCGTG GACTTCTTTGAAACGACCCT CCCAGAAATCCTAGATGATC TGAGGGCCAGTACACGGCT TCCTCACCTCCATGTGCTCG ACATGAGGATAAGTCTCCTA GAGAGAACCCACTACATGTT CAGGAACGTCCCCTCTAGT                 )	SEQ ID NO: 12 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNYLNCD <u>A</u> DRSDISTVDFEFETTLPRIL DDLRASTRRLPHLHVLDMRI SLLERTHYMFRNVPSSPA TTGRLTDPGLVIISHAEVG LLTRGSGGLTSASSGV)

ES 2 679 570 A1

Nombre	Mutación	Secuencia nucleotídica	Secuencia polipeptídica
		CCCGCCACAACCGGTAGGC TGACAGATCCTGGACTCGT CATCATTTACATGCAGAGG TGGGGCTATTGACAAGAGG CTCTGGGCTCACCTCCGCT AGCTCCGGAGTTTAA)	
NV38	D38A	SEQ ID NO: 13 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCAACTGTGACTTTGCCCG GTCGGACATATCCACCGTG GACTTCTTTGAAACGACCCT CCCCAGAATCCTAGATGATC TGAGGGCCAGTACACGGCT TCTCACCTCCATGTGCTCG ACATGAGGATAAGTCTCCTA GAGAGAACCCACTACATGTT CAGGAACGTCCCCTCTAGT CCCGCCACAACCGGTAGGC TGACAGATCCTGGACTCGT CATCATTTACATGCAGAGG TGGGGCTATTGACAAGAGG CTCTGGGCTCACCTCCGCT AGCTCCGGAGTTTAA)	SEQ ID NO: 14 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNYLNCDF <u>A</u> RSDISTVDFFETTLPRILD DLRASTRPLHLHVLDMRIS LLERTHYMFRNVPSSPAT TGRLTDPGLVIISHAEVGLL TRGSGLTSASSGV)
NV39	R39A	SEQ ID NO: 15 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCAACTGTGACTTTGATgctT	SEQ ID NO: 16 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNYLNCDF <u>D</u> ASDISTVDFFETTLPRILD DLRASTRPLHLHVLDMRIS LLERTHYMFRNVPSSPAT TGRLTDPGLVIISHAEVGLL

Nombre	Mutación	Secuencia nucleotídica	Secuencia polipeptídica
		CGGACATATCCACCGTGGA CTTCTTTGAAACGACCCTCC CCAGAATCCTAGATGATCTG AGGGCCAGTACACGGCTTC CTCACCTCCATGTGCTCGA CATGAGGATAAGTCTCCTAG AGAGAACCCACTACATGTTC AGGAACGTCCCCTCTAGTC CCGCCACAACCGGTAGGCT GACAGATCCTGGACTCGTC ATCATTTACATGCAGAGGT GGGGCTATTGACAAGAGGC TCTGGGCTCACCTCCGCTA GCTCCGGAGTTTAA)	TRGSGELTSASSGV)
NV40	S40A	SEQ ID NO: 17 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCAACTGTGACTTTGATCGG GCCGACATATCCACCGTGG ACTTCTTTGAAACGACCCTC CCCAGAATCCTAGATGATCT GAGGGCCAGTACACGGCTT CCTCACCTCCATGTGCTCG ACATGAGGATAAGTCTCCTA GAGAGAACCCACTACATGTT CAGGAACGTCCCCTCTAGT CCCGCCACAACCGGTAGGC TGACAGATCCTGGACTCGT CATCATTTACATGCAGAGG TGGGGCTATTGACAAGAGG CTCTGGGCTCACCTCCGCT	SEQ ID NO: 18 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNYLNCDF DR <u>A</u> DISTVDFEFTLPRILD DLRASTRPLHLHVLDMRIS LLERTHYMFRNVPSSPAT TGRLTDPGLVIISHAEVGLL TRGSGELTSASSGV)

Nombre	Mutación	Secuencia nucleotídica	Secuencia polipeptídica
		AGCTCCGGAGTTTAA)	
NV41	D41A	SEQ ID NO: 19 (ATGGCGACCCAACCCGGG CTCAGCACAACCAGCTTCTC TCCGCTCGTCCTCCGTGAG ATGATCACACACAGACTCAA ATTTGACCCAAGCAACTACC TCAACTGTGACTTTGATCGG TCGg <sub>cc</sub> ATATCCACCGTGGA CTTCTTTGAAACGACCCTCC CCAGAATCCTAGATGATCTG AGGGCCAGTACACGGCTTC CTCACCTCCATGTGCTCGA CATGAGGATAAGTCTCCTAG AGAGAACCCACTACATGTTC AGGAACGTCCCCTCTAGTC CCGCCACAACCGGTAGGCT GACAGATCCTGGACTCGTC ATCATTTACATGCAGAGGT GGGGCTATTGACAAGAGGC TCTGGGCTCACCTCCGCTA GCTCCGGAGTTTAA)	SEQ ID NO: 20 (MATQPGLSTTSFSPLVLR EMITHRLKFDPSNYLNCDF DRS <u>A</u> ISTVDFFETTLPRILD DLRASTRPLPHLVLDMRIS LLERTHYMFRNVPSSPAT TGRLTDPGLVIISHAEVGLL TRGSGELTSASSGV)

- 5 Por lo tanto, la invención se refiere a un polipéptido, a partir de aquí polipéptido de la invención, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y además comprende al menos una sustitución del aminoácido natural entre las posiciones 33 a 41 de la SEQ ID NO: 2 por el aminoácido alanina (A), o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
- 10 En una realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 41 (D41A). En una realización más preferida

el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 20, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

5 En otra realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido leucina (L) original por alanina (A) en la posición 33 (L33A). En una realización más preferida el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 4, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

10

En otra realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido asparagina (N) original por alanina (A) en la posición 34 (N34A). En una realización más preferida el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 6, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

15

En otra realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido cisteína (C) original por alanina (A) en la posición 35 (C35A). En una realización más preferida el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 8, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

20

En otra realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 36 (D36A). En una realización más preferida el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 10, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

25

30

En otra realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido leucina (L) original por fenilalanina (F) en la posición 37 (F37A). En una realización más preferida

35

el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 12, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

5 En otra realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 38 (D38A). En una realización más preferida el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 14, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

10

En otra realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido arginina (R) original por alanina (A) en la posición 39 (R39A). En una realización más preferida el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 16., o una variante funcionalmente equivalente de la misma

15

En otra realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y comprende además una sustitución del aminoácido serina (S) original por alanina (A) en la posición 40 (S40A). En una realización más preferida el polipéptido de la invención se caracteriza por que comprende la SEQ ID NO: 18, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

20

25 En otra realización más preferida aún, el polipéptido de la invención se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, o una variante funcionalmente equivalente de las mismas. Más preferiblemente, el polipéptido de la invención comprende la SEQ ID NO: 20, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

30

La familia de virus Rhabdoviridae, particularmente el género Novirhabdovirus, agrupa a cuatro especies denominadas *Oncorhynchus 1 novirhabdovirus* (conocido como virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, IHNV), *Oncorhynchus 2 novirhabdovirus* (conocido como virus de la hemorragia septicémica viral, VHSV), *Hirame novirhabdovirus* (HIRV) y *Snakehead novirhabdovirus* (SHRV). Las infecciones por virus de este género afectan a más de 50 especies de peces silvestres

35



(Brudeseth, B.E. y O. Evensen, *Dis Aquat Organ*, 2002. 52(1): 21-28) y de piscifactoría (Skall, H.F., *et al. J Fish Dis*, 2005. 28(9): 509-529), produciendo grandes pérdidas económicas en especies comerciales. Los novirhabdovirus son virus RNA de polaridad negativa cuyo genoma codifica para cinco proteínas del virión (N, P, M, G y L) y para la proteína NV. La presencia del gen que codifica para la proteína NV es característica común a todos los virus pertenecientes a este género, y por eso se les ha clasificado con el nombre de novirhabdovirus, al contrario que otros rhabdovirus, tales como el virus SVCV (virus primaveral de la carpa) que carece de la proteína NV. La proteína NV es necesaria para una eficiente replicación de los novirhabdovirus IHNV y VHSV en trucha y platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*), respectivamente. Por otro lado, la proteína NV de SHRV no es necesaria para una eficiente replicación de este virus en peces de agua caliente.

En la presente invención, se entiende por “identidad” o “identidad de secuencia” al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST (Altschul S.F. *et al. J Mol Biol.* 1990 Oct 5; 215(3):403-10). Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

La introducción del polipéptido en la célula puede hacerse por cualquiera de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como inyección directa, electroporación, transfección, transformación, etc. pero se trata de técnicas relativamente complejas y con limitaciones cuando se tienen que aplicar *in vivo* y acceder a toda la población de células tumorales o que presentan una proliferación celular descontrolada. En caso de que el polipéptido vaya a administrarse a un individuo, el polipéptido puede introducirse en la célula mediante técnicas de terapia génica gracias al empleo de vectores virales, o mediante secuencias de internalización celular que permiten al polipéptido atravesar la membrana plasmática.

Así, en una realización particular, el polipéptido de la invención se encuentra covalentemente unido a una secuencia de aminoácidos de internalización celular.

5 En la presente invención se entiende por “secuencia de aminoácidos de internalización celular” o “secuencia de internalización celular” o “péptidos de penetración celular” (CPPs) a las secuencias de aminoácidos que poseen la habilidad de transportar moléculas a través de la membrana plasmática, sin pérdida de su integridad. Entre las secuencias más empleadas se encuentran TAT, Antennapedia (Antp) y oligo-argininas, cuya característica en común es la presencia de grupos de  
10 aminoácidos catiónicos. Estas secuencias de internalización permiten la internalización del polipéptido directamente a la célula. Como entiende el experto en la materia, el polipéptido de internalización celular puede proceder de una fuente natural, o puede proceder de la síntesis química y ser una secuencia artificial que no existe en la naturaleza. Asimismo, el polipéptido de internalización celular puede estar unido a  
15 marcadores (por ejemplo, sin limitar a, fluoróforos) que faciliten su localización.

La secuencia de internalización celular puede estar unida al polipéptido de la invención tanto al extremo amino terminal como al extremo carboxilo terminal del polipéptido.

20 Tal como se ha indicado previamente, el polipéptido de la invención puede obtenerse por técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica, como la expresión en una célula del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención, y su posterior aislamiento. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un  
25 polinucleótido, de aquí en adelante “polinucleótido de la invención”, que codifica el polipéptido de la invención.

El término "polinucleótido", según se usa en la presente invención, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos  
30 y/o deoxiribonucleótidos. El término incluye tanto polinucleótidos de cadena sencilla como de cadena doble, así como polinucleótidos modificados, es decir, polinucleótidos metilados, protegidos y similares. El polinucleótido de la invención puede ser ADN, ARN o ADNc.

35 En un segundo aspecto la presente invención se refiere por tanto al polinucleótido que codifica para el polipéptido de la invención. En una realización preferida, el

polinucleótido de la invención se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 y/o cualquier combinación de las mismas. En otra realización más preferida aún, el polinucleótido de la invención se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19. En otra realización más preferida aún, el polinucleótido de la invención es el polinucleótido de SEQ ID NO: 19.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, de aquí en adelante “construcción génica de la invención”, que comprende el polinucleótido de la invención.

Preferiblemente, la construcción génica de la invención comprende el polinucleótido de la invención operativamente unido a secuencias reguladoras de la expresión del polinucleótido de la invención. En principio, cualquier promotor puede ser utilizado en las construcciones génicas de la presente invención, siempre que dicho promotor sea compatible con las células en las que se desea expresar el polinucleótido.

Un promotor, o región promotora, es una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción de un gen determinado (secuencias nucleotídicas). En la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción del polinucleótido de la invención. Las secuencias promotoras pueden ser unidireccionales o bidireccionales. Un promotor unidireccional es aquel que controla la transcripción de un gen o de más genes que se sitúan en tándem con el primero. “En tándem” se refiere a que el extremo 3’ del primer gen va seguido, bien consecutivamente o separados por una determinada secuencia nucleotídica, por el extremo 5’ del segundo gen. Un promotor bidireccional se refiere a la región promotora que controla la transcripción en dos direcciones opuestas, es decir, que un promotor bidireccional dirige la transcripción de dos genes situados de manera divergente, es decir en sentido opuesto, estando el extremo 5’ de ambas secuencias nucleotídicas más cercano entre sí que el extremo 3’. En la presente invención se utilizan los términos “promotor” y “región promotora” indistintamente. Además, los promotores en la presente invención pueden ser constitutivos o inducibles. El término “inducible”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la posibilidad de que el promotor tenga un elemento de control que permita activar o desactivar

(reprimir) la transcripción del gen que regula, en presencia de un factor externo al promotor.

5 Adicionalmente, la construcción génica de la invención puede contener marcadores o etiquetas que permiten el aislamiento del polipéptido de la invención una vez que es sintetizado en la célula.

10 Por otro lado, el polinucleótido o la construcción génica de la invención pueden estar formando parte de un vector. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, de aquí en adelante "vector de la invención", que comprende el polinucleótido o la construcción génica de la invención.

15 El experto en la materia apreciará que no existe limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado, ya que dicho vector puede ser un vector de clonaje adecuado para la propagación o un vector de expresión. Así, vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen, sin limitar a, (i) vectores de expresión en procariontes tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, (ii) vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, (iii) vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, (iv) vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y (v) vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales, entre los que se incluyen, sin limitar a, adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y lentivirus, así como vectores no virales entre los que se incluyen, sin limitar a, pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFVHis, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Ze02, pTRACER HCMV, pUB6N5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI.

30 El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector.

35

Dichas células pueden ser procariontas o eucariotas. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma/s en el/los que se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula, de aquí en adelante "célula de la invención", que comprende un polipéptido, un polinucleótido, una construcción génica o un vector según la presente invención, para lo cual dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con la construcción o el vector proporcionados por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal, preferentemente una célula de mamífero y más preferentemente una célula humana, transfectada o infectada con un vector apropiado.

Células huésped adecuadas para la expresión del polipéptido de la invención incluyen, sin limitar a, células de mamíferos, células de plantas, células de insectos, células de hongos y células bacterianas. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, humanas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, humanas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana 5 NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH Y MCF-7 y células hMSCs (*human mesenchymal stem cells*), y células GliNS2 (células madre de glioma).

