

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 932**

21 Número de solicitud: 201830047

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A01K 61/59 (2007.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.01.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.07.2019

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (80.0%)

C/ Ancha 16

11001 Cádiz ES;

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE

VALPARAÍSO (10.0%);

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES

CIENTÍFICAS (5.0%) y

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS

SUPERIORES DE MONTERREY (5.0%)

72 Inventor/es:

FAJARDO QUIÑONES, Carlos;

MANCERA ROMERO, Juan Miguel ;

RENDÓN UNCETA, María Del Carmen ;

FERNÁNDEZ ACERO, Francisco Javier ;

MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, Gonzalo;

DE DONATO CAPOTE, Marcos;

GÓMEZ CARMONA, Fernando Andrés y

CORTÉS SALINAS, Lina Jimena

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

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

54 Título: **PRODUCTO COMBINADO PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS VIRALES EN LA ACUICULTURA DE CRUSTÁCEOS.**

57 Resumen:

Producto combinado para el control de patógenos virales en la acuicultura de crustáceos.

El objeto de la presente invención es proporcionar un producto combinado que comprende (i) ARN de interferencia que inhibe la expresión del gen Rab7 en un crustáceo, y (ii) partículas parecidas al virus que comprenden la proteína recombinante de la cápside del PstDV1, para su uso en el control de patógenos virales en la acuicultura de crustáceos.

ES 2 719 932 A1

DESCRIPCIÓN

PRODUCTO COMBINADO PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS VIRALES EN LA ACUICULTURA DE CRUSTÁCEOS

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención pertenece al campo de la acuicultura, en particular se dirige a un producto combinado que comprende ARN que inhibe la expresión del gen Rab7 y partículas parecidas al virus, y el uso de dicho producto combinado para el control de patógenos virales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Las enfermedades virales han sido uno de los puntos de control más difíciles en el cultivo de camarones ya que estos organismos carecen de un sistema de respuesta inmune específico (inmunidad adaptativa representada por la resistencia a la exposición repetida a antígenos, presencia de anticuerpos y linfocitos T y B); por consiguiente, las vacunas que tradicionalmente se utilizan durante el proceso de cría animal, no han sido una opción viable
20 (Lightner, 1996).

Actualmente no existe un enfoque terapéutico disponible para el control de infecciones virales en camaronicultura; sin embargo, se realizan esfuerzos para desarrollar terapias antivirales para combatir este tipo de infecciones en camarones. Estos esfuerzos se basan
25 primordialmente en el silenciamiento de genes mediado por ARN bicatenario (dsRNA) o mediante mecanismos que implican el uso de ARN de interferencia (ARNi). Se ha informado que el ARNi puede proteger a los camarones de varios virus altamente patógenos incluyendo el virus de la mancha blanca (WSSV), virus de la cabeza amarilla (YHV), virus del síndrome del Taura (TSV) y el Penstylidensovirus de decápodo 1 (PstDV1) (Tirasophon
30 et al., 2005; Saksmerprom et al., 2009; Attasart et al., 2011; Ongvarrasopone et al., 2011; Saksmerprom et al., 2013; Itsathitphaisarn et al., 2017).

El ARNi es un método prometedor para prevenir y curar enfermedades virales en camarones. El mecanismo de acción del ARNi es iniciado por una molécula bicatenaria de
35 ARN (dsARN) la cual conduce a la degradación del ARN mensajero (ARNm) de secuencias específicas y homólogas (Fire, et al., 1998). En camarones, el ARN bicatenario

complementario a un gen viral como el de la proteasa del YHV ha mostrado prevenir o curar la infección por este virus en *P. monodon* (Yodmuang et al., 2006; Tirasophon et al., 2007). Además, el ARN bicatenario o ARNi correspondiente con un gen del WSSV ha sido usado para suprimir la replicación viral (Westenberg et al., 2005; Xu et al., 2007; Sarathi et al., 2008; Attasart et al., 2009). Se ha demostrado la eficiencia de un ARNi para inhibir la replicación del PstDV1 en *L. vannamei* tanto de forma preventiva como terapéutica (Ho et al., 2011).

Por otro lado, un enfoque alternativo consiste en usar el ARNi correspondiente a un gen endógeno requerido para la entrada del virus. Una de tales dianas la constituye las vías de tráfico intracelular usadas durante la replicación viral. Se ha reportado la prevención de la infección por YHV en células linfoides primarias usando ARN bicatenario correspondiente a un receptor endógeno putativo del YHV (Assavalapsakul et al., 2006). El silenciamiento del gen endógeno Rab7 en *P. monodon*, el cual fue inicialmente identificado por codificar una de las proteínas de unión del WSSV (Sritunyalucksana et al., 2006), no solo muestra prevenir la replicación de WSSV sino también de YHV (Ongvarrasopone et al., 2008), LSNV (Virus Laent-Singh) (Ongvarrasopone et al., 2010) y TSV (Ongvarrasopone et al., 2011). Esto sugiere que PmRab7 funciona como un importante regulador del tráfico intracelular de varios tipos de virus.

La proteína Rab pertenece a la súper familia de las proteínas Ras, pequeñas ATPasas que actúan como interruptores entre los estados GTP-unión activado y GTP-unión inactivo. En mamíferos, Rab7 se expresa en el endosoma temprano y tardío y juega un rol esencial en el tráfico endocítico y en la degradación lisosomal (Feng et al., 1995; Vitelli et al., 1995; Seabra et al., 2002). De forma similar, Rab7 en camarones puede jugar un rol importante en los procesos de tráfico endosomal usado por diversos virus. El bloqueo de PmRab7 inhibe tanto la infección de virus con ADN, como WSSV, como virus con ARN (YHV, TSV, LSNV) (Ongvarrasopone et al., 2008; 2010; 2011). Aunque los enfoques terapéuticos basados en ARNi han mostrado ser prometedores para el control de enfermedades virales en camarones a nivel experimental, la aplicación de tales medidas a nivel de campo permanece aún como un reto (Dhar et al, 2014b).

Resulta importante destacar que hasta ahora no se ha desarrollado un método de administración de ARNi mediante el uso de VLPs. Estas partículas se han utilizado como una herramienta en el proceso para crear vacunas, tal es el caso de las partículas parecidas a virus (VLPs) y partículas subvéricas (SVPs), uno de los formatos de vacunas por

subunidades. La habilidad intrínseca de las proteínas estructurales para autoensamblarse en partículas (VLPs o SVPs) que se asemejan al virus nativo tanto en tamaño como en su absorción por parte del hospedador, ha llevado al desarrollo de una variada clase de vacunas por subunidades basadas en las VLPs (Garcea y Gissmann, 2004; Grgacic y Anderson, 2006; Chackerian, 2007). Las VLPs han sido expresadas en bacterias, levaduras, plantas transgénicas y cultivos celulares. Se han producido varias vacunas para humanos usando esta tecnología. Gardasil, de Merck, y Cervarix, de GSK, son dos de los tres medicamentos aprobados en la actualidad por la Federal Drug Administration (FDA) para el tratamiento terapéutico y profiláctico contra el cáncer (Dhar et al., 2014a). Recientemente, se han realizado esfuerzos para extender esta aproximación para la producción de vacunas para peces y mariscos (Shivappa et al., 2005; Hou et al., 2009). Con el fin de desarrollar una vacuna contra el IPNV, se produjeron VLPs usando vectores que expresan las dos proteínas de la cápside del IPNV, VP2 y VP3, tanto de forma separada como conjunta, en forma de poliproteína (Shivappa et al., 2005). Cuando son expresadas, estas proteínas de la cápside forman VLPs que son similares en forma y tamaño al virus nativo e inducen una fuerte respuesta inmune en el salmón (McKenna et al., 2001; Shivappa et al., 2005). En un trabajo más reciente se describe la producción de una vacuna IPN basada en la proteína VP2 del IPNV (Allnutt et al., 2007). En ese estudio, se logró la síntesis de una partícula más pequeña (22 nm) que el virus nativo (60 nm) pero que induce una fuerte respuesta inmune en trucha arco iris, por lo que se refieren a ellas como SVPs. Otras tres vacunas basadas en la proteína de la cápside VP2 del IPNV ya están disponibles actualmente en el mercado: IPNV (con licencia en Chile, Centrovét, Chile), Norvax (Intervet-Internacional BV, Holanda) y SRS/IPNV/Vibrio (con licencia en Canadá y Chile, Microtek Internacional Inc., Columbia Británica, Canadá) (Dhar et al., 2014a).

A pesar de todos estos antecedentes, ninguna vacuna basada en VLPs ha sido aplicada con éxito en crustáceos, debido en gran parte a que estos organismos carecen de un sistema inmune adaptativo, es decir no generan anticuerpos y por lo tanto la aproximación que se utiliza en el caso de los humanos o incluso de los peces, no es viable en este caso.

