

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 216**

51 Int. Cl.:

A61K 39/102 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2013 PCT/JP2013/074075**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14038662**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2013 E 13834953 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2893937**

54 Título: **Vacuna de ADN contra pseudotuberculosis en peces marinos**

30 Prioridad:

10.09.2012 JP 2012198719

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

03.03.2021

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO
UNIVERSITY OF MARINE SCIENCE AND
TECHNOLOGY (100.0%)
5-7 Konan 4-chome Minato-ku
Tokyo 108-8477, JP**

72 Inventor/es:

**HIRONO, IKUO;
KONDO, HIDEHIRO y
YAMASHITA, KOZUE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 809 216 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de ADN contra pseudotuberculosis en peces marinos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una vacuna de ADN para inducir inmunidad protectora contra una infección a peces por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, que es una bacteria causante de la pseudotuberculosis.

10 El término "pseudotuberculosis" como se usa en la presente memoria significa pseudotuberculosis causada por la infección de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Por lo tanto, no solo la pseudotuberculosis se desarrolló en Amberjacks, sino que también se desarrolló pasteurelosis causada por la misma bacteria causante en peces que no son colas amarillas [por ejemplo, peces que pertenecen a Perciformes (porgy negro japonés, pargo rojo, mero rojo y similares), peces que pertenecen a Osmeriformes (ayu de agua dulce, y similares), y se incluye el pescado que pertenece a Tetraodontiformes (scaper negro, y similares)].

Técnica Antecedente

20 En la industria de la acuicultura de muchos organismos acuáticos, como peces y mariscos, las enfermedades virales y bacterianas en un área de acuicultura, que es un sistema cerrado, se han convertido en serios problemas, ya que los individuos están presentes en una alta densidad y, por lo tanto, el impacto de estas infecciones es bastante grande.

25 La pseudotuberculosis (también conocida como pasteurelosis) fue reportada por primera vez como causa de enfermedad de una mortalidad masiva de la perca blanca (*Roccus americanus*) en la bahía de Chesapeake, EE. UU. en 1963 (Literatura de No Patente 1). En Japón, su aparición se observó en el rabo amarillo acuícola (peces de 0 años) en el suroeste de Shikoku en 1968, y se propagó en el rabo amarillo acuícola en la mayor parte del oeste de Japón al año siguiente, en 1969. Además, se produjo pseudotuberculosis en varios peces, como el porgy negro japonés, el besugo rojo, el mero rojo, el ayu de agua dulce y el scraper negro, así como el rabo amarillo, y dado que esta enfermedad tiene un nivel de contagio muy alto, se ha convertido en un problema que amenaza la acuicultura marina (Literatura de No Patente 1).

35 *P. damsela* subsp. *piscicida* pertenece al género *Photobacterium*, y es una bacteria gramnegativa, anaeróbica facultativa, no móvil, con forma de varilla corta (0,6 a 1,2 μm \times 0,8 a 2,6 μm). Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30 °C, su pH óptimo es de 7,5 a 8,0 y su concentración óptima de cloruro de sodio es de 2 a 3%. Es sensible a la ampicilina, al ácido oxolínico, al florfenicol y similares. Los síntomas de esta enfermedad se caracterizan por una formación de pequeñas manchas blancas que tienen un diámetro de aproximadamente 1 mm en el riñón y el bazo. Las colonias de la bacteria se colocan en pequeñas manchas blancas, y muchas de ellas forman nódulos rodeados de tejido fibroso. La formación de estas colonias bacterianas se basa en una formación de bolas bacterianas en capilares o tejido intersticial, al resistir la digestión intracelular por los fagocitos y causar el crecimiento dentro de los fagocitos (Literatura de No Patente 2).

45 Una vacuna inactivada contra la enfermedad ya ha sido aprobada en Japón, pero la vacuna activada es difícil de inducir inmunidad celular. Sin embargo, el desarrollo de vacunas que tienen una alta inducibilidad de inmunidad celular no está progresando (Literaturas de Patente 1 y 2).

50 En general, las vacunas se usan para la prevención o el tratamiento de infecciones bacterianas. Las vacunas incluyen vacunas inactivadas (encefalitis japonesa, enfermedad de Weil y similares), toxoides (tétanos, difteria y similares), vacunas atenuadas (BCG, polio y similares), vacunas recombinantes (virus de la hepatitis B y similares), y similares. Las vacunas inactivadas y los toxoides preparados mediante la desintoxicación de una exotoxina inducen anticuerpos contra estas vacunas, y son vacunas relativamente seguras. Las vacunas recombinantes no contienen impurezas y, por lo tanto, se cree que son vacunas más seguras, en comparación con las vacunas inactivadas.

55 Sin embargo, aunque estas vacunas pueden inducir la producción de anticuerpos, es una desventaja que la inmunidad celular es difícil de inducir. Además, con respecto a las vacunas inactivadas y las vacunas atenuadas, es industrialmente necesario obtener una gran cantidad de proteína como antígeno, y es esencial cultivar un patógeno apropiado. Además, los efectos inmunitarios adquiridos por las vacunas atenuadas a menudo se mantienen durante un largo período de tiempo, pero se señalan los efectos secundarios y los riesgos. Con respecto a las vacunas inactivadas y las vacunas recombinantes, se cree que la persistencia del antígeno es corta en un huésped, y necesita un adyuvante y similares. Con respecto a estas vacunas convencionales, dado que el almacenamiento refrigerado es necesario durante un período desde la fabricación hasta la inoculación en los sujetos, existe el problema de que se produce un aumento en el costo y una disminución en la potencia.