30

*Usos del polipéptido de la invención*

Los inventores han descubierto que la proteína NV del virus VHSV (SEQ ID NO: 2), así como las variantes o mutantes que se derivan de dicha proteína y que se describen en la presente invención, y más particularmente las variantes de SEQ ID NO: 10, 16 y 20, más particularmente la variante de SEQ ID NO: 20, son capaces de

35

5 inhibir la proliferación celular, por arresto celular en la fase G2/M, en particular, de inhibir la proliferación de células tumorales, preferentemente células HeLa, y también de promover la muerte celular de las células que expresan dichas variantes, lo que permite el empleo de los polipéptidos de la invención en el tratamiento de desórdenes proliferativos, tales como tumores o cáncer, presentes en un sujeto.

10 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 2, en elaboración de un medicamento. Alternativamente, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 2 para su uso como medicamento. Las técnicas y procedimientos para elaborar medicamentos son descritas más adelante.

15 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 2, en elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de tumores, proliferación celular y/o metástasis. Alternativamente, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 2 para su uso como medicamento para la prevención y/o tratamiento de tumores, proliferación celular y/o metástasis. Las técnicas y procedimientos para elaborar medicamentos son descritas más adelante.

30 En una realización preferida de estos aspectos de la invención, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, el polipéptido es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y además una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 41 (D41A), o una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 36 (D36A), o una sustitución del aminoácido arginina (R) original por alanina (A) en la posición 39 (R39A).

35

En otra realización preferida de los usos de los polipéptidos de la invención, estos se caracterizan por que el polipéptido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20. En otra realización más preferida aún, el polipéptido es el polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 20.

5

En otra realización preferida de los usos de los polipéptidos de la invención, éstos se caracterizan por que los tumores son es benignos o malignos y/o para prevenir la proliferación celular y/o prevenir la metástasis.

10

En la presente invención se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que se utilizar para tratar, aliviar o curar una enfermedad, en particular, enfermedades que cursan con desórdenes proliferativos, tales como tumores o cáncer.

15

En esta memoria se entiende por “desórdenes proliferativos” a todo crecimiento de un tejido por la proliferación incontrolada de células, tales como por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, adenomatosis familiar, poliposis, neurofibromatosis, psoriasis, proliferación de células lisas vasculares asociada con aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, glomerulonefritis y estenosis y reestenosis posquirúrgicas. Los desórdenes proliferativos, también a veces denominados tumores, pueden ser benignos o malignos. Se considera que un tumor es benigno cuando las células que forman el tumor no invaden otros tejidos ni causan metástasis en otras partes del cuerpo. Normalmente, el tumor benigno está bien encapsulado y las células no presentan cambios de estructura. Por el contrario, se considera que un tumor es maligno cuando las células que forman el tumor invaden los tejidos adyacentes, lo que se conoce como metástasis, y sus células presentan anaplasia. En general, los tumores malignos se conocen como cáncer. Así, en una realización particular, “desórdenes proliferativos malignos” o “tumores malignos”, comprenden, pero sin limitar: carcinoma tal como de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, próstata y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, linfoma de células pilosas, y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielogénicas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimático, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma;

20

25

30

35



tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentario, queratoacantoma, cáncer folicular de tiroide y sarcoma de Kaposi.

5

Es conocido en el estado de la técnica de la existencia de células madre tumorales o cancerosas que, además de poseer las propiedades típicas de una célula madre, es decir, la autorenovación y la habilidad de diferenciarse en múltiples tipos de células, son resistentes a los tratamientos convencionales y persisten en los tumores como una población distinta, causando la recaída y la metástasis del tumor al dar crecimiento u origen a nuevos tumores. Así, en una realización particular, el tumor comprende células madre, en particular, células madre tumorales.

10

Además de las aplicaciones terapéuticas que pueden tener los péptidos de la invención y los aspectos inventivos derivados de él, también es posible su aplicación en ensayos experimentales *in vitro*. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con uso de los polipéptidos descritos en el presente apartado como reactivo para inhibir *in vitro* la proliferación celular.

15

Así otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la SEQ ID NO: 2, como reactivo para inhibir *in vitro* la proliferación celular. En una realización más preferida, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 2.

20

25

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención el polipéptido comprende los polipéptidos, polinucleótidos, la construcción génica, el vector o la célula de la invención. En otra realización más preferida, el polipéptido comprende las secuencias de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 10, 16 o 20. En otra realización más preferida aún, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 20.

30

En la presente invención se entiende por "inhibición de la proliferación celular" a la reducción, disminución, atenuación o bloqueo de la división o ciclo celular.



En la presente invención se entiende por “sujeto” a cualquier animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate, en particular, un ser humano, de cualquier raza, sexo o edad.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la SEQ ID NO: 2, como reactivo para inhibir *in vitro* la expresión de proteínas inflamatorias seleccionadas de la lista que consiste en: mx, ERK-1 e IL-8; o la actividad de  
10 proteínas reguladoras del ciclo celular seleccionada de la lista que consiste en ciclina B y A. En una realización preferida del presente aspecto de la invención, éste se caracteriza por que el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 2. En una realización más preferida, el polipéptido de la invención se caracteriza por que inhibe la expresión de ERK-1 y de las ciclinas A y B.

15 En otra realización preferida, este aspecto de la invención se caracteriza por que el polipéptido comprende al menos uno de los polipéptidos de la presente invención, más preferiblemente comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID  
20 NO: 2 y una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 41 (D41A), o una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 36 (D36A), o una sustitución del aminoácido arginina (R) original por alanina (A) en la posición 39 (R39A). En otra realización más preferida el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 10, 16, 20 y/o cualquiera de sus  
25 combinaciones.

#### *Composición farmacéutica de la invención*

Tal como se ha explicado en el aspecto inventivo anterior, el polipéptido,  
30 polinucleótido, construcción génica, vector o la célula de la invención pueden emplearse en la elaboración de una composición farmacéutica.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, de aquí en adelante, composición farmacéutica de la invención, que  
35 comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la SEQ ID NO: 2, según se

describe en la presente invención, en una cantidad terapéuticamente efectiva, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En la presente invención se entiende por "composición farmacéutica" o "medicamento" a toda preparación o forma farmacéutica, cuya fórmula de composición expresada en unidades del sistema internacional, está constituida por una sustancia o mezcla de sustancias, con peso, volumen y porcentajes constantes, elaborada en laboratorios farmacéuticos legalmente establecidos, envasada o etiquetada para ser distribuida y comercializada como eficaz para diagnóstico, tratamiento, mitigación y profilaxis de una enfermedad, anomalía física o síntoma, o el restablecimiento, corrección o modificación del equilibrio de las funciones orgánicas de los seres humanos y de los animales. La elaboración de la composición farmacéutica puede llevarse por cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica.

15 La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad mínima del compuesto o de la composición farmacéutica de la invención necesaria para que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otros factores, por las características propias de dicho compuesto o dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y/o "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en las composiciones de la invención son ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

25 En la presente descripción, el término "vehículo" se refiere a un diluyente o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, o puede proceder de una fuente natural o ser un diluyente o excipiente que no existe forma natural. Se emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. Preferiblemente, los vehículos de la invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o el federal o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida en general para su uso

en animales, y más particularmente en seres humanos. Los vehículos y las sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma farmacéutica deseada de administración de la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricarán según métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica.

En una realización preferida de la composición farmacéutica de la invención, esta se caracteriza por que el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 2.

10

En otra realización preferida de la composición de la invención, ésta se caracteriza por que el polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y además una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 41 (D41A), o una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 36 (D36A), o una sustitución del aminoácido arginina (R) original por alanina (A) en la posición 39 (R39A). Preferiblemente, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 y/o cualquier combinación de las mismas. En una realización más preferida, la composición farmacéutica de la invención puede comprender además al menos uno de los polipéptidos que se seleccionan de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26 y/o cualquiera de sus combinaciones.

15

20

25

30

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse a, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, excipientes, agentes dispersantes, lubricantes, deslizantes, agentes edulcorantes, o agentes aromatizantes. Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender un adyuvante. Por "adyuvante" se entiende cualquier sustancia que intensifica la efectividad de la composición farmacéutica de la invención.

35

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, un agente quimioterapéutico.

Por "agente quimioterapéutico", se entiende cualquier sustancia que es capaz de inhibir la proliferación celular sin matar a la célula necesariamente, o que es capaz de inducir la muerte celular. Los agentes capaces de inhibir la proliferación celular sin provocar muerte celular se denominan de forma genérica, agentes citostáticos, mientras que aquellos que son capaces de inducir la muerte celular normalmente mediante la activación de la apoptosis se denominan de forma genérica agentes citotóxicos. Ejemplos no limitativos de agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen, sin limitar a, (i) agentes estabilizantes de microtúbulos tales como taxanos, paclitaxel, docetaxel, epothilonas y laulimalides, (ii) inhibidores de quinasas tales como Iressa(R), Gleevec, Tarceva™, (Erlotinib HCl), BAY-43-9006, (iii) anticuerpos específicos para receptores con actividad quinasa incluyendo, sin limitarse a, Trastuzumab (Herceptin(R)), Cetuximab (Erbix(R)), Bevacizumab (Avastin™), Rituximab (ritusan(R)), Pertuzumab (Omnitarg™); (iv) inhibidores de la ruta mTOR, tales como rapamicina y CCI-778; (v) Apo2L1Trail, (vi) agentes anti-angiogénicos tales como endostatina, combrestatina, angiostatina, trombospondina y el inhibidor del crecimiento endotelial vascular (VEGI); (vii) vacunas antineoplásicas incluyendo células T activadas, agentes inmunopotenciadores inespecíficos (por ejemplo interferones, interleuquinas); (viii) agentes citotóxicos antibióticos tales como doxorubicina, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, epirubicina, mitomicina, mitozantrona, etc; (ix) agentes alquilantes tales como Melphalan, Carmustina, Lomustina, ciclofosfamida, ifosfamida, Clorambucilo, Fotemustine, Busulfano, Temozolomida y thiotepa; (x) agentes hormonales antineoplásicos tales como Nilutamida, acetato de ciproterona, anastrozol, Exemestano, Tamoxifeno, Raloxifeno, Bicalutamida, Aminoglutetimida, acetato de leuprorelina, citrato de Toremifeno, Letrozol, Flutamida, acetato de Megestrol y acetato de goserelina; (xi) hormonas gonadales tales como acetato de ciproterona y acetato de medoxiprogesterone; (xii) antimetabolitos tales como Citarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, Topotecano, Hidroxyurea, Tioguanina, Metotrexato, Colaspasa, Raltitrexedo y capicitabina; (xiii) agentes anabólicos tales como nandrolone; (xiv) hormonas adrenales esteroideas tales como acetato de metilprednisolona, dexametasona, hidrocortisona, prednisolona y prednisona; (xv) agentes antineoplásicos tales como Carboplatino, Cisplatino, Oxaliplatino, Etoposido and Dacarbazina e (xvi) inhibidores de topoisomerasa tales como topotecana e irinotecano.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intratecal, intraventricular, intraarticular, intratumoral, oral, enteral, parenteral, intranasal, ocular o tópica. Una vía de administración preferida de las composiciones y/o formulaciones del compuesto de la invención para la prevención o el tratamiento de un cáncer es la vía intratumoral. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención está formulada para su administración oral, parenteral, nasal o sublingual.

10

*Kit de la invención*

La administración del polipéptido de la invención requiere una serie de componentes que pueden disponerse juntos en forma de pack o kit.

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante “kit de la invención”, que comprende un polipéptido, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula de la invención descritos en los aspectos inventivos anteriores junto a sus correspondientes realizaciones particulares.

20

Particularmente, el kit de la invención comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% con la SEQ ID NO: 2. Mas preferiblemente, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 2.

25

En otra realización particular del kit de la invención, este se caracteriza por que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2 y, además, una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 41 (D41A), una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 36 (D36A), o una sustitución del aminoácido arginina (R) original por alanina (A) en la posición 39 (R39A). Más preferiblemente, el polipéptido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 16. En una realización más preferida el kit de la invención comprende los péptidos de SEQ ID NO: 2, 20, 10 y 16.

30

En otra realización más preferida, el kit de la invención comprende además, los péptidos que comprenden la SEQ ID NO: 22 y/o SEQ ID NO: 26.

35

Componentes útiles para la administración del polipéptido de la invención y que pueden estar comprendidos dentro del kit incluyen, pero no se limitan a, solución tampón, solución de lisis, material estéril (jeringuillas, hisopos, torundas, pinzas, etc.),  
5 agua destiladas, alcoholes (etanol), etc. Adicionalmente, el kit puede contener instrucciones o indicaciones que guíen al experto en la materia en la administración del polipéptido de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para la  
10 determinación del efecto de dicho polipéptido de la invención en la tumorigenicidad de una línea celular, para inhibir *in vitro* la proliferación celular y/o para inhibir *in vitro* la actividad de proteínas inflamatorias seleccionadas de la lista que consiste en: mx, ERK-1 e IL-8; preferiblemente ERK-1, o la actividad de proteínas reguladoras del ciclo celular seleccionada de la lista que consiste en ciclina B y A.

15 Los términos y expresiones empleados en el presente aspecto inventivo ya han sido definidos en aspectos inventivos anteriores.

*Método de tratamiento de la invención*

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento y/o la prevención de tumores en un sujeto, tanto benignos como malignos (cáncer o metástasis), que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido, del polinucleótido, de la construcción  
25 génica, del vector, de la célula o de la composición farmacéutica según la invención.

La invención también se relaciona con un método para inhibir (*in vitro/in vivo*) la actividad de las proteínas inflamatorias seleccionadas de la lista que consiste en: mx, ERK-1 e IL-8; preferiblemente ERK-1, o la actividad de proteínas reguladoras del ciclo  
30 celular seleccionada de la lista que consiste en ciclina B y A.

Los términos y expresiones empleados en el presente aspecto inventivo ya han sido definidos en aspectos inventivos anteriores. A su vez, todas las realizaciones particulares anteriormente descritas en la presente invención son aplicables a los  
35 métodos de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **FIG. 1.** Análisis de la mortalidad de células EPC que expresan la proteína NVGFP (A) o GFP (B). Cuantificación de la mortalidad de células EPC que expresan la proteína NVGFP o GFP (C), siendo la diferencia entre ellas estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

15 **Fig. 2.** Análisis de la expresión del gen *mx* en células ZF4 transfectadas con los plásmidos que codifican para la proteína NV nativa (*wild-type*) de VHSV y las diferentes mutantes de NV descritas en la presente invención. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a la proteína NV de VHSV nativa (wt-NV VHSV).