Existe por lo tanto una necesidad de nuevos productos combinados para el control de patógenos virales en la acuicultura de crustáceos. El objeto de la presente invención es proporcionar un producto combinado para el control de patógenos virales en la acuicultura de crustáceos.

35

Referencias

- Allnutt FC, Bowers RM, Rowe CG, Vakharia VN, LaPatra SE, Dhar AK. 2007. Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. *Vaccine* 25:4880–8.
- 5
- Assavalapsakul, W., Smith, D., Panyim, S. 2006. Identification and characterization of a *Penaeus monodon* lymphoid cell-expressed receptor for the yellow head virus. *Journal of virology* 80(1): 262-269.
- 10
- Attasart, P., Kaewkhaw, R., Chimwai, C., Kongphom, U., Namramoon, O., Panyim, S. 2009. Inhibition of white spot syndrome virus replication in *Penaeus monodon* by combined silencing of viral rr2 and shrimp PmRab7. *Virus Research* 145(1): 127-133.
- 15
- Attasart, P., Kaewkhaw, R., Chimwai, C., Kongphom, U., Panyim, S. 2011. Clearance of *Penaeus monodon* densovirus in naturally pre-infected shrimp by combined ns1 and vp dsRNAs. *Virus Res.* 159: 79-82.
- 20
- Chackerian B. 2007. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccin.* 6:381–90.
- Dhar, A., Manna , S., Allnutt, T. 2014a. Viral vaccines for farmed finfish . *Virus Dis.* 25(1):1–17 DOI 10.1007/s13337-013-0186-4
- 25
- Dhar, A. Robles-Sikisaka, R. Saksmerprome, V. Lakshman, D. 2014b. Biology, Genome Organization, and Evolution of Parvoviruses in Marine Shrimp. En: Maramorosch, K. Murphy, A. editores. *Advances in Virus Research*, Vol. 89, Burlington: Elsevier Academic Press, pp. 85-139. ISBN: 978-0-12-800172-1
- 30
- Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A. 1995. Rab7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *The Journal of Cell Biology* 131(6): 1435-1452.
- 35
- Fire, A., Xu., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S., Mello, C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669), 806-811.

- Frederick, A., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, K. Editors. 2003. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- 5 Garcea RL, Gissmann L. 2004. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotechnol.* 15:513–7.
- Grgacic EV, Anderson DA. 2006. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 40:60–5.
- 10 Ho, T., Yasri, P., Panyim, S., Udomkit, A. 2011. Double-stranded RNA confers both preventive and therapeutic effects against *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV) in *Litopenaeus vannamei*. *Virus Res.* 155: 131-136.
- Hou, L., Wu, H., Xu, L., Yang, F. 2009. Expression and self-assembly of virus-like particles of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Escherichia coli*. *Arch. Virol.* 154 (4): 547-553.
- 15 Itsathitphaisarn, O., Thitamadee, S., Weerachatanukul, W., Sritunyalucksana, K. 2017. Potential of RNAi applications to control viral diseases of farmed shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 147: 76–85.
- 20 Kim, W., Abele L. 1990. Molecular phylogeny of selected decapods crustaceans based on 18S rRNA nucleotide sequences. *J. Crust. Biol.* 10: 1-13.
- 25 Lightner, D. Editor. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge: World Aquaculture Society.
- Lu, Q., Weiner, M. Editors. 2001. Cloning and expression vectors for gene function analysis. Eaton Publishing.
- 30 McKenna BM, Fitzpatrick RM, Phenix KV, Todd D, Vaughan LM, Atkins GJ. 2001. Formation of infectious pancreatic necrosis virus like particles following expression of segment A by recombinant semliki forest virus. *Mar Biotechnol (NY)* 3:103–10.
- 35

- Ongvarrasopone, C., Chanasakulniyom, M., Sritunyalucksana, K., Panyim, S. 2008. Suppression of PmRab7 by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp. *Mar. Biotechnol.* 10(4): 374-381. [dx.doi.org/10.1007/s10126-007-9073-6](https://doi.org/10.1007/s10126-007-9073-6)
- 5 Ongvarrasopone, C., Chomchay, E., Panyim, S. 2010. Antiviral effect of PmRab7 knock-down on inhibition of Laem-Singh virus replication in black tiger shrimp. *Antiviral Research* 88(1): 116-118.
- Ongvarrasopone, C., Saejia, P., Chanasakulniyom, M., Panyim, S. 2011. Inhibition of Taura syndrome virus replication in *Litopenaeus vannamei* through silencing the LvRab7 gene using double-stranded RNA. *Arch. Virol.* 156: 1117-1123.
- 10 Saksmerprome, V., Charoonart, P., Gangnonngiw, W., Withyachumnarnkul, B. 2009. A novel and inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease. *J. Virol. Methods* 162: 213-217.
- 15 Saksmerprome, V., Thammasorn, T., Jitrakorn S., Wongtripop, S., Borwornpinyo, S., Withyachumnarnkul, B. 2013. Using double-stranded RNA for the control of Laem-Singh Virus (LSNV) in Thai *P. monodon*. *J. Biotechnology* 164: 449-453
- 20 Sarathi, M., Simon, M., Ahmed, V., Kumar, S., Hameed, A. 2008. Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Mar Biotechnol (NY)* 10:198-206.
- 25 Seabra, M., Mules, E., Hume, A. 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends in Molecular Medicine* 8(1): 23-30.
- Shivappa RB, McAllister PE, Edwards GH, Santi N, Evensen O, Vakharia VN. 2005. Development of a subunit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus using a baculovirus insect/larvae system. *Dev Biol (Basel)* 121:165–74.
- 30 Sritunyalucksana, K., Wannapapho, W., Lo, C., Flegel, T. 2006. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *Journal of virology* 80(21): 10734-10742.

Tang, K., Lightner, D., 2002. Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis. Aquat. Org.* 49, 93–97.

5 Tirasophon, W., Roshorm, Y., Panyim, S. 2005. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 102-107.

Tirasophon, W., Yodmuang, S., Chinnirunvong, W., Plongthongkum, N., Panyim, S. 2007. Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease
10 dsRNA. *Antiviral Research* 74(2): 150-155.

Vitelli, R., Chiariello, M., Bruni, C., Bucci, C. 1995. Cloning and expression analysis of the murine Rab7 cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1264:268-270.

15 Westenberg, M., Heinhuis, B., Zuidema, D., Vlak, J. 2005. siRNA injection induces sequence independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus (WSSV). *Virus Res* 114: 133–139.

Xu, J., Han, F., Zhang, X. 2007. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes
20 by siRNA. *Antiviral Res* 73: 126–131.

Yodmuang, S., Tirasophon, W., Roshorm, Y., Chinnirunvong, W., Panyim, S. 2006. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochemical and biophysical research communications* 341(2): 351-356.

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Ilustración del ARN bicatenario de interferencia (LvRab7 545 pb, MjRab7 393 pb) y del mecanismo de silenciamiento de la expresión genética a través de ARN de
30 interferencia.

Figura 2: Ilustración de la producción de ARN bicatenario Rab7 encapsulado dentro de la VLP del PstDV1, formada por 60 sub-unidades proteicas de 37 kDa.

Figura 3: Ilustración del producto combinado. Administración del ARNi bicatenario LvRab7 y/o MjRab7 encapsidado para su protección por medio de las VLPs del PstDV1 hasta el interior de la célula.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se dirige a un producto combinado que comprende: (i) ARN de interferencia que inhibe la expresión del gen Rab7 en un crustáceo, y (ii) partículas parecidas a virus (VLPs) que comprenden proteínas recombinantes de la cápside del PstDV1.

Es también un objeto de la presente invención el uso del producto combinado para el control de patógenos virales en la acuicultura de crustáceos.

15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Definiciones

El término “*producto combinado*” se puede referir a (i) un producto que comprende dos o más componentes que están físicamente, químicamente, o de cualquier otra forma combinados o mezclados para producir una única entidad, (ii) dos o más productos separados y empaquetados en un único estuche o vendido como una unidad donde cada producto comprende uno de los componentes, o (iii) producto que se vende por separado que comprende uno de los componentes que, de acuerdo con el plan de investigación o el etiquetado propuesto, está destinado a ser usado con otro producto que comprende el otro componente.

El término “*inhibir la expresión*” se refiere a cualquier método que disminuye la cantidad total de la proteína Rab7. La disminución puede ocurrir, por ejemplo, mediante la inhibición de la transcripción del gen que codifica Rab7 y/o la inhibición de la traducción del ARN mensajero que codifica Rab7.

En el contexto de la presente invención, “*ARN de interferencia (ARNi)*” se entiende como una molécula de ARN que suprime la expresión de genes específicos mediante mecanismos conocidos globalmente como ribointerferencia o interferencia por ARN.