20 **Fig. 3.** Análisis de la expresión del gen *mx* en células ZF4 transfectadas con los plásmidos que codifican para la proteína NV nativa (*wild-type*), las diferentes mutantes de NV descritas en la presente invención y las proteínas NV de IHNV, SHRV y HIRV. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a la proteína NV de VHSV nativa (wt-NV VHSV).

25 **Fig. 4.** Análisis de la expresión del gen *IL8* en células ZF4 transfectadas con plásmidos que codifican para la proteína NV nativa (*wild-type*) de VHSV y las diferentes mutantes de NV descritas en la presente invención. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a la proteína NV de VHSV nativa (wt-NV VHSV).

30 **Fig. 5.** Análisis de la expresión del gen *ccnb1* que codifica para la proteína ciclina B1 en células ZF4 transfectadas con plásmidos que codifican para la proteína NV nativa (*wild-type*) de VHSV y para las diferentes mutantes NV de VHSV de la invención. En la gráfica se muestra además la expresión del gen *IL8* para ver la correlación existente entre ambos genes. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a la proteína NV de VHSV nativa (wt-NV VHSV).



**Fig. 6.** Análisis de la expresión génica de *ccna1*, *ccnd1* y *ccne1* en células HeLa tras el tratamiento por transfección con plásmidos que expresan la proteína NV41 (SEQ ID NO: 20), NV41GFP (SEQ ID NO: 64) a 96hpt o control a 48hpt (Control48).

5 **Fig. 7.** Análisis de la expresión génica de *ccnb1* en células HeLa tras el tratamiento por transfección con plásmidos que expresan a 48hpt y 96hpt la proteína NV41 (SEQ ID NO: 20), NV41GFP (SEQ ID NO: 64), GFP (SEQ ID NO: 30) a 48hpt o control a 48hpt.

10 **Fig. 8.** Análisis de la expresión génica de *erk1* en células HeLa tras el tratamiento por transfección a 48 y 96hpt con plásmidos que expresan la proteína NV41 (SEQ ID NO: 20), NV41GFP (SEQ ID NO: 64) o control (a 48hpt).

**Fig. 9.** Valores de Ct obtenidos en la qPCR para los genes *gadh* (barras grises) y *erk1* (barras negras) en las muestras analizadas de células HeLa transfectadas con el plásmido NV41 (SEQ ID NO: 21) a 48hpt, 96hpt y comparadas con un control a 48h.

15 **Fig. 10.** Análisis de la expresión proteica de la quinasa ERK1 en células HeLa transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas GFP (SEQ ID NO: 30), NV41 (SEQ ID NO: 20) o control a 48hpt y 96hpt. Los datos están normalizados por GFP a 48hpt para las muestras a este tiempo, y por el control a 96hpt para las muestras a este tiempo.

20 **Fig. 11.** Análisis de la expresión proteica de ciclina B en células HeLa transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas GFP (SEQ ID NO: 30), NV41 (SEQ ID NO: 20) a 48hpt y 96hpt o control a 48hpt y 96hpt. Los datos se han normalizado con la expresión de GFP a 48hpt.

25 **Fig. 12.** Análisis de la expresión proteica de ciclina A en células HeLa transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas GFP (SEQ ID NO: 30), NV41 (SEQ ID NO: 20) o control a 48hpt y 96hpt. Los datos se han normalizado mediante la expresión de GFP a 48hpt.

## EJEMPLOS

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

## MATERIAL Y MÉTODOS

35 Líneas celulares



Las líneas celulares utilizadas fueron HeLa, de carcinoma de cérvix (ATCC® CCL-2™), la línea celular de pez cebra (*Danio rerio*) ZF4 (ATCC® CRL-2050™) y la línea celular de pez EPC (ATCC® CRL-2872™). Todas ellas se crecieron en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>, con medio DMEM:F12 (SIGMA, España) las células ZF4 y HeLa, y las células EPC con medio RPMI 1640 (SIGMA, España). Los medios se suplementaron con 2 mM L-glutamina (Gibco, EEUU), 1mM piruvato sódico (Gibco, EEUU), penicilina/estreptomicina (Gibco, EEUU) y suero de ternera fetal (FBS) al 10%. Las células ZF4 se mantuvieron a 28°C y el resto de líneas a 37°C.

10 Plásmidos utilizados

Mediante técnicas estándar de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se obtuvo la secuencia primaria del gen NV de la cepa del virus VHSV-07.71 (GenBank nº AJ233396: SEQ ID NO: 1). Este gen se clonó en un vector de expresión denominado pMCV 1.4 que comprende el promotor de citomegalovirus. A partir de la secuencia nucleotídica de la NV natural del VHSV (SEQ ID NO: 1) se obtuvieron nueve proteínas NV mutadas donde cada una de las proteínas mutadas comprendía el cambio del aminoácido original por alanina (A) entre las posiciones 33 a 41, ambas inclusive, de la SEQ ID NO: 2. Los mutantes obtenidos son: L33A (SEQ ID NO: 4), N34A (SEQ ID NO: 6), C35A (SEQ ID NO: 8), D36A (SEQ ID NO: 10), F37A (SEQ ID NO: 12), D38A (SEQ ID NO: 14), R39A (SEQ ID NO: 16), S40A (SEQ ID NO: 18), D41A (SEQ ID NO: 20).

Las proteínas mutantes L33A (SEQ ID NO: 4), D36A (SEQ ID NO: 10) y R39A (SEQ ID NO: 16), se generaron mediante PCR usando cebadores solapantes, y se clonaron en el mismo vector que se ha utilizado anteriormente, el vector pMCV 1.4. Por otro lado, los mutantes N34A (SEQ ID NO: 6), C35A (SEQ ID NO: 8), F37A (SEQ ID NO: 12), D38A (SEQ ID NO: 14), S40A (SEQ ID NO: 18) y D41A (SEQ ID NO: 20) mediante síntesis química (Invitrogen, Thermofisher, USA), y posteriormente se clonaron en el vector de expresión mencionado anteriormente, el vector pMCV 1.4.

30

Para los ejemplos comparativos incluidos en el presente documento, se ha utilizado el vector pMCV 1.4, mencionado anteriormente, en el que se han clonado las secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína NV del virus IHNV (cepa Oregon69, UniProtKB: locus NV\_IHNVO, nº de acceso Q08455 SEQ ID NO: 22), NV del virus SHRV (nº de acceso NC\_000903.1 SEQ ID NO: 24), NV del virus HIRV (nº de acceso U47847.1 SEQ ID NO: 26) o la proteína fluorescente GFP (SEQ ID NO: 30).

35

Transfección de plásmidos

Células ZF4 o HeLa se distribuyeron en placas de cultivo de 24 pocillos (SPL Life Sciences Co., Ltd) a una concentración entre 50-100 x10<sup>3</sup> células/pocillo, 24 horas antes de su uso. Para la transfección de los diferentes plásmidos, indicados anteriormente, que codifican para las diferentes proteínas NVs naturales y mutantes descritas en la presente invención, se utilizó Lipofectamina 3000 siguiendo las indicaciones del fabricante (Thermofisher, USA). Las células ZF4 y EPC transfectadas con los diferentes plásmidos que codifican para las proteínas NVs nativas y mutantes de la presente invención se recogieron a las 48h post-transfección (hpt), mientras que para el caso de las células HeLa se recogieron a las 48hpt y 96hpt.

Extracción de RNA y retrotranscripción

Después del tiempo de transfección estimado, las células se recogen de las placas de cultivo mediante el uso de tripsina (Gibco, Thermofisher). Posteriormente, se lleva a cabo la extracción del RNA mediante el uso del kit comercial E.Z.N.A.® HP Total RNA Kit (OMEGA bio-tek, USA). Se realizó un paso adicional de incubación con DNAsa para asegurarnos que eliminamos completamente el DNA de cada muestra. La cuantificación del RNA se lleva a cabo mediante Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA). Para obtener el cDNA, se realizó una retrotranscripción del RNA con el kit PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Japón) siguiendo las instrucciones de fabricante.

PCR cuantitativa (qPCR)

Para la cuantificación de los distintos RNAs, estos se retrotranscribieron a cDNAs y posteriormente se realizaron qPCRs utilizando diferentes parejas de cebadores (**Tabla 3**) y la tecnología SYBR green del kit comercial SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (TAKARA, Japón), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar la qPCR se utilizó el equipo de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast (ABI, Thermofisher, USA). Los genes de referencia utilizados para normalizar la expresión de los genes de interés han sido el gen RPLP0 para los cultivos de células ZF4 y el gen GADPH para los cultivos de células HeLa. La fórmula para obtener la cantidad de expresión se basa el método Delta Ct, siendo  $\Delta Ct = Ct_{Ref} - Ct_{gen}$  y los genes de referencia RPLP0 (ZF4) y GADPH (HeLa), y posteriormente calculando la potencia según la fórmula  $Pot = 2^{-\Delta Ct}$ .

**Tabla 3.** Secuencias de los cebadores usados en qPCR.

<b>Gen</b>	<b>Sentido (5' - 3')</b>	<b>Antisentido (5' - 3')</b>
<i>rplp0 (Dre)</i>	SEQ ID NO: 31 (CACGCTGCTGAACATGCTG AAC)	SEQ ID NO: 32 (AATCCTCCTTGGGTGCCTCCTC)
<i>mx (Dre)</i>	SEQ ID NO: 33 (GGTCTCTGGGAGTCGAAAA GG)	SEQ ID NO: 34 (AACTCTTTCCCGAGCTTTGGT)
<i>il8 (Dre)</i>	SEQ ID NO: 35 (AAACAGAAAGCCGACGCAT TGG)	SEQ ID NO: 36 (AGCAGAGGGGTCCAGACAGAT C)
<i>ccnb1 (Dre)</i>	SEQ ID NO: 37 (CCGGAAAAGCAGTTGTAGC G)	SEQ ID NO: 38 (CCTGTCGTGTTTGCGGATTG)
<i>NV (VHSV)</i>	SEQ ID NO: 39 (AAAAAGCTTATGGCGACCC AACCCGG)	SEQ ID NO: 40 (TTTGCTAGCGGAGGTGAGCCCA GAGCC)
<i>NV (IHNV)</i>	SEQ ID NO: 41 (GGACCACCGCGACATAAAC AC)	SEQ ID NO: 42 (CTTCAATCAGGATCAGATGTCT CC)
<i>NV(HIRV)</i>	SEQ ID NO: 43 (CAGCGTTGAAGGATCTGCT GAG)	SEQ ID NO: 44 (GGAGGAACTCGTCTACTGGA)
<i>NV (SHRV)</i>	SEQ ID NO: 45 (CCCGGCAACAACCACAATG AC)	SEQ ID NO: 46 (CCAGGAGTCGTTGTCTTCAT)
<i>gadph (Hosa)</i>	SEQ ID NO: 47 (CCCCTTCATTGACCTCAAC TAC)	SEQ ID NO: 48 (GATGACAAGCTTCCCGTTCTC)
<i>mx (Hosa)</i>	SEQ ID NO: 49 (CAGCACCTGATGGCCTATC A)	SEQ ID NO: 50 (TGGAGCATGAAGAACTGGATGA )
<i>il8 (Hosa)</i>	SEQ ID NO: 51 (AGGTGCAGTTTTGCCAAGG A)	SEQ ID NO: 52 (TTTCTGTGTTGGCGCAGTGT)
<i>ccna1 (Hosa)</i>	SEQ ID NO: 53 (GCCATTAGTTTACCTGGAC CCAGA)	SEQ ID NO: 54 (CACTGACATGGAAGACAGGAAC CT)

Gen	Sentido (5' - 3')				Antisentido (5' - 3')			
<i>ccnb1</i> ( <i>Hosa</i> )	SEQ	ID	NO:	55	SEQ	ID	NO:	56
	(AAGAGCTTTAAACTTTGGT CTGGG)				(CTTTGTAAGTCCTTGATTTACCA TG)			
<i>ccnd</i> ( <i>Hosa</i> )	SEQ	ID	NO:	57	SEQ	ID	NO:	58
	(TGTTTCGTGGCCTCTAAGAT GAAG)				(AGGTTCCACTTGAGCTTGTTCA C)			
<i>ccne</i> ( <i>Hosa</i> )	SEQ	ID	NO:	59	SEQ	ID	NO:	60
	(GTTATAAGGGAGACGGGG AG)				(TGCTCTGCTTCTTACCGCTC)			
<i>erk1</i> ( <i>Hosa</i> )	SEQ	ID	NO:	61	SEQ	ID	NO:	62
	(CCAGGGACATGGAATGCAA )				(CCAGTGGGACCTCGATCTCC )			

*Hosa*: línea celular humana HeLa. *Dre*: *Danio rerio* (Pez cebra).

En el estudio comparativo de la expresión de transcritos en ZF4 con las diferentes versiones de la proteína NV, tanto nativas como mutantes, se realizó una normalización de cada valor de potencia de mx por su Potencia relativa de expresión. Así por ejemplo, para el mutante NV41, se hizo el ratio potencia de mx/potencia NV41.

#### Western-Blot

Con el fin de determinar la cantidad relativa de proteínas implicadas en favorecer la progresión de los tumores, se han utilizado células HeLa transfectadas con los plásmidos que expresan GFP y el mutante NV41 (SEQ ID NO: 20), y se compararon con un control de células no transfectadas. Los ensayos se realizaron a 48hpt y 96hpt. Mediante Western-blot (WB) se determinó mediante anticuerpos monoclonales (Santa Cruz Biotechnology, Quimigen) la cantidad de las proteínas ciclina B1 (anticuerpo monoclonal sc-245), ciclina A (anticuerpo monoclonal sc-271682) y la quinasa ERK1 (anticuerpo monoclonal sc-271269). Brevemente, las células transfectadas se recogieron a los tiempos de estudio mencionados y se extrajo la proteína total soluble con PBS en presencia de inhibidores de proteasas (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich), mediante 3 ciclos de congelación-descongelación. Una vez cuantificada por el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA), 10 microgramos de proteína total soluble se sometieron a PAGE-SDS al 10% y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa. A continuación, se llevó a cabo el WB de forma estándar usando las concentraciones de los anticuerpos monoclonales sugeridos por la casa comercial. La captura de imagen de los WB se realizó con el

sistema de documentación Gel Doc™ XR+ (BioRad) y la cuantificación relativa de las bandas se realizó con el software Image Lab v5.2 (BioRad). El estudio por WB se repitió en tres ensayos independientes.

5 Citometría de flujo

La viabilidad de las células EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) se analizó mediante citometría de flujo con el citómetro BD FACSCANTO II (BD Biosciences, España) a 48hpt con: (a) el plásmido que expresa la proteína GFP, y (b) el plásmido que expresa la construcción NVGFP, siendo la proteína NV la proteína nativa de SEQ ID NO: 1.

10 Los resultados se analizaron con el programa FACSDiva v6.1.3. El estudio se realizó por duplicado.

Análisis estadístico

15 Los resultados obtenidos se muestran como media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas entre las medias de dos, tres o más conjuntos de datos se calcularon mediante ANOVA (One-way ANOVA). Las diferencias entre 2 conjuntos de datos y su nivel de significación se calcularon mediante el test t de Student. El criterio de significación estadística en todos los casos se estableció en  $p < 0,05$ .

20

**Ejemplo 1. La proteína NV de VHSV (SEQ ID NO: 2) incrementa la mortalidad de células EPC.**

25 Se determinó la viabilidad celular de las células EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) mediante citometría de flujo a 48h post-transfección con: (a) el plásmido que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 29 que codifica para la proteína GFP de SEQ ID NO: 30, y (b) el plásmido que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 27, que codifica para la proteína NVGFP de SEQ ID NO: 28. Los resultados obtenidos demuestran que existe un incremento de la mortalidad (1.65 veces) de las células EPC transfectadas con el plásmido que codifica para la construcción NVGFP (SEQ ID NO: 28) respecto a las células EPC transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína GFP (SEQ ID NO: 30) (**Figura 1**).

30

35 Este resultados evidencian que la proteína NV (SEQ ID NO: 2) induce un incremento de la mortalidad en las células en las que se expresa.

**Ejemplo 2. Los mutantes de la invención inhiben la expresión génica de *mx* e *IL-8* en células de pez cebra (ZF4).**

El análisis de la expresión del gen *mx* en células ZF4 que expresan la proteína NV  
 5 nativa de VHSV, wt-NV (SEQ ID NO: 2) o cualquiera de las mutantes analizadas en la  
 presente invención: NV33 (SEQ ID NO: 4), NV34 (SEQ ID NO: 6), NV35 (SEQ ID NO:  
 8), NV36 (SEQ ID NO: 10), NV37 (SEQ ID NO: 12), NV38 (SEQ ID NO: 14), NV39  
 (SEQ ID NO: 16), NV40 (SEQ ID NO: 18) o NV41 (SEQ ID NO: 20), han puesto de  
 manifiesto que los mutantes NV36 (SEQ ID NO: 10), NV39 (SEQ ID NO: 16) y NV41  
 10 (SEQ ID NO: 20) disminuyen la expresión génica de *mx* respecto a la NV natural (wt)  
 (**Figura 2**). Específicamente, dichos mutantes NV36 (SEQ ID NO: 10), NV39 (SEQ ID  
 NO: 16) y NV41 (SEQ ID NO: 20) inducen una inhibición de la expresión génica de *mx*  
 del orden de 3.3 veces, 2 veces y 5 veces respectivamente, respecto de la proteína  
 wt-NV.

15  
 Adicionalmente, también se analizó la expresión del gen *mx* en células ZF4 que  
 expresan la proteína NV de otros novirhabdovirus diferentes tales como: IHNV (SEQ  
 ID NO: 22), *snakehead rabdovirus* (SHRV) (SEQ ID NO: 24) e *hirame rabdovirus*  
 (HIRV) (SEQ ID NO: 26). Los resultados evidencian que la proteína NV de SHRV  
 20 (SEQ ID NO: 24) induce un incremento en la expresión del gen *mx* (**Figura 3**). Estos  
 resultados son coherentes con la información existente en el estado de la técnica  
 donde se muestra que la proteína NV de este virus no se comporta como el resto de  
 proteínas NV de otros novirhabdovirus (Alonso M., *et al.* J Virol. 2004  
 Jun;78(11):5875-82).

25  
 Por otro lado, las proteínas NV de IHNV (SEQ ID NO: 22) e HIRV (SEQ ID NO: 26)  
 inhiben la expresión de *mx*, incluso más que la NV natural de VHSV (SEQ ID NO: 2),  
 pero menos que el mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) (**Figura 3**).

30  
 Además del análisis de la expresión del gen *mx*, se analizó también la expresión del  
 gen *IL8* en células ZF4 transfectadas con los distintos plásmidos de NV descritos en la  
 presente invención y mencionados anteriormente. Los resultados obtenidos han sido  
 similares a los mostrados para el gen *mx*, siendo las células que expresan los  
 mutantes NV36 (SEQ ID NO: 10), NV39 (SEQ ID NO: 16) y NV41 (SEQ ID NO: 20) las  
 35 que mayor capacidad inhibitoria muestran de la expresión del gen *IL8* (**Figura 4**).

**Ejemplo 3. Los mutantes de la invención inhiben la expresión génica de la ciclina B1 en células de pez cebra (ZF4).**

Además de la expresión de los genes *mx* e *IL8*, se analizó en células ZF4 que expresan las diferentes proteínas NV (mutantes y nativas) descritas en la invención, la expresión del gen *ccnb1* que codifica para la ciclina B1, proteína que regula un punto de control (checkpoint) G2/M del ciclo celular y que permite la mitosis de la célula.

Los resultados demuestran que los mutantes NV35 (SEQ ID NO: 8), NV36 (SEQ ID NO: 10), NV37 (SEQ ID NO: 12), NV39 (SEQ ID NO: 16) y NV41 (SEQ ID NO: 20) son los que mayor capacidad inhibitoria de la expresión del gen *ccnb1* presentan (**Figura 5**). Además, se analiza la correlación en la misma gráfica de los niveles de expresión de *IL8* y *ccnb1* para observar el comportamiento de cada mutante, determinándose que son los mutantes NV36 (SEQ ID NO: 10), NV39 (SEQ ID NO: 16) y NV41 (SEQ ID NO: 20) son los que muestran una mayor inhibición de la expresión de ambos genes.

**Ejemplo 4. La proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) inhibe la expresión génica de ERK1 y las ciclinas A y B en células de cáncer de cérvix (HeLa).**

Una vez demostrada la capacidad inhibitoria de la proteína NV41 (SEQ ID NO: 20) sobre la transcripción del gen de la ciclina B1 (gen *ccnb1*) en células de pez cebra ZF4, se analizó el efecto que la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) puede causar en las células tumorales humanas HeLa. Para ello, dichas células se transfectaron con los plásmidos que codifican para la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20), la proteína control GFP (SEQ ID NO: 20) y su comparación con un control (células no transfectadas analizadas a los mismos tiempos) y se cultivaron durante 48h y 96h post-transfección. Posteriormente se determinaron los niveles de expresión de las ciclinas A, B, D, E, proteínas que participan en el ciclo celular, y de la quinasa ERK1, como una molécula señalizadora y efectora de la vía MAPK, mediante PCR cuantitativa (qPCR).

El estudio en la línea celular HeLa mostró que la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) inhibe la expresión de transcritos del gen *ccna1* que codifica para la ciclina A1 y de transcritos del gen *ccnb1* que codifica para la ciclina B1, respecto al control (células no transfectadas) a 48hpt, y dicha inhibición es aún mayor a 96hpt (**Figura 6 y 7**, respectivamente). Por otro lado, la ciclina D1 (codificada por el gen *ccnd1*) aumenta



su expresión de transcritos en aquellas células HeLa que expresan la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20), mientras que la ciclina E1 (codificada por el gen *ccne1*) permanece invariable en dichas células expresen o no la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) (**Figura 6**). De la misma manera, los niveles de expresión de transcritos la ciclina B1 también disminuyeron en células HeLa que expresan NV41 (SEQ ID NO: 20) respecto a las células HeLa que expresan GFP (SEQ ID NO: 30), y a las que expresan la construcción NV41GFP (SEQ ID NO: 64) (**Figura 7**). Como se observa en dicha Figura 8, la expresión de NV41GFP (SEQ ID NO: 64) en células HeLa indujo un incremento en la concentración de transcritos del gen *ccnb1* (ciclina B1) tanto a 48hpt como a 96hpt.

Adicionalmente se analizaron los niveles de expresión génica de *erk1* por su relevancia como proteína señalizadora en la ruta MAPK. Los resultados pusieron de manifiesto que la expresión génica de *erk1* disminuye por acción de NV41 (SEQ ID NO: 20). Esta disminución de *erk1* es dependiente del tiempo ya que a 48hpt se observa una disminución en su expresión muy significativa, pero a 96hpt era tan baja que no se pudo detectar la expresión de dicho gen en las células HeLa que expresan NV41 (SEQ ID NO: 20) (**Figura 8**). Sin embargo, a este mismo tiempo (96hpt) se detectan los transcritos del gen control interno *gadph* (**Figura 9**), indicando que dicha ausencia de expresión no es debida a la degradación del cultivo celular, sino a la ausencia de expresión génica inducida por la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20).

**Ejemplo 5. La proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) inhibe la expresión proteica de ERK1 y ciclina B1, y aumenta la expresión proteica de ciclina A1 en células HeLa.**

Una vez demostrado que las diferentes proteínas mutantes descritas en la presente invención, particularmente el mutante NV41 (SEQ ID NO: 20), modulan la expresión génica de *erk1*, *mx*, *IL-8*, *ciclina b1* y *ciclina a1*, se analiza si dicha modulación a nivel génico se produce también a nivel proteico.

Para ello se determinó la expresión proteica mediante Western-blot (WB) con el uso de anticuerpos monoclonales (ver materiales y métodos) que detectan ERK1, ciclina B1 y ciclina A1 en extractos celulares de células HeLa tratadas a distintos tiempos, como se ha descrito anteriormente. Como se observa en la **Figura 10**, las células



HeLa transfectadas con el plásmido que expresa la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) muestran una reducción de la expresión de ERK1 en un 32% respecto células tratadas con GFP (SEQ ID NO: 30), y un 26% respecto al control (células no transfectadas), analizadas a las 48hpt. Por otro lado, la expresión de ERK1 a 96hpt  
5 mostró que la expresión de GFP se redujo en un 4% respecto al control (células no transfectadas), mientras que las células HeLa transfectadas con el plásmido que expresa la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) mostró una disminución en la expresión de ERK1 en un 45% respecto al control (células no transfectadas) (**Figura 10**).

10

Estos datos se correlacionan con los mostrados para la expresión génica de *erk1* (**Figura 8**) y demuestran que la proteína mutante NV41 inhibe la expresión génica y proteica de ERK1 al interferir en la vía MAPK.

15

A continuación se analizó la expresión proteica de las ciclinas B y A, a 48 y 96hpt, tal y como se ha indicado anteriormente. Respecto a la ciclina B1, las células HeLa a 48 hpt muestran una expresión reducida de dicha proteína cuando están tratadas con el plásmido que expresa la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) en un 30% respecto a las células tratadas con GFP (SEQ ID NO: 30), y muestran un nivel similar al control  
20 (células no transfectadas) (**Figura 11**). La expresión de la ciclina B1 a 96hpt muestra que las HeLa tratadas con GFP (SEQ ID NO: 30) disminuyeron un 24% la expresión de ciclina B respecto al control (células no transfectadas), mientras que las células HeLa transfectadas con el plásmido que expresa la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) disminuyó la expresión de ciclina B en un 43% respecto al control (células no  
25 transfectadas) (**Figura 11**). Además, se observa un 25% menos de ciclina B en las células HeLa tratadas con NV41 respecto a las tratadas con GFP. Estos datos se correlacionan con los datos obtenidos para la expresión génica de *ccnb1*, demostrando que la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20) disminuye los niveles génicos y proteicos de ciclina B.

30

Cuando se analiza la expresión proteica de ciclina A mediante WB, las células HeLa tratadas con GFP (SEQ ID NO: 30) o NV41 (SE ID NO: 20) durante 48 hpt mantienen la expresión de ciclina A respecto al control (células no transfectadas), aunque disminuye respecto a las células transfectadas con GFP (**Figura 12**). Sin embargo, a  
35 96hpt la expresión de ciclina A aumenta en las células HeLa tratadas con NV41 (SEQ ID NO: 20) o GFP (SE ID NO: 30) respecto al control (células no transfectadas) y

respecto a sus homólogas a 48hpt (**Figura 12**). Sin embargo, se observa que a 96hpt las células HeLa tratadas con NV41 (SEQ ID NO: 20) disminuyen la ciclina A respecto a las células tratadas con GFP (SEQ ID NO: 30), indicando que NV41 inhibe la expresión de ciclina A en un 20%-30%. Estos resultados contrastan en parte con los mostrados en el Ejemplo 4 para la ciclina A, donde la expresión génica de *ccna1* tanto a 48hpt como a 96hpt disminuye por el tratamiento con la proteína mutante NV41 (SEQ ID NO: 20). Una explicación posible a este hecho es que no siempre hay correlación a tiempo real entre la cantidad de transcritos de mRNA y la cantidad de proteína. Este hecho podría deberse a que la proteína ciclina A podría tener una mayor vida media, es decir, se degrada menos y para poder detectar una disminución de la misma por inhibición de la expresión de mRNA, se debería de analizar dicha expresión a tiempos mayores que los llevados a cabo en los ejemplos mostrados aquí.

**REIVINDICACIONES**

1. Variante de la proteína no viriónica del virus *Oncorhynchus 2 novirhabdovirus* que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 2, y una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 41 (D41A), o una sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) original por alanina (A) en la posición 36 (D36A), o una sustitución del aminoácido arginina (R) original por alanina (A) en la posición 39 (R39A), y que además inhibe la proliferación celular y/o metástasis.
2. Variante según la reivindicación 1 caracterizado por que comprende la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 16.
3. Polinucleótido que codifica una variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 3.
5. Vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 3 o una construcción génica según la reivindicación 4.
6. Célula que comprende una variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, un polinucleótido según la reivindicación 3, una construcción génica según la reivindicación 4 o un vector según la reivindicación 5.
7. Uso de una variante según la reivindicación 1, en elaboración de un medicamento.
8. Uso de una variante según la reivindicación 1, en elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de tumores, proliferación celular y/o metástasis.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 donde la variante comprende la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 y/o cualquier combinación de las mismas.
10. Uso según la reivindicación 8, en el que el tumor es tumor maligno o benigno.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que el tumor maligno es cáncer.
12. Uso de una variante según la reivindicación 1, como reactivo para inhibir *in vitro* la proliferación celular.
13. Uso según la reivindicación 12 donde la variante comprende la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 y/o cualquier combinación de las mismas.