35

El término “*Rab7*” se refiere a cualquier proteína que es homóloga y/o tiene una función similar a LvRab7 (GenBank: ACT65737.1) y que se puede encontrar en crustáceos. En una realización preferida, Rab7 es LvRab7 o MjRab7.

- 5 Una “*proteína recombinante*” es una proteína que ha sido producida en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico que codifica la proteína.

10 El término “*crustáceo*” se refiere a un extenso subfilo de artrópodos, con más de 67.000 especies. Incluyen varios grupos de animales, como las langostas, los camarones, los cangrejos, los langostinos y los percebes. Los crustáceos son fundamentalmente acuáticos y habitan en todas las profundidades y en distintos medios, como el mar, el agua salobre y el agua dulce. Unos pocos han colonizado el medio terrestre, como la cochinilla de la humedad (isópodos).

15

El término “*control de patógenos virales*” se refiere a cualquier método que disminuya la cantidad de crustáceos infectados por un virus en una población o que disminuya el número de crustáceos que muestran síntomas causados por una infección viral. El método puede ser profiláctico y/o terapéutico.

20

En el contexto de la presente invención, la “*acuicultura*” se entiende como un conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de crianza de especies acuáticas.

25 En el contexto de la presente invención, el término “*oligonucleótido antisentido de ARN*” se refiere a una cadena simple de ARN que es complementaria a una secuencia específica.

Producto combinado

30 La invención se apoya en la mezcla sinérgica de dos fenómenos diferentes. El primero versa sobre el auto ensamblaje de la proteína recombinante de la cápside del PstDV1 en partículas parecidas al virus (VLPs) que pueden encapsidar ARN o ADN de 0,5 kb, lo que las convierte en un vehículo potencial para la administración de ARN de interferencia (ARNi) u otras nanopartículas de interés farmacológico. El segundo se basa en el silenciamiento del gen endógeno Rab7, el cual muestra no solo prevenir la replicación de WSSV sino también de YHV, LSNV y TSV. Esto sugiere que Rab7 funciona como un importante gen regulador del tráfico intracelular de varios tipos de virus. El bloqueo de LvRab7 inhibe tanto la infección de virus con ADN, como el WSSV, como virus con ARN (YHV, TSV, LSNV). Aunque los

35

enfoques terapéuticos basados en ARN de interferencia (ARNi) han mostrado ser prometedores para el control de varios tipos de virus a nivel experimental, la aplicación de tales medidas a nivel de campo permanece aún como un reto. Para que estas estrategias sean viables a nivel de campo se debe desarrollar un método de administración oral, ya que administrar el ARNi vía inyección no es viable para su aplicación en el campo de cultivo; y es precisamente la incorporación de las VLPs lo que viene a superar este escollo. Con la invención se establece un producto combinado viable a nivel de campo que permitirá facilitar el control de enfermedades virales en acuicultura.

Debido a la forma de administración, vía VLPs (virus like particles o partículas similares a virus) del PstDV1 (Penstyldensovirus de Decápodo 1), se logra proteger de degradación al ARNi al tiempo que se hace viable la administración en grandes extensiones y a millones de individuos, bien sea a través del agua, por baño estacionario, y/o por mezcla con el alimento. Hasta ahora el único método de administración de ARNi implementado es vía inyección, lo que resulta totalmente inviable cuando se trabaja con millones de individuos. Debido al ARNi administrado, se logra una protección tanto profiláctica como terapéutica.

Otra ventaja la representa el tipo específico de ARNi encapsidado, el cual silencia la expresión de la proteína endógena Rab7 en el camarón, lo cual a su vez genera la inhibición de la replicación de varios tipos de virus de crustáceos (virus tanto con ARN como ADN como material genético).

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un producto combinado que comprende: (i) ARN de interferencia que inhibe la expresión del gen Rab7 en un crustáceo, y (ii) partículas parecidas a virus que comprenden proteína recombinante de la cápside del PstDV1.

En una realización preferida, el producto combinado comprende: (i) ARN de interferencia que inhibe la expresión del gen Rab7 en un crustáceo, y (ii) partículas parecidas a virus constituidas por la proteína recombinante de la cápside del PstDV1.

En una realización preferida, el crustáceo es un camarón. Preferiblemente, el camarón se selecciona del grupo que consiste en *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, *Penaeus monodon*, *Litopenaeus stylirostris*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Fenneropenaeus indicus* y *Fenneropenaeus merguensis*. Más preferible, el camarón es de la especie

Litopenaeus vannamei, *Marsupenaeus japonicus* o *Penaeus monodon*. Aún más preferible, el camarón es de la especie *Litopenaeus vannamei* o *Marsupenaeus japonicus*.

5 La proteína recombinante de la cápside del PstDV1 es una proteína que constituye la cápside del PstDV1 y que se auto ensambla para formar partículas parecidas a virus o VLPs. En una realización preferida la proteína recombinante de cápside del PstDV1 comprende la secuencia SEQ ID NO. 1 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la secuencia SEQ ID NO. 1, tal y como un 75%, 80%, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO. 1.

10

SEQ ID NO. 1 se corresponde con la siguiente secuencia (GenBank: AIY34706.1):

MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSMHITFQTRRYFEFDA
ANDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQRYKMKVKSMMKTYGWKVHKAGVV
15 MHSMVPLMKDLKVS GGTSFETLTFTDTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLV
TVQSTAANYEDPIQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRNWWYGGEIPTTGPTFIPKWGGQLK
WDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPPQG
CVASLGMLQYLHKPCTGQLNKCYIMHTN

20 La proteína recombinante de la cápside del PstDV1 se puede clonar en diversos vectores de expresión en bacterias, tal y como pET28, pQE30, pcADN3.1, pCI, pQE, pET161, entre otros (Lu y Weiner, 2001; Frederick et al., 2003).

En una realización preferida, el ARN de interferencia es un ARNi bicatenario. Un ARNi
25 bicatenario comprende una cadena sentido y otra cadena anti-sentido que es complementaria. Preferiblemente, el ARN de interferencia bicatenario comprende la secuencia SEQ ID NO. 2 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la secuencia SEQ ID NO. 2, tal y como un 75%, 80%, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO. 2, y el oligonucleótido antisentido de ARN.

30

SEQ ID NO. 2 se corresponde con la siguiente secuencia (GenBank: FJ811529.1):

ATGGCATCTCGCAAGAAGATTCTCCTGAAGGTGATCATCCTTGGAGACTCAGGTGTAGG
CAAACATCCCTTATGAACCAGTTTGTAAACAAGAAATTCAGCAACCAGTATAAGGCAAC
35 CATTGGAGCAGATTTCTCACAAAGGAGGTCATGGTTGATGACAGATTGGTTACAATGC
AGATCTGGGATACAGCTGGTCAAGAAAGATTTCAATCGTTAGGTGTTGCATTCTATCGA

GGAGCTGATTGTTGTGTTCTCGTCTATGATGTTACATCTCCCAATACCTTCAAGTCTCTC
 GATTCATGGCGTGACGAGTTTCTAATTCAAGCCTCACCAAGGGACCCTGACCACTTCCC
 ATTTGTTGTCCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGGTATCGACGAAGCGAG
 CACAACAATGGTGTATAGTAAAAATGAAGTTCCTACTTTGAAACTAGTGCAAAGGAAG
 5 CTATTAATGTGGAGCTAGCTTTCCAGACCATTGCTCGCAATGCTCTTGCTCAGGAGTCA
 GAGGTGGAGCTGTACAATGAGTTTCCAGACCAGATCAAATTGACCAATGACAACAAGGC
 TAAACAGGATGCATGCTCTTGCTAA

En una realización preferida alternativa, el ARN de interferencia es un ARNi bicatenario. Un
 10 ARNi bicatenario comprende una cadena sentido y otra cadena anti-sentido que es
 complementaria. Preferiblemente, el ARN de interferencia bicatenario comprende la
 secuencia SEQ ID NO. 3 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la
 secuencia SEQ ID NO. 3, tal y como un 75%, 80%, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%,
 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO. 3, y el oligonucleótido antisentido de ARN.