14. Uso de una variante según la reivindicación 1, como reactivo para inhibir *in vitro* la expresión de la proteína ERK-1; o la actividad de proteínas reguladoras del ciclo celular seleccionada de la lista que consiste en ciclina B y A.
- 5 15. Uso según la reivindicación 14 donde el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 y/o cualquier combinación de las mismas.
16. Composición farmacéutica que comprende una variante según la reivindicación 1, en una cantidad terapéuticamente efectiva, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16 caracterizada por que la variante comprende la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 y/o cualquier combinación de las mismas.
18. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17 que comprende, además, un agente quimioterapéutico.
- 15 19. Kit que comprende una variante según la reivindicación 1.
20. Kit según la reivindicación 19, donde la variante se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 y/o cualquier combinación de las mismas.
- 20 21. Uso del kit según cualquiera de las reivindicación 19 a 20, para inhibir *in vitro* la proliferación celular y/o para inhibir *in vitro* la actividad de la proteína ERK-1; o la actividad de proteínas reguladoras del ciclo celular seleccionada de la lista que consiste en ciclina B y A.

Figura 1

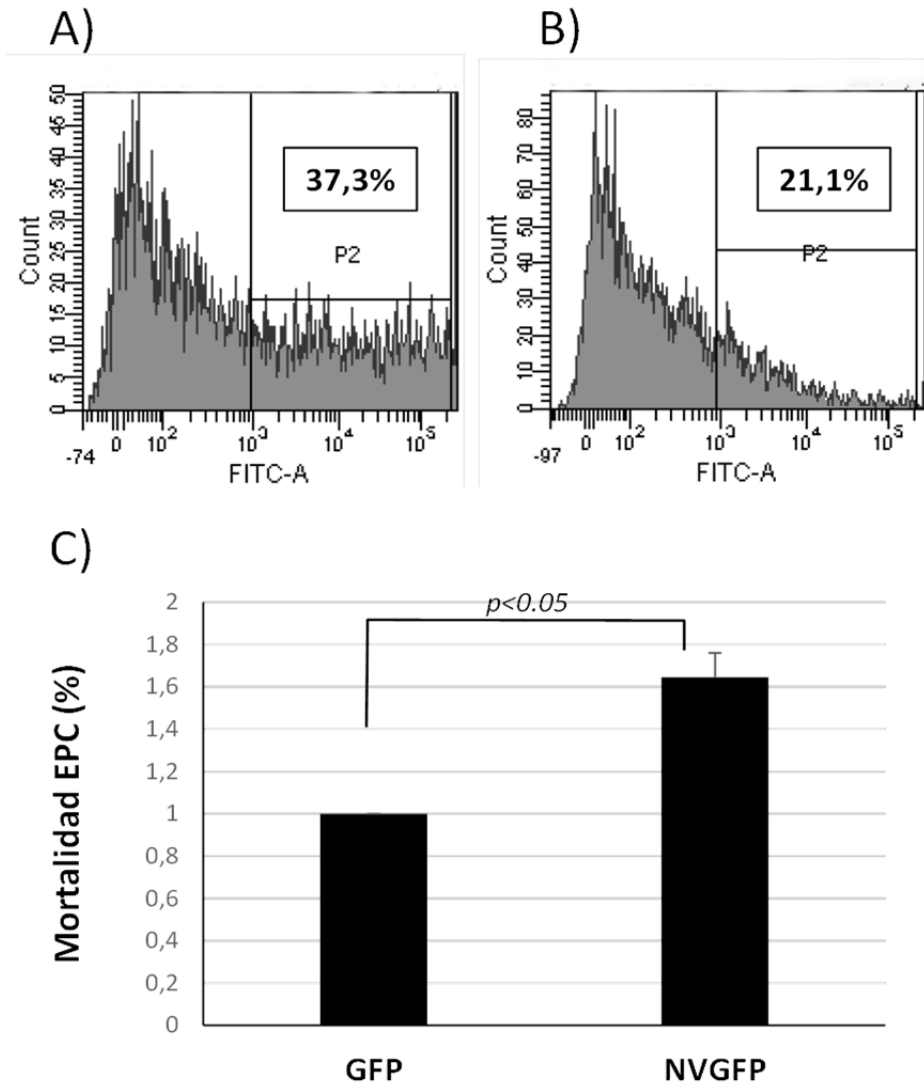


Figura 2

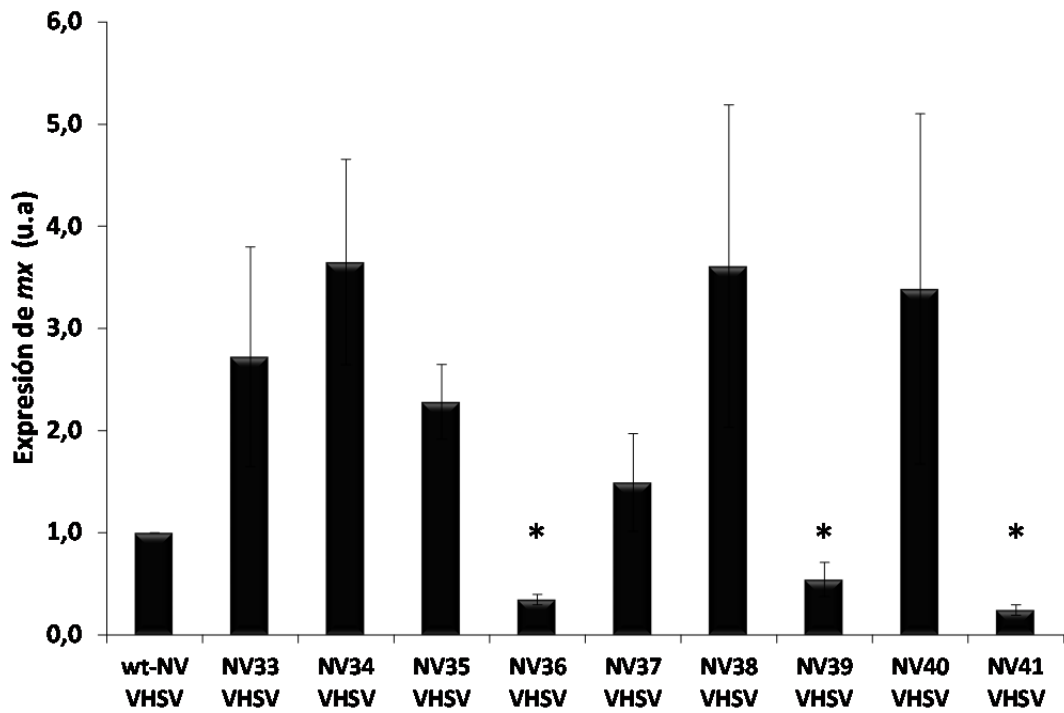


Figura 3

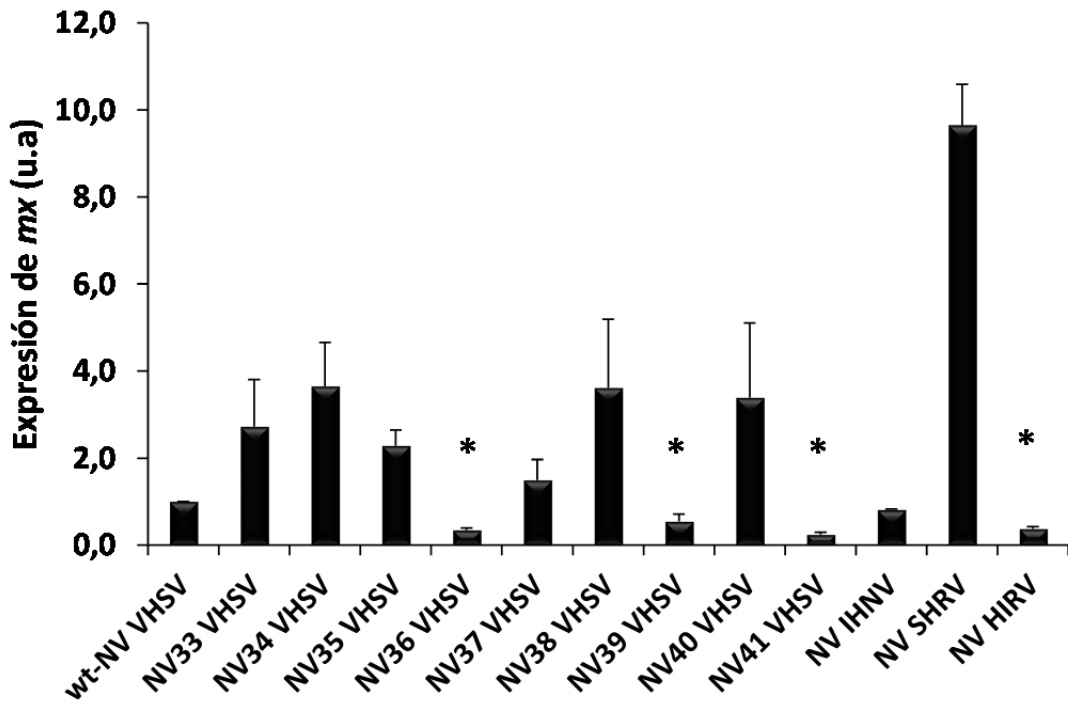


Figura 4

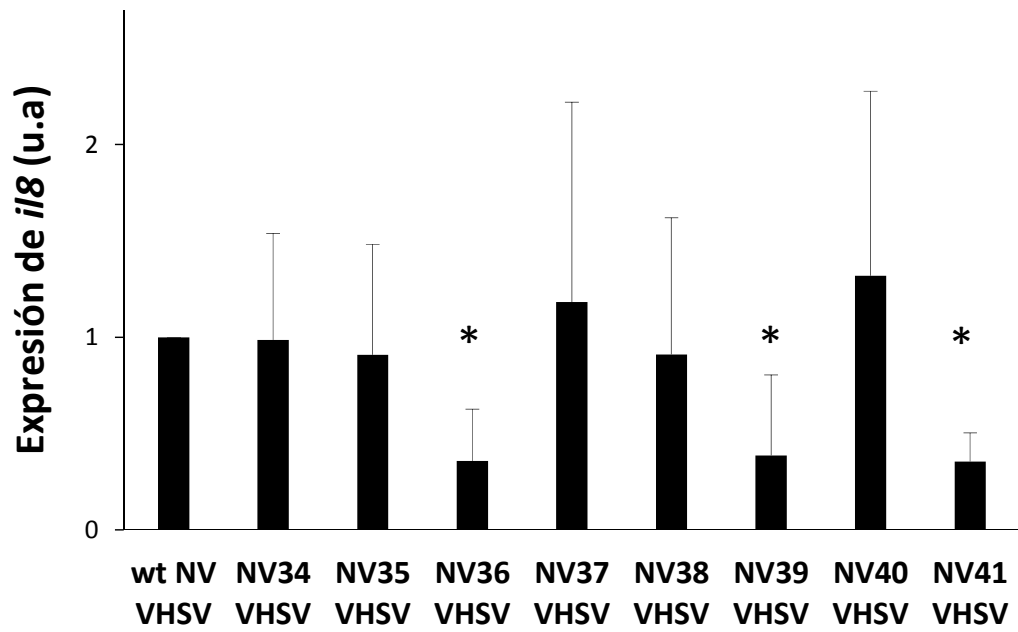


Figura 5

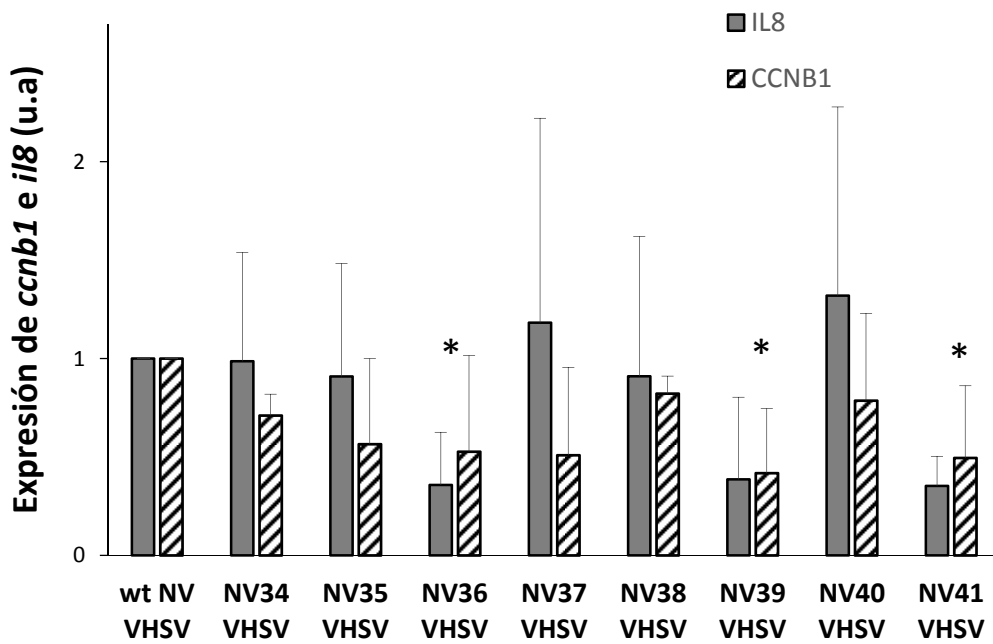


Figura 6

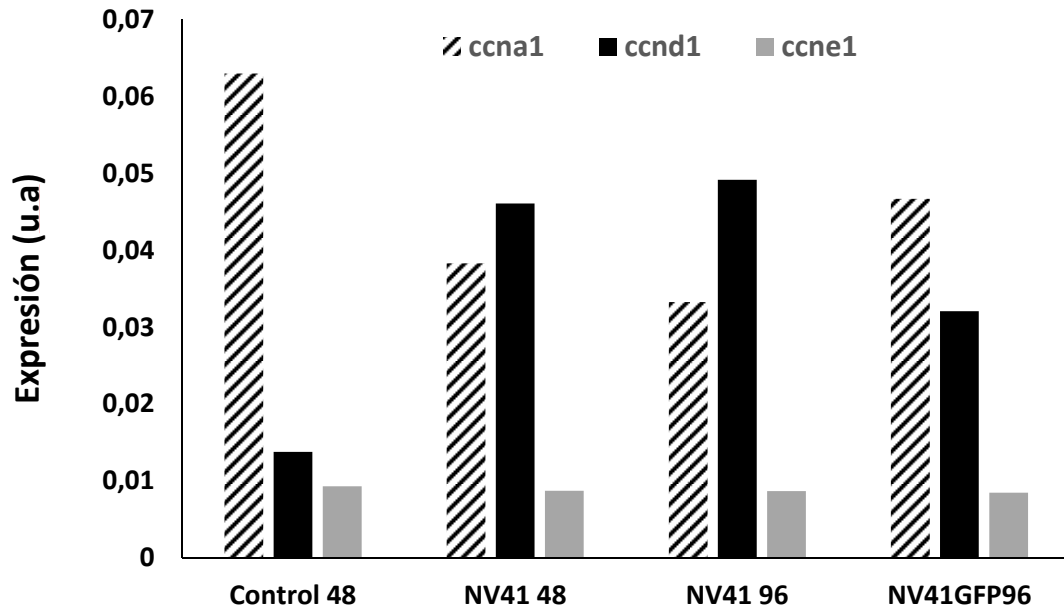


Figura 7

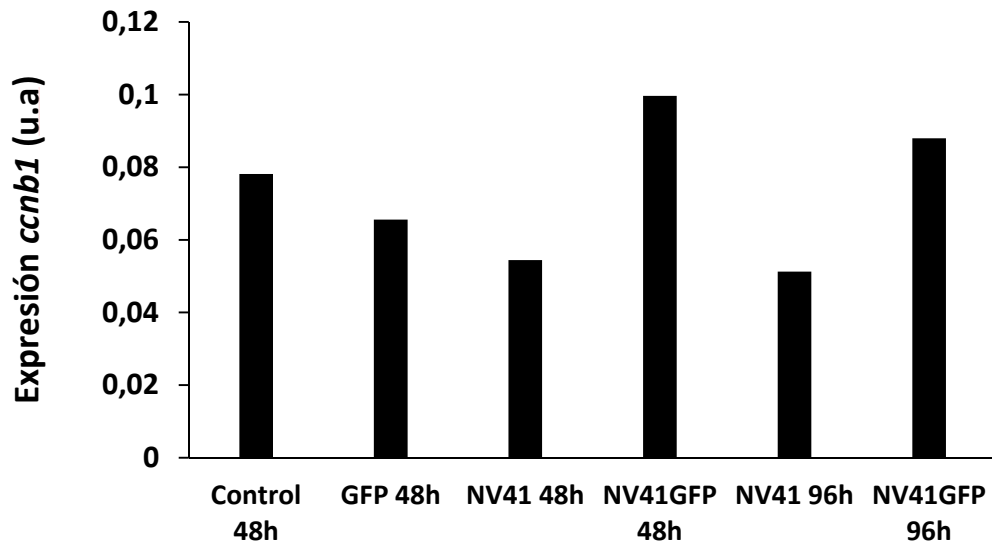




Figura 8

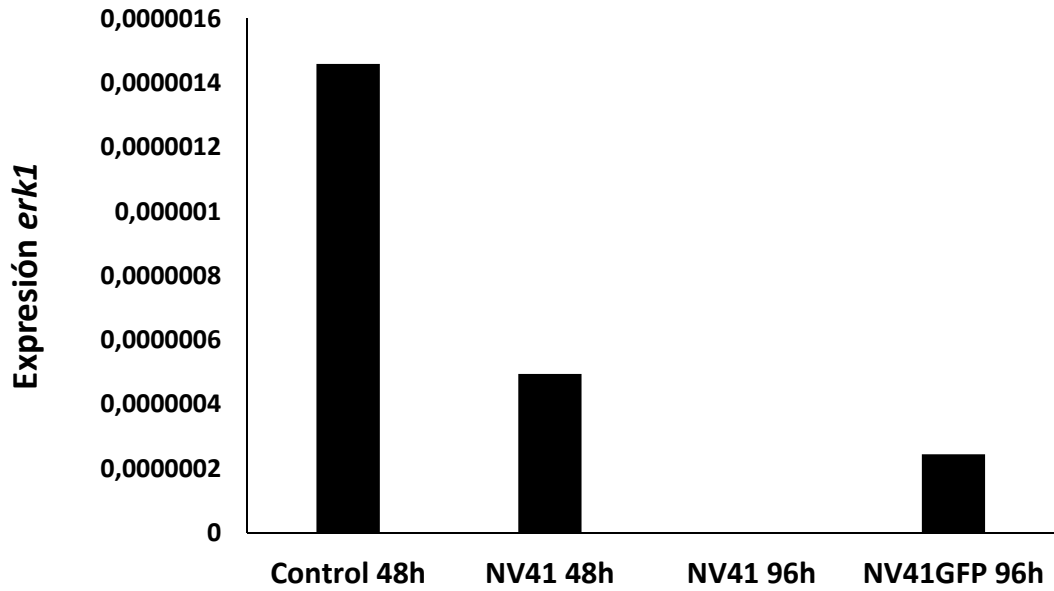


Figura 9

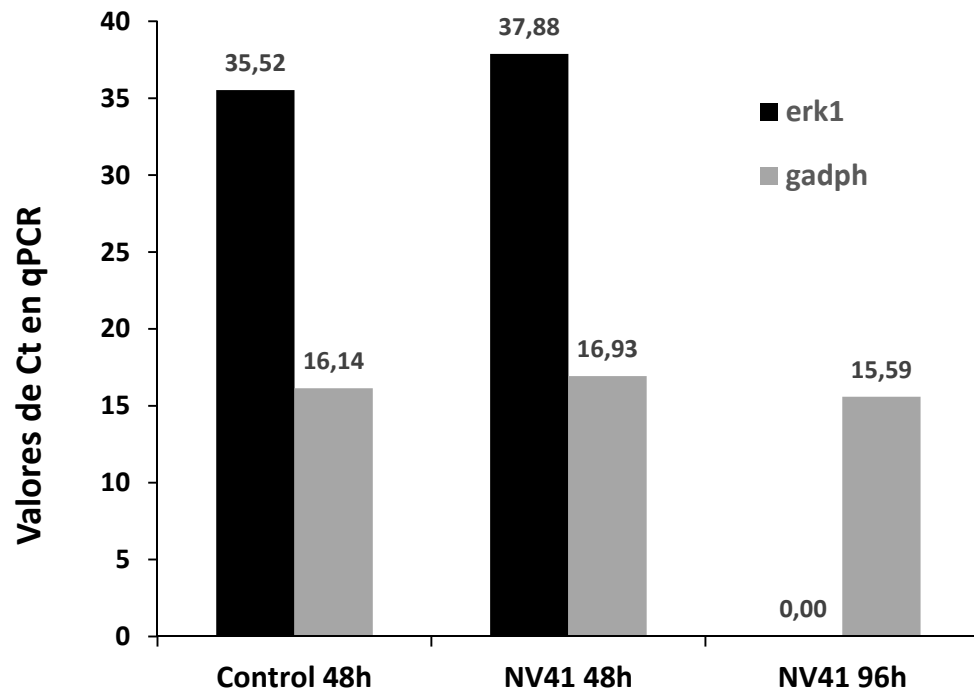


Figura 10

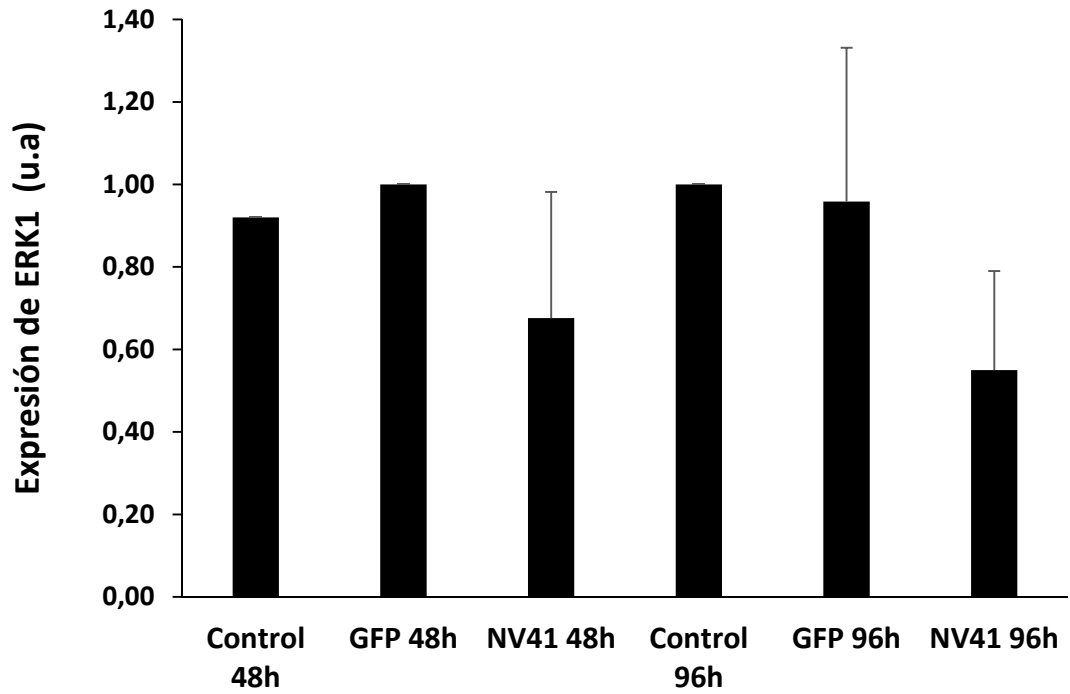


Figura 11

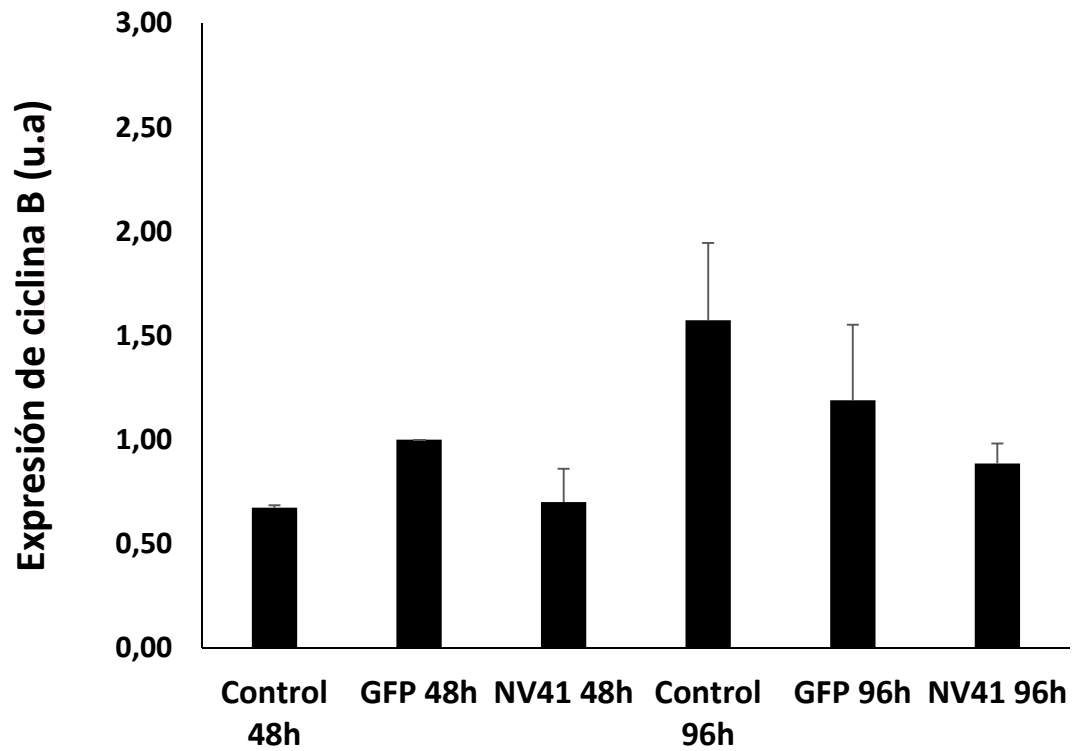
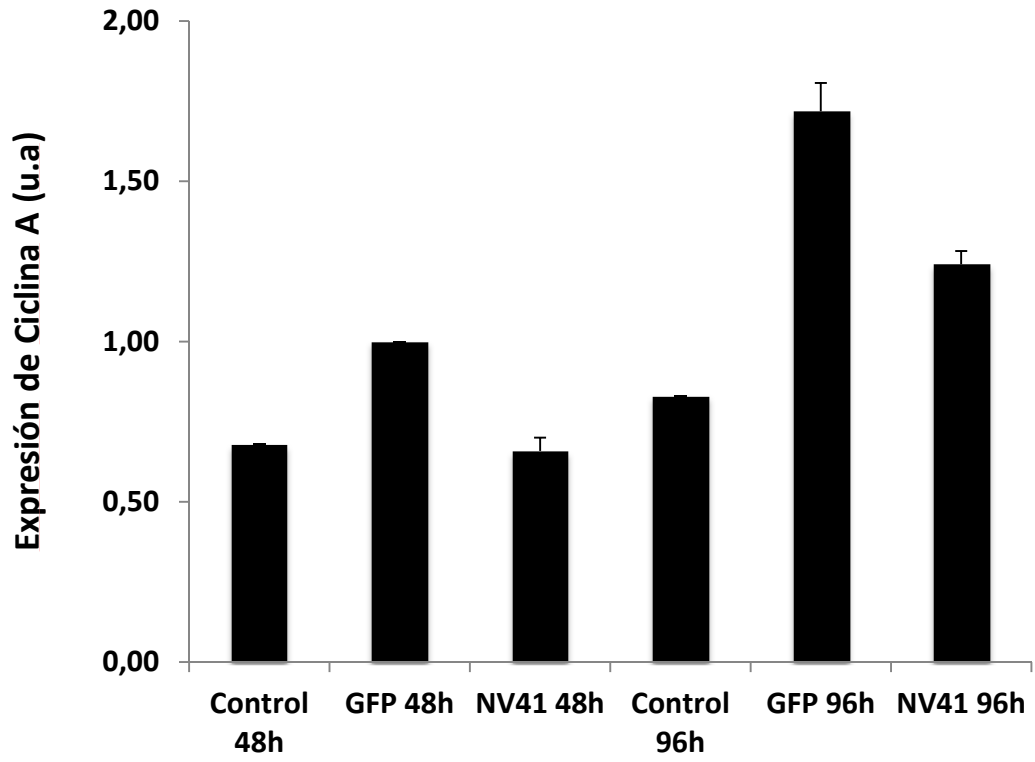


Figura 12



# ES 2 679 570 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
- <120> Polipéptidos virales y su uso en el tratamiento de desórdenes proliferativos
- <130> ES3041.4
- <160> 64
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 369
- <212> DNA
- <213> Viral hemorrhagic septiemia virus

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(369)

```

<400> 1
atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc      48
Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val
1                               5                               10                               15

ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac      96
Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr
20                               25

ctc aac tgt gac ttt gat cgg tcg gac ata tcc acc gtg gac ttc ttt      144
Leu Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe
35                               40                               45

gaa acg acc ctc ccc agg atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg      192
Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg
50                               55                               60

ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga      240
Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg
65                               70                               75

acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt      288
Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly
85                               90                               95

agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg      336
Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly
100                              105                              110

cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc tga      369
Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser
115                              120

```

- <210> 2
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Viral hemorrhagic septiemia virus
- <400> 2

```

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val
1                               5                               10                               15

```

ES 2 679 570 A1

Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser  
 115 120

<210> 3  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV33

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(384)

<400> 3  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

gct aac tgt gac ttt gat cgg tcg gac ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Ala Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg 336

ES 2 679 570 A1

Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc gct agc tcc gga gtt taa 384  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val

<210> 4  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Ala Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
 115 120 125

<210> 5  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV34

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(384)

<400> 5  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

ES 2 679 570 A1

ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

ctc gcc tgt gac ttt gat cgg tcg gac ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Leu Ala Cys Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 80

acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg 336  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc gct agc tcc gga gtt taa 384  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
 115 120 125

<210> 6  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 6

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Cys Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val

ES 2 679 570 A1

115 120 125

<210> 7  
 <211> 390  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV35

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(390)

<400> 7  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

ctc aac gcc gac ttt gat cgg tcg gac ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Leu Asn Ala Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg 336  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc gct agc gct agc tcc gga 384  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ala Ser Ser Gly  
 115 120 125

gtt taa 390  
 Val

<210> 8  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 8

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15



ES 2 679 570 A1

Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Ala Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ala Ser Ser Gly  
 115 120 125

Val

<210> 9  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV36

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(384)

<400> 9  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

ctc aac tgt gct ttt gat cgg tcg gac ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Leu Asn Cys Ala Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly

ES 2 679 570 A1

85 90 95 336  
 agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

384  
 cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc gct agc tcc gga gtt taa  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
 115 120 125

<210> 10  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 10

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Cys Ala Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
 115 120 125

<210> 11  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV37

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(384)

<400> 11 48  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc

ES 2 679 570 A1

Met	Ala	Thr	Gln	Pro	Gly	Leu	Ser	Thr	Thr	Ser	Phe	Ser	Pro	Leu	Val		
1				5					10					15			
ctc	cgt	gag	atg	atc	aca	cac	aga	ctc	aaa	ttt	gac	cca	agc	aac	tac		96
Leu	Arg	Glu	Met	Ile	Thr	His	Arg	Leu	Lys	Phe	Asp	Pro	Ser	Asn	Tyr		
			20					25					30				
ctc	aac	tgt	gac	gcc	gat	cgg	tcg	gac	ata	tcc	acc	gtg	gac	ttc	ttt		144
Leu	Asn	Cys	Asp	Ala	Asp	Arg	Ser	Asp	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Phe	Phe		
		35					40					45					
gaa	acg	acc	ctc	ccc	aga	atc	cta	gat	gat	ctg	agg	gcc	agt	aca	cgg		192
Glu	Thr	Thr	Leu	Pro	Arg	Ile	Leu	Asp	Asp	Leu	Arg	Ala	Ser	Thr	Arg		
	50					55					60						
ctt	cct	cac	ctc	cat	gtg	ctc	gac	atg	agg	ata	agt	ctc	cta	gag	aga		240
Leu	Pro	His	Leu	His	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Glu	Arg		
65					70				75						80		
acc	cac	tac	atg	ttc	agg	aac	gtc	ccc	tct	agt	ccc	gcc	aca	acc	ggt		288
Thr	His	Tyr	Met	Phe	Arg	Asn	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Thr	Gly		
				85					90					95			
agg	ctg	aca	gat	cct	gga	ctc	gtc	atc	att	tca	cat	gca	gag	gtg	ggg		336
Arg	Leu	Thr	Asp	Pro	Gly	Leu	Val	Ile	Ile	Ser	His	Ala	Glu	Val	Gly		
			100					105					110				
cta	ttg	aca	aga	ggc	tct	ggg	ctc	acc	tcc	gct	agc	tcc	gga	gtt	taa		384
Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Ala	Ser	Ser	Gly	Val			
		115					120					125					

<210> 12  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 12

Met	Ala	Thr	Gln	Pro	Gly	Leu	Ser	Thr	Thr	Ser	Phe	Ser	Pro	Leu	Val		
1				5					10					15			
Leu	Arg	Glu	Met	Ile	Thr	His	Arg	Leu	Lys	Phe	Asp	Pro	Ser	Asn	Tyr		
			20					25					30				
Leu	Asn	Cys	Asp	Ala	Asp	Arg	Ser	Asp	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Phe	Phe		
		35					40					45					
Glu	Thr	Thr	Leu	Pro	Arg	Ile	Leu	Asp	Asp	Leu	Arg	Ala	Ser	Thr	Arg		
	50					55					60						
Leu	Pro	His	Leu	His	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Glu	Arg		
65					70				75						80		
Thr	His	Tyr	Met	Phe	Arg	Asn	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Thr	Gly		
			85					90						95			
Arg	Leu	Thr	Asp	Pro	Gly	Leu	Val	Ile	Ile	Ser	His	Ala	Glu	Val	Gly		
			100					105					110				

ES 2 679 570 A1

Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
 115 120 125

<210> 13  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV38

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(384)

<400> 13  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

ctc aac tgt gac ttt gcc cgg tcg gac ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Leu Asn Cys Asp Phe Ala Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg 336  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc gct agc tcc gga gtt taa 384  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
 115 120 125

<210> 14  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 14

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr

ES 2 679 570 A1

20 25 30

Leu Asn Cys Asp Phe Ala Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110

Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
 115 120 125

<210> 15  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV39

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(384)

<400> 15  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

ctc aac tgt gac ttt gat gct tcg gac ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Leu Asn Cys Asp Phe Asp Ala Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg 336  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110





ES 2 679 570 A1

<210> 19  
 <211> 384  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV41

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(384)

<400> 19  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15  
 ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 ctc aac tgt gac ttt gat cgg tcg gcc ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Leu Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Ala Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45  
 gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80  
 acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95  
 agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg 336  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110  
 cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc gct agc tcc gga gtt taa 384  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
 115 120 125

<210> 20  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 20

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Ala Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45



ES 2 679 570 A1

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
65 70 75 80

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
85 90 95

Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
100 105 110

Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Ser Gly Val  
115 120 125

<210> 21  
<211> 363  
<212> DNA  
<213> Infectious hematopoietic necrosis virus cepa Oregon69

<220>  
<221> CDS  
<222> (1).. (363)

<400> 21  
atg tct gtg gac ctc cca cag ccg acc atg aac tca aaa acc cca agc 48  
Met Ser Val Asp Leu Pro Gln Pro Thr Met Asn Ser Lys Thr Pro Ser  
1 5 10 15  
acc gac atc gca gcg ttg aag gat ctg ctg aga tac aaa gtc acg gtg 96  
Thr Asp Ile Ala Ala Leu Lys Asp Leu Leu Arg Tyr Lys Val Thr Val  
20 25 30  
gca aga cat ggg ttc tta ttt gat gat gga aag att gtt tgg agc gaa 144  
Ala Arg His Gly Phe Leu Phe Asp Asp Gly Lys Ile Val Trp Ser Glu  
35 40 45  
gat ggg gat gag gca tgg aat aga ctc ctt gtt gtt gtc ggg gca tta 192  
Asp Gly Asp Glu Ala Trp Asn Arg Leu Leu Val Val Val Gly Ala Leu  
50 55 60  
agg tcc tct aac agg atg agt cag gca ctg ttc atg gac atg agc atc 240  
Arg Ser Ser Asn Arg Met Ser Gln Ala Leu Phe Met Asp Met Ser Ile  
65 70 75 80  
acc aag ggg gac gga tat cta ctc ttc tcc gac ctg cag gga aca aac 288  
Thr Lys Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Phe Ser Asp Leu Gln Gly Thr Asn  
85 90 95  
aat ttg cag tac cgg acc cca aaa ttc agg caa tac ctg ttt cca gta 336  
Asn Leu Gln Tyr Arg Thr Pro Lys Phe Arg Gln Tyr Leu Phe Pro Val  
100 105 110  
gac gag ttc ctc cct ctc ccc aga tag 363  
Asp Glu Phe Leu Pro Leu Pro Arg  
115 120

<210> 22  
<211> 120

ES 2 679 570 A1

<212> PRT  
 <213> Infectious hematopoietic necrosis virus cepa Oregon69  
 <400> 22

Met Ser Val Asp Leu Pro Gln Pro Thr Met Asn Ser Lys Thr Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Asp Ile Ala Ala Leu Lys Asp Leu Leu Arg Tyr Lys Val Thr Val  
 20 25 30  
 Ala Arg His Gly Phe Leu Phe Asp Asp Gly Lys Ile Val Trp Ser Glu  
 35 40 45  
 Asp Gly Asp Glu Ala Trp Asn Arg Leu Leu Val Val Val Gly Ala Leu  
 50 55 60  
 Arg Ser Ser Asn Arg Met Ser Gln Ala Leu Phe Met Asp Met Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Thr Lys Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Phe Ser Asp Leu Gln Gly Thr Asn  
 85 90 95  
 Asn Leu Gln Tyr Arg Thr Pro Lys Phe Arg Gln Tyr Leu Phe Pro Val  
 100 105 110  
 Asp Glu Phe Leu Pro Leu Pro Arg  
 115 120

<210> 23  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> Snakehead rhabdovirus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(369)

<400> 23  
 atg ccc ggc aac aac cac aat gac cgc ccc gtc gcc cta ata atg tcc 48  
 Met Pro Gly Asn Asn His Asn Asp Arg Pro Val Ala Leu Ile Met Ser  
 1 5 10 15  
 cgc ctc tct cgc gac cct aga gac tgc atc cat cac acc gtt gac acc 96  
 Arg Leu Ser Arg Asp Pro Arg Asp Cys Ile His His Thr Val Asp Thr  
 20 25 30  
 cga ggc atg acc ccc gga aaa atc atc cat cag gtg atc cct cct cat 144  
 Arg Gly Met Thr Pro Gly Lys Ile Ile His Gln Val Ile Pro Pro His  
 35 40 45  
 ccg acc caa atg agg cac aca aat cgc ccc tcg ccc cct gtc atc ctc 192  
 Pro Thr Gln Met Arg His Thr Asn Arg Pro Ser Pro Pro Val Ile Leu  
 50 55 60  
 aac ttg cag atc ctc tca gaa ggg gga cac gtc tgt gca agg gat gtg 240  
 Asn Leu Gln Ile Leu Ser Glu Gly Gly His Val Cys Ala Arg Asp Val  
 65 70 75 80

ES 2 679 570 A1

gac acc gca gac cca gtc cca aga gca gga ccc gag aga acc atc cag 288  
 Asp Thr Ala Asp Pro Val Pro Arg Ala Gly Pro Glu Arg Thr Ile Gln  
 85 90 95

tgg ggc acg gac cgg gac gcc aca gaa gaa cta gca tct cct gcc cca 336  
 Trp Gly Thr Asp Arg Asp Ala Thr Glu Glu Leu Ala Ser Pro Ala Pro  
 100 105 110

gag gag ata tat gaa gac aac gac tcc tgg tag 369  
 Glu Glu Ile Tyr Glu Asp Asn Asp Ser Trp  
 115 120

<210> 24  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Snakehead rhabdovirus  
 <400> 24

Met Pro Gly Asn Asn His Asn Asp Arg Pro Val Ala Leu Ile Met Ser  
 1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Asp Pro Arg Asp Cys Ile His His Thr Val Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gly Met Thr Pro Gly Lys Ile Ile His Gln Val Ile Pro Pro His  
 35 40 45

Pro Thr Gln Met Arg His Thr Asn Arg Pro Ser Pro Pro Val Ile Leu  
 50 55 60

Asn Leu Gln Ile Leu Ser Glu Gly Gly His Val Cys Ala Arg Asp Val  
 65 70 75 80

Asp Thr Ala Asp Pro Val Pro Arg Ala Gly Pro Glu Arg Thr Ile Gln  
 85 90 95

Trp Gly Thr Asp Arg Asp Ala Thr Glu Glu Leu Ala Ser Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Glu Ile Tyr Glu Asp Asn Asp Ser Trp  
 115 120

<210> 25  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> Hirame rhabdovirus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(363)

<400> 25  
 atg tct gtg gac ctc cca cag ccg acc atg aac tca aaa acc cca agc 48  
 Met Ser Val Asp Leu Pro Gln Pro Thr Met Asn Ser Lys Thr Pro Ser  
 1 5 10 15

acc gac atc gca gcg ttg aag gat ctg ctg aga tac aaa gtc acg gtg 96

ES 2 679 570 A1

Thr Asp Ile Ala Ala Leu Lys Asp Leu Leu Arg Tyr Lys Val Thr Val  
 20 25 30

gca aga cat ggg ttc tta ttt gat gat gga aag att gtt tgg agc gaa 144  
 Ala Arg His Gly Phe Leu Phe Asp Asp Gly Lys Ile Val Trp Ser Glu  
 35 40 45

gat ggg gat gag gca tgg aat aga ctc ctt gtt gtt gtc ggg gca tta 192  
 Asp Gly Asp Glu Ala Trp Asn Arg Leu Leu Val Val Val Gly Ala Leu  
 50 55 60

agg tcc tct aac agg atg agt cag gca ctg ttc atg gac atg agc atc 240  
 Arg Ser Ser Asn Arg Met Ser Gl n Ala Leu Phe Met Asp Met Ser Ile  
 65 70 75 80

acc aag ggg gac gga tat cta ctc ttc tcc gac ctg cag gga aca aac 288  
 Thr Lys Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Phe Ser Asp Leu Gl n Gly Thr Asn  
 85 90 95

aat ttg cag tac cgg acc cca aaa ttc agg caa tac ctg ttt cca gta 336  
 Asn Leu Gl n Tyr Arg Thr Pro Lys Phe Arg Gl n Tyr Leu Phe Pro Val  
 100 105 110

gac gag ttc ctc cct ctc ccc aga tag 363  
 Asp Glu Phe Leu Pro Leu Pro Arg  
 115 120