15

SEQ ID NO. 3 se corresponde con la siguiente secuencia (GenBank: AB379643.1):

ATGGCATCACGCAAGAAGATTCTCCTGAAGGTCATCATCCTAGGAGACTCTGGTGTAGG
 CAAAGCATCCCTCATGAACCAGTTTGTCAACAAGAAATTCAGCAACCAATACAAGGCAA
 20 CCATTGGGGCAGACTTCCTCACAAAGGAGGTCATGGTTGATGACAGATTGGTCACAATG
 CAGATCTGGGATACAGCTGGTCAAGAGAGATTCCAGTCATTAGGTGTTGCATTTTATCG
 CGGAGCTGATTGTTGTGTTCTTGTCTATGATGTTACATCTCCCAACACCTTCAAGTCTCT
 TGATTCTTGGCGCGACGAGTTCCTAATTCAAGCCTCACCAAGGGACCCCGATCACTTCC
 CATTGTTGTCCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGGTATCGACGAAGCGA
 25 GCACAACAGTGGTGTATAGTAAAAATGAAGTTCCTACTTTGAAACTAGTGCGAAGGA
 GGCCATTAACGTGGAGCTAGCCTTCCAGACCATTGCTCGCAATGCACTTGCTCAGGAGT
 CTGAGGTGGAGCTCTACAATGAGTTTCCAGACCAGATCAAATTGACCAATGACAACAAG
 GCCAAACAGGATGCGTGCTCTTGCTAA

30 En una realización preferida, el ARNi se vende aparte con instrucciones de cómo combinarlo
 con las partículas parecidas al virus y las partículas parecidas al virus se venden aparte con
 instrucciones de cómo combinarlo con el ARNi. En una realización alternativa, las partículas
 parecidas al virus comprenden el ARNi. Preferiblemente, el ARNi está encapsulado en las
 partículas parecidas al virus. El procedimiento de encapsulación de ARNi está descrito en el
 35 Ejemplo 3.

En una realización preferida, el ARNi bicatenario LvRab7 (SEQ ID NO. 2) se vende aparte con instrucciones de cómo combinarlo con las partículas parecidas al virus PstDV1 y las partículas parecidas al virus PstDV1 se venden aparte con instrucciones de cómo combinarlo con el ARNi bicatenario LvRab7. En una realización alternativa, las partículas
5 parecidas al virus PstDV1 comprenden el ARNi bicatenario LvRab7. Preferiblemente, el ARNi bicatenario LvRab7 está encapsulado en las partículas parecidas al virus PstDV1. El procedimiento de encapsidación de ARN está descrito en el Ejemplo 3.

En una realización preferida, el ARNi bicatenario MjRab7 (SEQ ID NO. 3) se vende aparte
10 con instrucciones de cómo combinarlo con las partículas parecidas al virus PstDV1 y las partículas parecidas al virus PstDV1 se venden aparte con instrucciones de cómo combinarlo con el ARNi bicatenario MjRab7. En una realización alternativa, las partículas parecidas al virus PstDV1 comprenden el ARNi bicatenario MjRab7. Preferiblemente, el ARNi bicatenario MjRab7 está encapsulado en las partículas parecidas al virus PstDV1. El
15 procedimiento de encapsidación de ARN está descrito en el Ejemplo 3.

Uso para el control de patógenos virales

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso del producto combinado para el control de patógenos virales en la acuicultura de crustáceos.
20

En una realización preferida, el crustáceo es un camarón. Preferiblemente, el camarón se selecciona del grupo que consiste en *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, *Penaeus monodon*, *Litopenaeus stylirostris*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Fenneropenaeus indicus* y *Fenneropenaeus merguensis*. Más específicamente, el camarón es de la especie
25 *L. vannamei*, *M. japonicus* o *P. monodon*.

Hasta ahora, el ARN de interferencia bicatenario era administrado vía inyección, lo que es inviable a nivel de campo debido a que en la industria del cultivo de estos crustáceos se trabaja en grandes extensiones y con miles de millones de individuos. Por lo tanto, en una
30 realización preferida el producto combinado de la presente invención se administra vía oral. Preferiblemente, la administración del producto es a través del agua, por baño estacionario, y/o por mezcla con el alimento.

En una realización preferida, el producto combinado de la presente invención se administra
35 a través del agua, por baño estacionario, y/o por mezcla con el alimento. En una realización

preferida, el producto combinado de la presente invención no se administra al crustáceo mediante una inyección.

- 5 En una realización preferida, el patógeno viral se selecciona de una lista que consiste en WSSV (white spot syndrome virus o virus del síndrome de la mancha blanca), YHV (yellowhead virus o virus de la cabeza amarilla), TSV (Taura syndrome virus o virus del síndrome del Taura), PstDV1 (Decapod Penstyldensovirus 1 o Penstyldensovirus de Decápodo 1) e IMNV (Infectious myonecrosis virus o virus de la mionecrosis infecciosa).
- 10 En una realización preferida, el uso es profiláctico. Por ejemplo, el producto combinado se administra para evitar que una población de crustáceos sea infectada por un patógeno viral. En otra realización preferida, el uso es terapéutico. Por ejemplo, el producto combinado se administra a una población de crustáceos que exhibe síndromes relacionados con una infección viral y/o se administra a una población de crustáceos que ha sido infectada por un
- 15 patógeno viral.

EjemplosEjemplo 1: Síntesis del ARNi bicatenario LvRab7 y MjRab7

1.1) Purificación de ARN total.

Se aísla ARN proveniente del tejido hepatopancreático siguiendo las indicaciones del estuche comercial NucleoSpin RNA® (Macherey-Nagel). El tejido (≈ 20 mg) es homogenizado con la ayuda de un homogeneizador dispersor de tejidos (VWR VDI12) con 350 µL de buffer RA1 y 3.5 µL de beta-mercaptoetanol, agitando en el vortex vigorosamente. Para reducir la viscosidad y limpiar el lisado, se hace pasar a través de un filtro y se centrifuga por 1 min a 11.000 x g. Una vez descartado el filtro, se añaden 350 µL de etanol al 70% para homogeneizar el lisado mediante mezcla con la pipeta. Para capturar el ARN, cada muestra se coloca en una columna de afinidad para aislamiento de ARN y se centrifuga por 30 s a 11.000 x g. Posteriormente la columna se transfiere a un tubo de 2 mL nuevo y se añaden 350 µL de tampón desalinizador de membrana para posteriormente centrifugar por 1 min a 11.000 x g. Para digerir posibles restos de ADN, se utilizan 95 µL de una mezcla de reacción de ADNasas (10 µL de la rADNasa y 90 µL de tampón de reacción para rADNasas) aplicándolos directamente en el centro de la membrana de silicato de la columna y se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. El primer lavado de la membrana se realiza añadiendo 200 µL de tampón RAW2 en la columna, centrifugando por 30 s. a 11.000 x g, lo que permite la inactivación de las ADNasas. Una vez transferida la columna a un tubo nuevo (2 mL) se realiza un segundo lavado añadiendo 600 µL de tampón RA3 y centrifugando durante 30 s a 11.000 x g. Para el tercer lavado, la columna se transfiere a un tubo nuevo y se añaden 250 µL de tampón RA3, se centrifuga durante 2 min a 11.000 x g para secar la membrana completamente. A continuación, se transfiere la columna a un tubo libre de nucleasas (1,5 mL) y se eluye el ARN con 60 µL de agua libre de nucleasas mediante centrifugación a 11.000 g durante 1 min.

A fin de verificar la calidad de ARN aislado, se siguen las indicaciones del estuche comercial Agilent RNA 6000 Nano®. Para ello se prepara el gel mediante la adición de 550 µL de la matriz de gel de ARN dentro del filtro, se centrifuga a 1.500 x g por 10 min a temperatura ambiente y se separa en alícuotas de 65 µL del gel filtrado en tubos de micro centrifuga libres de ARNasas de 0,5 mL. Para preparar la mezcla de gel teñido, se permite que el concentrado de ARN teñido se equilibre a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se aplica vortex al concentrado por 10 s, se centrifuga brevemente y se añade 1 µL del colorante en las alícuotas de 65 µL del gel filtrado. Se agita la solución en el vortex y se centrifuga a 13.000 x g por 10 min a temperatura ambiente. Se utiliza un chip nuevo de ARN para cargar la mezcla de gel teñido, colocando 9 µL de la mezcla en los pozos marcados.

Una vez asegurada la correcta posición del inyector, en 1 mL, se cierra el chip mediante compresión. Luego se presiona el inyector hasta que se sostenga por el clip, para posteriormente liberarlo luego de 60 s exactamente. Se espera durante 5 s, y lentamente se sube el émbolo del inyector hasta la posición de 1 mL. Luego se abre la estación de compresión del chip y se añaden 9 µL de la mezcla de gel teñido en los pozos marcados. Adicionalmente se cargan en el chip (en las 12 muestras como en el lugar indicado para ello), 5 µL de marcador de ARN. Para cargar las muestras y los marcadores se añade 1 µL del marcador en el pozo marcado, 1 µL de muestra en los pozos para tal fin y 1 µL del marcador de ARN en cada pozo sin usar. Antes de realizar el análisis con el programa Agilent 2100 Bioanalyzer, el chip es colocado horizontalmente en un vortex IKA, el cual es agitado durante 1 min a 2.400 rpm.

1.2) Síntesis de ADN complementario mediante RT-PCR.

Para realizar este procedimiento se siguen las indicaciones del estuche comercial qScript® (Quanta BioSciences). El protocolo de reacción utilizado es el siguiente: 1 µL del ARN aislado (1-10 µg de ARN total), 14 µL de agua libre de nucleasas, 4 µL de la mezcla de reacción qScript (5X) y 1 µL de la retrotranscriptasa qScript, para un volumen final de 20 µL. Se mezcla suavemente en el vortex y luego se centrifuga durante 10 s. Posteriormente se colocan en un termociclador bajo el siguiente programa, 1 ciclo a 22 °C por 5 min, 1 ciclo a 42 °C durante 30 min, un ciclo a 85 °C por 5 min, con una parada a 4 °C. Luego de completar la síntesis de ADNc, se diluye con 180 µL de 10 mM Tris.HCl y 0,1 mM EDTA, pH 8. Se usan 20 µL de la reacción para la amplificación mediante PCR.

1.3) Amplificación mediante PCR.

Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del estuche comercial para PCR con la polimerasa Q5®, High-Fidelity DNA Polymerase (M0491, NEB), atendiendo al siguiente protocolo: 4 µL del tampón de reacción Q5 (5X), 0,4 µL de los dNTPs (10 µM), 1 µL del cebador sentido (10 µM) LvRab7-F (SEQ ID NO. 4) 5'-ATG GCA TCT CGC AAG AAG AT-3', 1 µL del cebador antisentido (10 µM) LvRab7-R (SEQ ID NO. 5) 5'-AGC TCC ACC TCT GAC TCC TG-3', 1 µL del ADNc (5 ng/µL), 0,2 µL de la ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 y 12,4 µL de agua libre de nucleasas, todo para un volumen de reacción final de 20 µL. En el caso de MjRab7 se procede de la misma forma, pero se utilizan los siguientes cebadores: MjRab7-F (SEQ ID NO. 6) 5'-GGA TAC AGC TGG TCA AGA GAG ATT-3' y MjRab7-R (SEQ ID NO. 7) 5'-GGT CAA TTT GAT CTG GTC TGG AA-3'. El programa de termociclado utilizado es el siguiente: desnaturalización inicial a 98 °C por 5 min, seguido de 25 ciclos a 98 °C por 2 min, 98 °C por 15 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 15 s y con ciclo final de

extensión a 72 °C durante 2 min. El producto amplificado (545 pb para LvRab7 y 393 pb para MjRab7) es verificado a través de un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (4 µL), el cual se corre durante 1 h a 90 V en una cubeta de electroforesis sumergida horizontal.

5 1.4) Limpieza del producto de PCR.

Para este procedimiento se siguen las indicaciones del estuche comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), para ello se utiliza el siguiente protocolo: A fin de ajustar las condiciones de unión se mezcla 1 volumen de la muestra con 2 volúmenes de tampón NTI. Luego se colocan 700 µL en la columna provista en el estuche (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column), se centrifuga a 11.000 x g durante 30 s y se descarta el fluido resultante. Para lavar la membrana de sílice se añaden 700 µL del tampón NT3, se centrifuga por 30 s a 11.000 x g y se descarta nuevamente el fluido resultante. Este proceso se llevó a cabo por duplicado. Para secar la membrana se centrifuga durante 1 min a 11.000 x g a fin de eliminar restos del tampón NT3. Para eluir el ADN, se coloca la columna en un nuevo tubo y se añaden 30 µL del tampón de elución, se incuba por 1 min a temperatura ambiente y luego se centrifuga por 1 min a 11.000 x g.

1.5) Clonación.

1.5.1) Ligación.

20 Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del estuche comercial CloneJET PCR Cloning® (Thermo Scientific) y de acuerdo al siguiente protocolo: 5 µL del tampón de reacción, 0,5 µL del producto amplificado por PCR, 0,5 µL del vector pJET, 3,5 µL de agua libre de nucleasas y 0,5 µL de la ligasa T4, volumen final de la reacción de 10 µL.

25

1.5.2) Transformación.

Para ello se vierten 5 µL de la ligación en 50 µL de las bacterias congeladas (células competentes Top10), se mezcla con cuidado y se incuba durante 20 min en hielo para después realizar un choque térmico a 42 °C durante 45 s, luego de lo cual se enfría rápidamente en hielo. Luego se realiza el sembrado de 10 µL y 45 µL de la mezcla anterior respectivamente en placas con medio sólido Luria Bertani al 1,5 % (p/v) de agar y ampicilina como antibiótico de selección y se incuba a 37 °C durante toda la noche.

1.6) Purificación del plásmido.

35 Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del estuche comercial Plasmid DNA Purification, siguiendo el protocolo NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid). Para ello

se usan 5 mL de un cultivo saturado de *E. coli* en medio líquido LB el cual es centrifugado por 30 s a 11.000 x g a fin de descartar el fluido resultante y remover la mayor cantidad de líquido posible. Para la lisis celular se añaden 250 µL del tampón A1 y se resuspende en el vortex asegurándose de que no haya restos sólidos. Luego se añaden 250 µL del tampón 2, se mezcla por inversión (6-8 veces) y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se añaden 300 µL del tampón 3 y se mezcla por inversión (6-8 veces). El lisado es centrifugado durante 10 min a 11.000 x g a temperatura ambiente. Para la captura del ADN, se coloca una columna NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid) en un tubo de 2 mL y se decanta el lisado mediante centrifugación a 11.000 x g por 1 min, se descarta el fluido y la columna es trasladada a un tubo nuevo. Para el lavado de la membrana de sílice, se añaden 500 µL de tampón AW, precalentado a 50 °C y se centrifuga por 1 min a 11.000 x g. Posteriormente se añaden 600 µL del tampón A4, se centrifuga por 1 min a 11.000 x g, se descarta el sobrenadante y se coloca la columna en un nuevo tubo. Para secar la membrana se centrifuga durante 2 min a 11.000 x g y se descarta el tubo. Para eluir el ADN se coloca la columna en un tubo de micro-centrifuga de 1,5 mL y se añaden 45 µL de tampón AE, se incuba durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifuga por 2 min a 11.000 x g.

1.7) Transformación.

Una vez verificado mediante secuenciación, se procede a realizar una transformación con el inserto en sentido forward y reverse (sense y antisense), procediendo de la misma forma descrita anteriormente, con la salvedad de que la concentración del plásmido utilizada es de 1 ng/µL. Posteriormente se cultivan las bacterias (50 mL) en medio LB suplementado con ampicilina (50 µL, 100 µg/mL) durante toda la noche a 37 °C y con agitación (200 rpm).

1.8) Purificación del plásmido.

Para realizar este procedimiento se siguen las indicaciones del estuche comercial GeneJET Plasmid Midipreps Kit (Thermo Scientific) y aplicando el siguiente protocolo (durante este paso, todas las centrifugaciones con un rotor basculante): Una vez el cultivo alcanza una OD₆₀₀, se cultivan las bacterias (50 mL) mediante centrifugación a 5.000 x g durante 20 min y se descarta el sobrenadante. El pellet se resuspende en 2 mL de solución de resuspensión, siendo cuidadoso de no dejar ninguna partícula sólida y sin disgregar, esto haciendo uso de un vórtex y una pipeta. Luego se añaden 2 mL de solución de lisis y se mezcla gentilmente mediante inversión de los tubos de 4 a 6 veces hasta que la solución toma una apariencia más viscosa y clara y se incuba durante exactamente 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 2 mL de solución neutralizadora y se mezcla mediante inversión de 5 a 8 veces. Después se añaden 0,5 mL de reactivo de unión

endotoxina, se mezcla cuidadosamente mediante inversión de 5 a 8 veces y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se añaden 3 mL de etanol al 96% y se mezcla por inversión de 5 a 6 veces y se procede a centrifugar durante 40 min a 5.000 x g con el fin de compactar los restos celulares y el ADN bacteriano cromosomal. Luego se trasfiere el sobrenadante a un tubo de 15 mL siendo cuidadoso de no transferir la fase sólida y los restos blancos precipitados y flotantes, se añaden 3 mL de etanol al 96% y se mezcla mediante inversión de 5 a 6 veces. Luego se transfiere parte del volumen (5 mL) a una columna ya pre-ensamblada en un tubo de 15 mL y se centrifuga durante 3 min a 2.000 x g, se descarta el fluido y se coloca la columna en el mismo tubo. Este procedimiento se repite nuevamente hasta hacer pasar todo el lisado obtenido a través de la columna de purificación. Luego se añaden 4 mL de la solución de lavado 1 (diluido con isopropanol, 30 mL) en la columna, se centrifuga por 2 min a 3.000 x g, se descarta el fluido y se vuelve a colocar la columna en el mismo tubo. Posteriormente se añaden 4 mL de la solución de lavado 2 (diluida con etanol al 100%, 150 mL) en la columna de purificación, se centrifuga por 2 min a 3.000 x g, se descarta el fluido y se coloca la columna en el mismo tubo. Este lavado con la solución 2 se hace por duplicado. Luego se centrifuga durante 5 min a 3.000 x g para eliminar residuos de la solución de lavado y se descarta el tubo con el filtrado. Luego se transfiere la columna a un nuevo tubo de 15 mL y se añaden 0,25 mL de tampón de elución directamente en el centro de la membrana de la columna, se incuba durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifuga por 5 min a 3.000 x g para eluir el ADN plasmídico. Para aumentar el nivel de ADN recuperado, se añaden otros 0,25 mL de la solución de elución y se repite el procedimiento. Por último, se descarta la columna y el ADN plasmídico purificado es guardado a -20 °C. Una vez purificado el ADN plasmídico, se procede a cuantificar su concentración, mediante espectrofotometría UV a 260/280 nm.