<210> 26  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Hirame rhabdovirus

<400> 26

Met Ser Val Asp Leu Pro Gl n Pro Thr Met Asn Ser Lys Thr Pro Ser  
 1 5 10 15

Thr Asp Ile Ala Ala Leu Lys Asp Leu Leu Arg Tyr Lys Val Thr Val  
 20 25 30

Ala Arg His Gly Phe Leu Phe Asp Asp Gly Lys Ile Val Trp Ser Glu  
 35 40 45

Asp Gly Asp Glu Ala Trp Asn Arg Leu Leu Val Val Val Gly Ala Leu  
 50 55 60

Arg Ser Ser Asn Arg Met Ser Gl n Ala Leu Phe Met Asp Met Ser Ile  
 65 70 75 80

Thr Lys Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Phe Ser Asp Leu Gl n Gly Thr Asn  
 85 90 95

Asn Leu Gl n Tyr Arg Thr Pro Lys Phe Arg Gl n Tyr Leu Phe Pro Val  
 100 105 110

Asp Glu Phe Leu Pro Leu Pro Arg  
 115 120

<210> 27

ES 2 679 570 A1

<211> 1107  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV de VHSV unido a GFP

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1107)

<400> 27  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15  
 ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 ctc aac tgt gac ttt gat cgg tcg gac ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Leu Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45  
 gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75  
 acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95  
 agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg 336  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110  
 cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc gct agc atg gtg agc aag 384  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Met Val Ser Lys  
 115 120 125  
 ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac 432  
 Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp  
 130 135 140  
 ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc 480  
 Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly  
 145 150 155 160  
 gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc 528  
 Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly  
 165 170 175  
 aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tac ggc 576  
 Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly  
 180 185 190  
 gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc 624  
 Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe  
 195 200 205  
 ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc 672  
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe  
 210 215 220

ES 2 679 570 A1

ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag 720  
 Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu  
 225 230 235 240

ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag 768  
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys  
 245 250 255

gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc 816  
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser  
 260 265 270

cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg 864  
 His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val  
 275 280 285

aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc 912  
 Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala  
 290 295 300

gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg 960  
 Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu  
 305 310 315 320

ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc 1008  
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro  
 325 330 335

aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc 1056  
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala  
 340 345 350

ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag gct agc tcc gga gtt 1104  
 Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Ser Ser Gly Val  
 355 360 365

taa 1107

<210> 28  
 <211> 368  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 28

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Asp Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

ES 2 679 570 A1

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Met Val Ser Lys  
 115 120 125  
 Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp  
 130 135 140  
 Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly  
 145 150 155 160  
 Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly  
 165 170 175  
 Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly  
 180 185 190  
 Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe  
 195 200 205  
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe  
 210 215 220  
 Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu  
 225 230 235 240  
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys  
 245 250 255  
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser  
 260 265 270  
 His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val  
 275 280 285  
 Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala  
 290 295 300  
 Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro  
 325 330 335  
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala  
 340 345 350

ES 2 679 570 A1

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Ser Ser Gly Val  
 355 360 365

<210> 29  
 <211> 735  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> GFP

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(735)

<400> 29  
 atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48  
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
 1 5 10 15  
 gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96  
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly  
 20 25 30  
 gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144  
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile  
 35 40 45  
 tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc 192  
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
 50 55 60  
 ctg acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag 240  
 Leu Thr Tyr Gly Val Glu Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
 65 70 75 80  
 cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288  
 Glu His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Glu Glu  
 85 90 95  
 cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336  
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
 100 105 110  
 gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384  
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
 115 120 125  
 atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432  
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
 130 135 140  
 aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac 480  
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Glu Lys Asn  
 145 150 155 160  
 ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc 528  
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser  
 165 170 175  
 gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc 576  
 Val Glu Leu Ala Asp His Tyr Glu Glu Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
 180 185 190



ES 2 679 570 A1

ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg 624  
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu  
 195 200 205

agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc 672  
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
 210 215 220

gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag gct 720  
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala  
 225 230 235 240

agc tcc gga gtt taa 735  
 Ser Ser Gly Val

<210> 30  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 30

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly  
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile  
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
 50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu  
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

ES 2 679 570 A1

165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu  
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala  
 225 230 235 240

Ser Ser Gly Val

<210> 31  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador directo del gen rplp0

<400> 31  
 cacgctgctg aacatgctga ac 22

<210> 32  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador inverso del gen rplp0

<400> 32  
 aatcctcctt gggtgcctcc tc 22

<210> 33  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador directo del gen mx

<400> 33  
 ggtctctggg agtcgaaaag g 21

<210> 34  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cebador reverso del gen mx

<400> 34

aactctttcc cgagctttgg t	21
<210> 35	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador directo del gen IL8	
<400> 35	
aaacagaaag ccgacgcatt gg	22
<210> 36	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador reverso del gen IL8	
<400> 36	
agcagagggg tccagacaga tc	22
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador directo del gen ccnb1	
<400> 37	
ccggaaaagc agttgtagcg	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador reverso del gen ccnb1	
<400> 38	
cctgtcgtgt ttgcgattg	20
<210> 39	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador directo de NV (VHSV)	
<400> 39	
aaaagctta tggcgacca acccgg	26
<210> 40	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

ES 2 679 570 A1

<220>		
<223>	Cebador reverso de NV (VHSV)	
<400>	40	
	tttgctagcg gaggtgagcc cagagcc	27
<210>	41	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador directo NV (IHNV)	
<400>	41	
	ggaccaccgc gacataaaca c	21
<210>	42	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador reverso NV (IHNV)	
<400>	42	
	cttcaatcag gatcagatgt ctcc	24
<210>	43	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador directo NV (HIRV)	
<400>	43	
	cagcgttgaa ggatctgctg ag	22
<210>	44	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador reverso NV (HIRV)	
<400>	44	
	ggaggaactc gtctactgga	20
<210>	45	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador directo NV (SHRV)	
<400>	45	
	cccggcaaca accacaatga c	21
<210>	46	

ES 2 679 570 A1

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador reverso NV (SHRV)  
  
 <400> 46  
 ccaggagtcg ttgtcttcat 20  
  
 <210> 47  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo del gen gapdh  
  
 <400> 47  
 ccccttcatt gacctcaact ac 22  
  
 <210> 48  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador reverso del gen gapdh  
  
 <400> 48  
 gatgacaagc ttcccgttct c 21  
  
 <210> 49  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo del gen mx  
  
 <400> 49  
 cagcacctga tggcctatca 20  
  
 <210> 50  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador reverso del gen mx  
  
 <400> 50  
 tggagcatga agaactggat ga 22  
  
 <210> 51  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo del gen IL8  
  
 <400> 51

aggtgcagtt ttgccaagga	20
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador reverso del gen IL8	
<400> 52	
tttctgtgtt ggcgcagtgt	20
<210> 53	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador directo del gen ccna1	
<400> 53	
aagagcttta aactttggtc tggg	24
<210> 54	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador reverso del gen ccnb1	
<400> 54	
ctttgtaagt ccttgattta ccatg	25
<210> 55	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador directo del gen ccnb1	
<400> 55	
aagagcttta aactttggtc tggg	24
<210> 56	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Cebador reverso del gen ccnb1	
<400> 56	
ctttgtaagt ccttgattta ccatg	25
<210> 57	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>		
<223>	Cebador directo del gen ccnd	
<400>	57	
	tgttcgtggc ctctaagatg aag	23
<210>	58	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador reverso del gen ccnd	
<400>	58	
	aggttcact tgagcttggt cac	23
<210>	59	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador directo del gen ccne	
<400>	59	
	gttataaggg agacggggag	20
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador reverso del gen ccne	
<400>	60	
	tgctctgctt cttaccgctc	20
<210>	61	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador directo del gen erk1	
<400>	61	
	ccaggacat ggaatgcaa	19
<210>	62	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cebador reverso del gen erk1	
<400>	62	
	ccagtgggac ctcgatctcc	20
<210>	63	

ES 2 679 570 A1

<211> 1107  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> NV41GFP

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1107)

<400> 63  
 atg gcg acc caa ccc ggg ctc agc aca acc agc ttc tct ccg ctc gtc 48  
 Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15  
 ctc cgt gag atg atc aca cac aga ctc aaa ttt gac cca agc aac tac 96  
 Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 ctc aac tgt gac ttt gat cgg tcg gcc ata tcc acc gtg gac ttc ttt 144  
 Leu Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Ala Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45  
 gaa acg acc ctc ccc aga atc cta gat gat ctg agg gcc agt aca cgg 192  
 Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 ctt cct cac ctc cat gtg ctc gac atg agg ata agt ctc cta gag aga 240  
 Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75  
 acc cac tac atg ttc agg aac gtc ccc tct agt ccc gcc aca acc ggt 288  
 Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95  
 agg ctg aca gat cct gga ctc gtc atc att tca cat gca gag gtg ggg 336  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110  
 cta ttg aca aga ggc tct ggg ctc acc tcc gct agc atg gtg agc aag 384  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Met Val Ser Lys  
 115 120 125  
 ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac 432  
 Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp  
 130 135 140  
 ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc 480  
 Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly  
 145 150 155 160  
 gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc 528  
 Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly  
 165 170 175  
 aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tac ggc 576  
 Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly  
 180 185 190  
 gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc 624  
 Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe  
 195 200 205  
 ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc 672  
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe  
 210 215 220



ES 2 679 570 A1

ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag 720  
 Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu  
 225 230 235 240

ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag 768  
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys  
 245 250 255

gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc 816  
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser  
 260 265 270

cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg 864  
 His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val  
 275 280 285

aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc 912  
 Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala  
 290 295 300

gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg 960  
 Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu  
 305 310 315 320

ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc 1008  
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro  
 325 330 335

aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc 1056  
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala  
 340 345 350

ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag gct agc tcc gga gtt 1104  
 Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Ser Ser Gly Val  
 355 360 365

taa 1107

<210> 64  
 <211> 368  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 64

Met Ala Thr Gln Pro Gly Leu Ser Thr Thr Ser Phe Ser Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Leu Arg Glu Met Ile Thr His Arg Leu Lys Phe Asp Pro Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Cys Asp Phe Asp Arg Ser Ala Ile Ser Thr Val Asp Phe Phe  
 35 40 45

Glu Thr Thr Leu Pro Arg Ile Leu Asp Asp Leu Arg Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60

Leu Pro His Leu His Val Leu Asp Met Arg Ile Ser Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

ES 2 679 570 A1

Thr His Tyr Met Phe Arg Asn Val Pro Ser Ser Pro Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95  
 Arg Leu Thr Asp Pro Gly Leu Val Ile Ile Ser His Ala Glu Val Gly  
 100 105 110  
 Leu Leu Thr Arg Gly Ser Gly Leu Thr Ser Ala Ser Met Val Ser Lys  
 115 120 125  
 Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp  
 130 135 140  
 Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly  
 145 150 155 160  
 Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly  
 165 170 175  
 Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly  
 180 185 190  
 Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe  
 195 200 205  
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe  
 210 215 220  
 Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu  
 225 230 235 240  
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys  
 245 250 255  
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser  
 260 265 270  
 His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val  
 275 280 285  
 Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala  
 290 295 300  
 Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro  
 325 330 335  
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala  
 340 345 350

ES 2 679 570 A1

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Ser Ser Gly Val  
355 360 365



- ②① N.º solicitud: 201730260  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.02.2017  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHINCHILLA, B. et al. "Transcriptome analysis of rainbow trout in response to non-virion (NV) protein of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 16/01/2015, Vol. 99, Nº 4, Páginas 1827-1843, <DOI: 10.1007/s00253-014-6366-3>. todo el documento.	1-21
A	KIM, M.S. et al. "Effects of NV gene knock-out recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSH) on Mx gene expression in <i>Epithelioma papulosumcyprini</i> (EPC) cells and olive flounder ( <i>Paralichthys olivaceous</i> )". FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY, 02/01/2012, Vol. 32, Nº 3, Páginas 459-463. todo el documento.	1-21

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 26.02.2018</p>	<p><b>Examinador</b> M. Novoa Sanjurjo</p>	<p><b>Página</b> 1/4</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K14/145** (2006.01)

**A61K38/16** (2006.01)

**A61P35/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, EMBL, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.02.2018

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-21	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-21	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CHINCHILLA, B. et al. "Transcriptome analysis of rainbow trout in response to non-virion (NV) protein of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Vol. 99, Nº 4, Páginas 1827-1843, <DOI: 10.1007/s00253-014-6366-3>	16.01.2015
D02	KIM, M.S. et al. "Effects of NV gene knock-out recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSH) on Mx gene expression in <i>Epithelioma papulosumcyprini</i> (EPC) cells and olive flounder ( <i>paralichthys olivaceous</i> ). FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY, Vol. 32, Nº 3, Páginas 459-463	02.01.2012

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención agrupa a tres variantes D36A, R39A y D41A de la proteína NV (no viriónica) del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSH), que presentan en las células en las que se expresan, mayor inhibición de los genes relacionados con la apoptosis, que la proteína NV salvaje.

**NOVEDAD**

## Reivindicaciones 1-21

Las variantes de la proteína NV del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSH) de la invención, no han sido descritas previamente en el estado de la técnica. Se considera que las reivindicaciones 1-21, cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

**ACTIVIDAD INVENTIVA**

## Reivindicaciones 1-15

Los documentos D01 y D02, reflejan el estado general de la técnica en relación a las variantes de la invención. El documento D01, presenta el transcriptoma de células de la trucha arcoiris en respuesta a la proteína NV del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSH) (ver Fig. 4). El documento D02, analiza el efecto de la proteína NV salvaje, en la expresión del gen mx en peces.

Las variantes de la invención, inhiben la expresión de los genes mx, il8, y ciclina b1 en mayor medida que la proteína NV salvaje, lo que supone un avance inventivo respecto a lo descrito previamente en el estado de la técnica. Las reivindicaciones 1-21, cumplen el requisito de actividad inventiva del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.