25

1.9) Linealización del plásmido mediante digestión con enzima de restricción.

Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del estuche comercial *Xba*I (Thermo Scientific), según el siguiente protocolo: 10 µg del ADN plasmídico, 10 µL del tampón de reacción (1x Tango Buffer, 33 mM Tris-acetato, pH 7,9, 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato potásico, 0,1 mg/mL BSA), 4 µL de la enzima de restricción *Xba*I (10 U/µL) y completar con agua hasta alcanzar 100 µL de volumen total de reacción. Se mezcla gentilmente, se centrifuga a baja velocidad por unos segundos y se incuba a 37 °C durante 4 h. A las 3 horas de transcurrida la incubación, se extrae una alícuota de 5 µL de la mezcla de reacción y se procede a realizar un análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (110 V, 400 mA, 1 h) con el fin de verificar el correcto corte, es decir, la presencia de una banda esperada de alrededor de 3.400 pb (la longitud del plásmido

35

pJET1.2/Blunt es de 2,974 pb, más el inserto de 545 pb en el caso de LvRab7 o de 393 pb en el caso de MjRab7) y la ausencia de cortes inespecíficos (presencia de otras bandas de diferente tamaño al esperado).

5 1.10) Limpieza de los plásmidos antes de la transcripción *in vitro*.

Para este procedimiento se siguen las indicaciones del estuche comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y de acuerdo al siguiente protocolo. A fin de ajustar las condiciones de unión se mezcla 1 volumen de la muestra con 2 volúmenes de tampón NTI. Luego se colocan 700 µL en la columna provista en el estuche (NucleoSpin Gel and
10 PCR Clean-up Column), se centrifuga a 11.000 x g durante 30 s y se descarta el fluido. Para lavar la membrana de gel de sílice se añaden 700 µL del tampón NT3, se centrifuga por 30 s a 11.000 x g y se descarta nuevamente el fluido. Este proceso se lleva a cabo por duplicado. Para secar la membrana se centrifuga durante 1 min a 11.000 x g a fin de eliminar restos del tampón NT3. Para eluir el ADN, se coloca la columna en un nuevo tubo y se añaden 30 µL
15 del tampón de elución, se incuba por 1 min a temperatura ambiente y luego se centrifuga por 1 min a 11.000 x g.

1.11) Transcripción *in vitro*.

Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del estuche comercial
20 MEGAscript® (Ambion, Life technologies) y de acuerdo al siguiente protocolo: Toda la reacción de transcripción es llevada a cabo a temperatura ambiente y con un volumen final de 20 µL, se añaden 2 µL de la solución de ATP, 2 µL de CTP, 2 µL de GTP, 2 µL de UTP, 2 µL del tampón de reacción 10x, 1 µg de ADN, 2 µL de la mezcla enzimática y agua hasta completar el volumen final. Se mezcla con la pipeta, se centrifuga brevemente y se incuba
25 durante 16 h a 37 °C. Posteriormente se añaden 1 µL de TURBO ADNasa a fin de eliminar los restos de ADN, para ello se mezcla bien y se incuba durante 15 min a 37 °C.

Para recuperar el ARN se utiliza el método de precipitación con cloruro de litio, para ello se añaden 30 µL de agua libre de nucleasas y 30 µL de la solución de cloruro de litio (7.5 M
30 LiCl, 50 mM EDTA). Se mezcla y se enfría durante 30 min a -20 °C. Luego se centrifuga a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C. Se elimina cuidadosamente el sobrenadante, para lavar el pellet se añade 1 mL de etanol al 70% y se centrifuga nuevamente. Se descarta de nuevo el sobrenadante y se resuspende en 20 µL de tampón TE (pH 8,0). Se determina la concentración mediante espectrofotometría y finalmente se almacena a -20 °C.

35

1.12) Hibridación del ARNi en estructura bicatenaria.

Luego de la transcripción *in vitro*, el ARN sintetizado (sense y antisense, respectivamente) es calentado para producir ARNi bicatenario, esto mediante incubación de la mezcla a 70 °C por 15 min y reduciendo la temperatura gradualmente hasta alcanzar los 22 °C. La concentración final del ARN bicatenario-LvRab7 y/o MjRab7 es determinado mediante espectrofotometría a 260 nm. Para verificar la correcta hibridación del ARN doble banda se digiere con ARNasa A (que solo degrada ARN de cadena simple en presencia de una concentración de NaCl igual o superior a 0,2 M). Para ello, se incuba durante 15 min y a 37 °C, 0,5 µL del ARN sintetizado (simple y doble banda), tampón TE (pH 8.0) y 0,1 µL de ARNasa A (10 mg/mL; dilución 1/100) y 9,4 µL de solución de NaCl (0,3 M), para un volumen total de reacción de 10 µL.

Ejemplo 2: Síntesis de las VLPs del virus PstDV1

2.1) Aislamiento de ADN viral.

Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del estuche comercial Quick-DNA Universal Kit (Zymo Research). Para ello se sigue el protocolo destinado a muestras de tejido sólidas de la siguiente forma: aproximadamente 25 mg de la muestra de hemolinfa (*L. vannahmei*) se colocan en un tubo de microcentrifuga y se le añaden 95 µL de agua libre de nucleasas, 95 µL de tampón para tejidos sólidos y 10 µL de proteinasa K. Se mezcla vigorosamente y se incuba durante 1 h a 55 °C hasta que todo el tejido este completamente solubilizado. Para eliminar cualquier rastro de tejido sin solubilizar se procede a centrifugar a 12.000 x g por 1 min y se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio. Posteriormente se añaden 2 volúmenes del tampón de unión genómico al sobrenadante y se mezcla vigorosamente. Luego se transfiere la mezcla a una columna Zymo-Spin IIC-XL colocada dentro de un tubo recolector, se centrifuga durante 1 min a 12.000 x g y se descarta el tubo con el fluido. La columna se transfiere a un tubo colector nuevo y se le añaden 400 µL de tampón de pre-lavado de ADN, se centrifuga por 1 min y se descarta el fluido. Posteriormente se añaden 700 µL de tampón de lavado de ADN-g, se centrifuga durante 1 min y se descarta el fluido. Se repite el proceso anterior, esta vez con 200 µL de tampón de lavado de ADN-g y se descarta el tubo colector con el fluido resultante. Para eluir el ADN, se transfiere la columna a un tubo de microcentrifuga nuevo y se añaden 50 µL del tampón de elución de ADN, se incuba durante 5 min y luego se centrifuga durante 1 min. El resultado es visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, corrido durante 45 min a 90 V, teñido con GelRed y haciendo uso del marcador de peso molecular de 1 kb.

2.2) Amplificación mediante PCR.

Para este procedimiento se siguen las indicaciones del estuche comercial OneTaq® DNA Polymerase (New England Biolabs). Las condiciones de la reacción son las siguientes: 5X OneTaq Standar Buffer 10 µL, 10 mM dNTPs 1 µL, 10 µM CI PstDV1 F (SEQ ID NO. 8): 5'-GGC ATA TGT GCG CCG ATT CAA CAA GAG-3' (sitio de corte para *NdeI*) 1 µL, 10 µM CI PstDV1 R (SEQ ID NO. 9): 5'-GGG TCG ACT TAG TTA GTA TGC ATA ATA TAA-3' (sitio de corte para *SaII*) 1 µL, OneTaq® polimerasa (2,5 U) 0,5 µL, ADN viral (70 ng/µL) 1 µL y agua 35,5 µL, para un volumen total de reacción de 50 µL. Los cebadores CI PstDV1 F y CI PstDV1 R amplifican un fragmento de 990 pb (gen de la proteína de la cápside del PstDV1, GenBank KM485616.1). El programa del termociclador es el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C por 30 s, seguida de 20 ciclos a 94 °C por 30 s, 67 °C por 30 s y 68 °C por 1 min. Un ciclo de extensión final a 68 °C por 5 min y parada a 4 °C. Los productos amplificados son visualizados mediante un gel de agarosa al 1% corrido durante 1 h a 90 V y teñido con Gel-Red.

2.3) Purificación del fragmento amplificado a partir de gel de agarosa.

Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las instrucciones del estuche comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Para ello se sigue el siguiente protocolo: una vez cortada la banda, se pesa y se añade un volumen de tampón de unión en relación al peso de la banda (relación 1:1, peso: volumen). Posteriormente se incuba la mezcla a 60 °C hasta que la banda de gel esté totalmente disuelta. Luego se transfiere la solución de gel solubilizado a una columna de purificación GeneJET, se centrifuga por 1 min (12.000 rpm) y se descarta el líquido resultante. Después se añaden 700 µL del tampón de lavado en la columna, se centrifuga por 1 min (12.000 rpm) y se descarta el líquido resultante. Se centrifuga nuevamente durante 1 min (12.000 rpm) para eliminar los residuos del tampón de lavado. La elución se realiza con 40 µL de tampón de elución, se aplica al centro de la columna, se deja incubar durante al menos 1 min y se centrifuga durante 1 min (12.000 rpm). El fragmento purificado a partir de la banda de gel es visualizado mediante un gel de agarosa al 1% corrido durante 1 h a 90 V y teñido con Gel-Red.

2.4) Digestión con enzimas de restricción.

A fin de linealizar el vector pET28 (Novagen) se procede a realizar la siguiente reacción: pET28 (2 µg) 7 µL, 10X tampón D 10 µL, *NdeI* (10U/µL) 2 µL, *SaII* (10U/µL) 2 µL y agua 79 µL. Volumen total de reacción de 100 µL. Se incuba durante 4 h a 37 °C. Luego se añaden 11 µL de tampón FastAp 10X, 2 µL de fosfatasa alcalina (1U/µL) y se incuba durante 1 h a 37 °C.

Con el fragmento a ser ligado se procede a realizar la siguiente reacción: ADN (35 ng/μL) 20 μL, 10X Buffer D 10 μL, *NdeI* (10U/μL) 2 μL, *Sall* (10U/μL) 2 μL y agua 66 μL. Volumen total de reacción de 100 μL. Se incuba durante 4 h a 37 °C.

5 Posteriormente se purifica el fragmento y el plásmido cortados por separado haciendo uso del estuche comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Para ello se emplea el siguiente protocolo: se añade directamente a la mezcla un volumen de tampón de unión en relación al volumen de la reacción (relación 1:1, volumen: volumen), 100 μL en este caso. Luego se transfiere la solución a una columna de purificación GeneJET, se centrifuga por 10 min (12.000 rpm) y se descarta el líquido resultante. Posteriormente se añaden otros 100 μL de tampón de unión en la columna, se centrifuga por 1 min (12.000 rpm) y se descarta el líquido resultante. Después se añaden 700 μL del tampón de lavado en la columna, se centrifuga por 1 min (12.000 rpm) y se descarta el líquido resultante. Se centrifuga nuevamente durante 1 min (12.000 rpm) para eliminar los residuos del tampón de lavado. La 15 elución se realiza con 40 μL de tampón de elución, se aplica al centro de la columna, se deja incubar durante al menos 1 min y se centrifuga durante 1 min (12.000 rpm). El fragmento y el plásmido cortados y purificados son visualizados mediante un gel de agarosa al 1% corrido durante 1 h a 90 V y teñido con Gel-Red.

20 2.5) Ligación.

Se procede a mezclar 2 μL del vector (pET28, 12, 8 ng/μL) con 4 μL del fragmento (gen de la proteína de la cápside del PstDV1, 15 ng/μL), relación 2:1. Se incuba durante 5 min a 70 °C y luego en hielo por 15 min. Posteriormente se añaden 5 μL de 5X Rapid Ligation Buffer, 1 μL de la enzima ADN ligasa T4 (5U/μL) (Thermo Scientific) y 13 μL de agua libre de 25 nucleasas. Volumen total de reacción de 25 μL. Luego se incuba a 22 °C durante al menos 1 h.

2.6) Transformación.

Para el procedimiento de transformación se utilizan células competentes *E. coli* (DH5α) y se 30 aplica el siguiente protocolo: se añaden 5 μL de la mezcla de ligación en 50 μL de las células competentes, se mezcla con la pipeta y se incuba en hielo durante 20 min. Luego se aplica un choque de térmico de 42 °C durante exactamente 45 s para luego incubar inmediatamente en hielo durante 5 min. Posteriormente se añaden 200 μL de medio LB y se incuba durante 1 h a 37 °C con agitación de 200 rpm. Después se siembran las placas 35 (medio Luria-Bertani con kanamicina, 50 μg/mL) con 100 y 200 μL de la mezcla de reacción y se incuba durante la noche a 37 °C.

2.7) Purificación del ADN plasmídico.

Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del estuche comercial PureLink™ Quick Plasmid DNA Minipreps (Invitrogen™, Life Technologies™). El protocolo utilizado es el de purificación de ADN mediante centrifugación. Para ello se cosecha el cultivo (1 mL) mediante centrifugación y se elimina todo el medio. Luego se resuspende el pellet con 250 µL de tampón de resuspensión hasta que se observe homogéneo. Posteriormente se añaden 250 µL de tampón de lisis, se mezcla por inversión 5 veces y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. Después se añaden 350 µL de tampón de precipitación, se mezcla hasta que sea homogéneo y se centrifuga el lisado a 14.000 x g por 10 min. Se carga el sobrenadante en una columna y se centrifuga a 12.000 x g por 1 min y se descarta el fluido. Se añaden 500 µL de solución de lavado (W10) a la columna, se incuba a temperatura ambiente durante 1 min, se centrifuga a 12.000 x g por 1 min y se descarta el fluido. Luego se añaden 700 µL de solución de lavado (W9) a la columna, se centrifuga a 12.000 x g por 1 min y se descarta el fluido para después volver a centrifugar a 12.000 x g por 1 min y descartar nuevamente el fluido en el fondo del tubo colector. Para realizar la elución se añaden 75 µL de tampón TE en el centro de la columna, se incuba a temperatura ambiente durante 1 min y se centrifuga a 16.000 x g durante 2 min. El ADN purificado es conservado a -20 °C. El resultado es visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, corrido durante 90 min a 60 V y tenido con Gel-Red. La correcta inserción del fragmento VP en el vector de clonación es verificada a través del uso de enzimas de restricción y corroborada mediante análisis de secuenciación.

2.8) Transformación para inducción de la expresión de la proteína de la cápside del PstDV1 (VP).

Una vez verificada la correcta inserción del fragmento VP, se procede a realizar otra transformación bajo las mismas condiciones que la reacción descrita anteriormente (sección 2.6), pero utilizando la cepa bacterial *E. coli* BL21 (DE3) (Thermo Scientific) o Rosseta gami (DE3) (Novagen) y añadiendo solo 1 µL del plásmido purificado (70-100 ng/ µL).

2.9) Inducción de la expresión de la proteína recombinante VP.

Se utiliza un cultivo overnight de *E. coli* BL21 (DE3) o Rosseta gami (DE3) transformado con el vector pET28-VP, en el cual se inocula medio fresco LB-kanamicina (50 µg/mL). Para inducir la expresión proteica se añade IPTG.

2.10) Purificación de la proteína recombinante de la cápside viral (VP-PstDV1).

Este procedimiento se lleva a cabo siguiendo las indicaciones del estuche comercial His-Spin Protein Miniprep™ (Zymo Research). 10 mL de las células crecidas se resuspenden en 1 mL de tampón de unión. Las células se lisan mediante sucesivos ciclos de congelación y descongelación (-80 °C) y se centrifugan a 12.000 x g durante 5 min para conservar el sobrenadante. Se usan 150 µL de la solución proteica para la purificación. Para esto se transfieren 250 µL del gel de afinidad His dentro de la columna Zymo Spin P1, asegurándose de que la resina esté totalmente resuspendida antes de pipetear, y se coloca dentro de un tubo colector. Se centrifuga durante 15 s para secar la resina. Luego se añaden 300 µL de la muestra proteica resuspendiendo en el gel y se incuba durante 4 min. Luego se centrifuga durante 15 s y se descarta el líquido en el tubo colector. Se añaden 250 µL de tampón de lavado His, se resuspende en el gel y se centrifuga durante 15 s. Este último procedimiento de lavado se realiza por duplicado y se descarta el tubo colector. La columna es colocada en un tubo de 1,5 mL, se añaden 150 µL de tampón de elución His, se resuspende en el gel y se centrifuga durante 15 s para eluir la proteína. Se usan 10 µL del eluato para realizar análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) al 12%, corrido a 200 V durante 45 min y teñido con azul de Coomasie. La presencia de la proteína recombinante y la correcta síntesis de las VLPs se corrobora mediante análisis de Western Blot y de microscopía electrónica (TEM), respectivamente.

20 Ejemplo 3: Procedimiento de encapsidación del ARNi en las VLPs.

Encapsidación *in vitro* del ARN bicatenario-LvRab7 o ARN bicatenario-MjRab7 en las PstDV1-VLPs: El proceso de empaquetado es llevado a cabo usando 100 µg de ARN bicatenario-LvRab7 o ARN bicatenario-MjRab7 y 100 µg de la proteína recombinante VP-PstDV1 purificada, esto en presencia de 5 mM de ATP y 8 mM de MgCl₂ a 24 °C durante 6 horas y 1 mM de CaCl₂ en hielo por 1 hora, todo definido como una sola reacción.

REIVINDICACIONES

1. Producto combinado que comprende:
 - (i) ARN de interferencia que inhibe la expresión del gen Rab7 en un crustáceo, y
 - (ii) partículas parecidas al virus que comprenden proteína recombinante de la cápside del PstDV1.
2. El producto combinado de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el crustáceo es un camarón.
3. El producto combinado de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el camarón se selecciona del grupo que consiste en *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *M. japonicus*, *P. monodon*, *F. chinensis*, *F. indicus* y *F. merguensis*.
4. El producto combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la proteína recombinante de la cápside del PstDV1 comprende la secuencia SEQ ID NO. 1 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la secuencia SEQ ID NO. 1.
5. El producto combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el ARN de interferencia es un ARN bicatenario que inhibe la expresión del gen Rab7.
6. El producto combinado de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el ARN de interferencia bicatenario comprende las secuencias SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con las secuencias SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3, y el oligonucleótido antisentido de ARN.
7. El producto combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el ARN se vende aparte con instrucciones de cómo combinarlo con las partículas parecidas al virus y las partículas parecidas al virus se venden aparte con instrucciones de cómo combinarlo con el ARN.
8. El producto combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque las partículas parecidas al virus comprenden el ARN.

9. Uso del producto combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para el control de patógenos virales en la acuicultura de crustáceos.

5 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque el crustáceo es un camarón.

10 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque el camarón se selecciona del grupo que consiste en *L. vannamei*, *P. monodon*, *L. stylirostris*, *F. chinensis*, *M. japonicus*, *F. indicus* y *F. merguensis*.

12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, caracterizado porque la administración del producto combinado es oral.

15 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-12, caracterizado porque la administración del producto es a través del agua, por baño estacionario, y/o por mezcla con el alimento.

20 14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-13, caracterizado porque el patógeno viral se selecciona de una lista que consiste en WSSV, YHV, TSV, PstDV1 e IMNV.

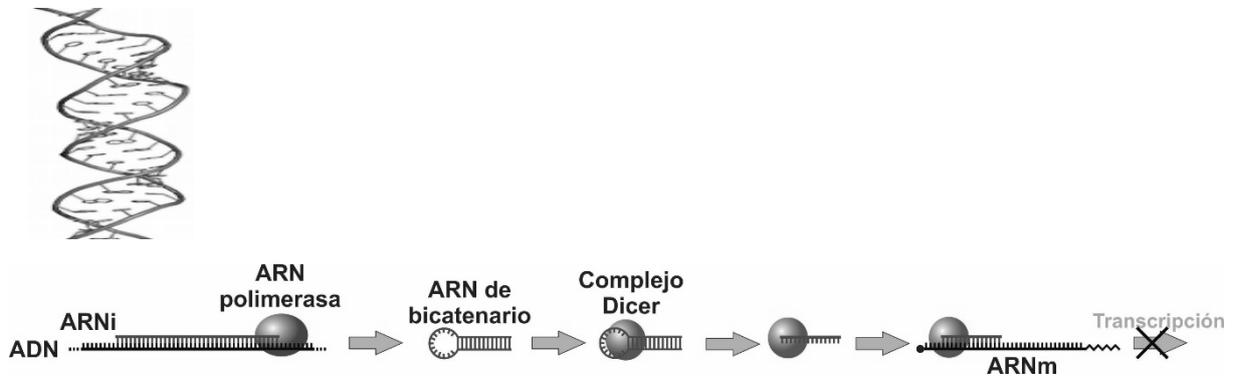


Figura 1

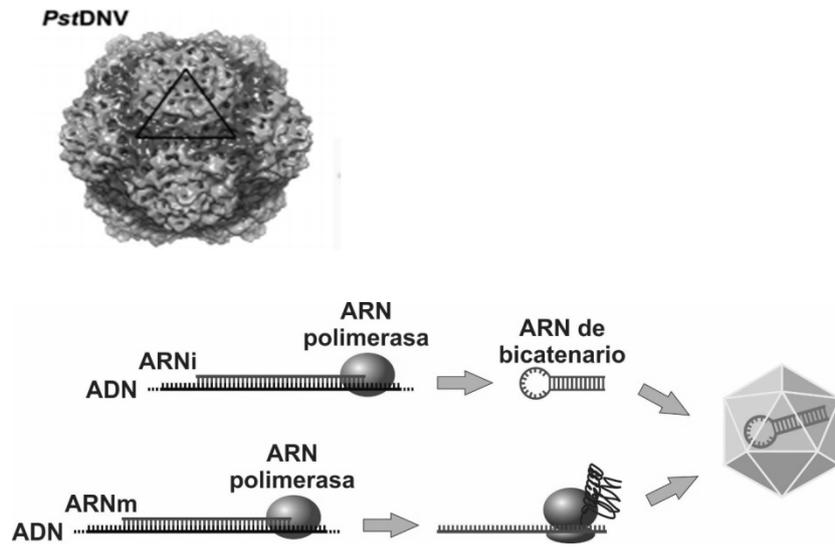


Figura 2

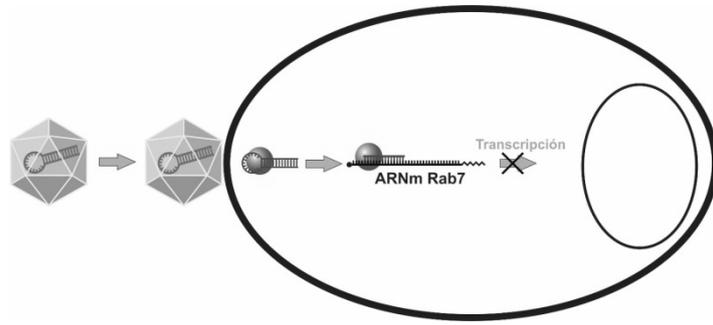


Figura 3



- ②1 N.º solicitud: 201830047
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 16.01.2018
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
Y	ONGVARRASOPONE CHALERMPORN et al. "Inhibition of Taura syndrome virus replication in <i>Litopenaeus vannamei</i> through silencing the LvRab7 gene using double-stranded RNA". Archives of Virology JUL 2011. , 30/06/2011, Vol. 156, Nº 7, Páginas 1117-1123, ISSN 0304-8608(print) ISSN 1432-8798(electronic), <DOI: doi:10.1007/s00705-011-0952-9>. Ver apartado "Discussion"	1-14
Y	SINNUENGNONG R et al. "Administration of co-expressed <i>Penaeus stylirostris</i> densovirus-like particles and dsRNA-YHV-Pro provide protection against yellow head virus in shrimp". Journal of Biotechnology 20180210 Elsevier B.V. nld. , (on-line 04/01/2018), Vol. 267, Páginas 63 - 70, ISSN 0168-1656 (print) ISSN 1873-4863 (electronic), <DOI: doi:10.1016/j.jbiotec.2018.01.002>. Ver apartados 1, 3 y 4	1-14
A	CHEN BO-KUN et al. "Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infection in freshwater crayfish <i>Procambarus clarkia</i> ". Aquaculture, 20170505 Elsevier, Amsterdam, NL. Lubzens Esther; Labbe Catherine; Ciereszko Andrzej, 05/05/2017, Vol. 477, Páginas 76 - 79, ISSN 0044-8486, <DOI: doi:10.1016/j.aquaculture.2017.05.002>. Ver apartado 1	1-14
A	ITSATHITPHAISARN ORNCHUMA et al. "Potential of RNAi applications to control viral diseases of farmed shrimp". JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 20161117 SAN DIEGO, CA, US. Abd-Alla Adly M M; Arif Basil, 17/11/2016, Vol. 147, Páginas 76 - 85, ISSN 0022-2011, <DOI: doi:10.1016/j.jip.2016.11.006>. Ver todo el documento.	1-14
A	SANITT POOHRAWIND et al. "Protection of yellow head virus infection in shrimp by feeding of bacteria expressing dsRNAs". Journal of Biotechnology Elsevier, AMSTERDAM, NL. Puehler Alf; Selbitschka Werner, 30/11/0002, Vol. 179, Páginas 26-31, ISSN 0168-1656, <DOI: doi:10.1016/j.jbiotec.2014.03.016>. Ver todo el documento.	1-14

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:

Fecha de realización del informe
19.09.2018

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/12 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

A01K61/59 (2017.01)

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

C12N, A01K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM, Compendex/EI, XPESP, EMBL-EBI, NCBI y bases de datos TXT