65 Con el progreso reciente en la investigación y el desarrollo de vacunas, se ha desarrollado un nuevo tipo de

vacuna (vacuna de ADN), que brinda inducción inmunitaria mediante la administración de un ADN plasmídico que codifica una proteína inmunogénica, y ha ido mejorando las desventajas de las vacunas convencionales, como se describe a continuación. Es decir, las ventajas de la vacuna de ADN son: dado que puede inducir fuertemente no solo la respuesta inmunitaria humoral, sino también la inmunidad celular, puede impartir una actividad protectora contra enfermedades infecciosas; que puede ser altamente purificado; que, dado que es estable a temperatura ambiente o incluso a altas temperaturas, el almacenamiento refrigerado no es esencial y puede almacenarse durante un largo período de tiempo; que puede modificarse fácilmente mediante técnicas de ingeniería genética; que el tiempo dedicado al desarrollo de la vacuna puede acortarse; y similares.

Se sabe que una respuesta inmunitaria en la trucha arcoíris y la platija puede ser estimulada por inyección intramuscular de un gen que codifica la glucoproteína, como proteína constituyente, de los rhabdovirus (Literatura de No Patente 3). Además, hay un reporte acerca de vacunas de ADN para trucha arcoíris y platija (Literatura de No Patente 4). Sin embargo, no hay reportes acerca de vacunas de ADN en otros peces.

La Literatura de Patente 3 describe un derivado de una proteína extracelular de 55 kDA de *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* es la base de una vacuna contra la infección por *Photobacterium* y, por lo tanto, protege a los peces de la pasteurelisis.

La Literatura de Patente 4 describe un procedimiento de inmunización de especies acuícolas mediante la introducción de sistemas de expresión de ADN en las especies acuícolas.

La Literatura de No Patente 5 describe dos clones diferentes de codificación de proteínas antigénicas (PPA1 y PPA2) que fueron aislados usando suero de conejo anti-*Pasteurella piscicida* a partir de una biblioteca de ADN genómico de la cepa KP9038 de *P. piscicida*.

Lista de citas

Literatura de Patente

[Literatura de Patente 1] JP H09-176043 A
 [Literatura de Patente 2] JP 2002-003400 A
 [Literatura de Patente 3] WO 2005/014 62 9 A2
 [Literatura de Patente 4] EP 1 538 210 A2

Literatura de No Patente

[Literatura de No Patente 1] S. F. Snieszko et al., *Bacteriology*, (USA), 1964, vol. 88, p. 1814-1814.
 [Literatura de No Patente 2] Hisashi Wakabayashi y Kiyokuni Muroga ed., *Gyokai-rui no Kansensho-Kiseichu-sho* (Infectious and parasitic diseases of fish and shellfish [Enfermedades infecciosas y parasitarias de peces y mariscos]), (KOUSEISHA KOUSEIKAKU Co., Ltd.), 2004, p. 206-211.
 [Literatura de No Patente 3] P. Boudinot et al., *Virology*, (USA), 1998, vol. 249, p. 297-306.
 [Literatura de No Patente 4] McLauchlan et al., *Fish and Shellfish Immunology* (Inmunología de peces y mariscos), (Reino Unido), 2003, vol. 15, p. 39-50.
 [Literatura de No Patente 5] Ikuo Hirone et al. "Identification of major antigenic proteins of *Pasteurella piscicida* (Identificación de las principales proteínas antigénicas de *Pasteurella piscicida*)", *Microbial Pathogenesis*, 1 de enero de 1997, p. 371-380.

Sumario de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna de ADN para peces para inducir inmunidad protectora contra la pseudotuberculosis. La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier otro aspecto o realización establecido en la presente memoria que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones únicamente tiene fines informativos.

Solución al problema

Los inventores de la presente invención llevaron a cabo estudios intensivos sobre vacunas eficaces contra la pseudotuberculosis en peces marinos y, como resultado, se administraron ADN plasmídicos que contienen un gen que codifica una lipoproteína (ppa1: SEQ ID NO: 1), una serina proteasa DegQ (ppa2: SEQ ID NO: 3), o un precursor de la proteína A de la membrana externa (ppars1: SEQ ID NO: 5) de *P. damsela* subsp. *piscicida*, como una mezcla o por separado, a la platija japonesa (*Japanese flounder*) y al pez limón (*Greater amberjack*), y se descubrió que estos ADN tenían efectos inmunitarios contra la pseudotuberculosis en los peces marinos y que aumentaban los niveles de expresión de los genes relacionados con el sistema inmunitario. Además, estas

secuencias fueron modificadas de acuerdo con el uso de codones en platija para preparar genes artificiales (SEQ ID NO: 7, 9 y 11), y los ADN plasmídicos que contienen estas secuencias fueron administrados de manera similar. Como resultado, se confirmó que cada uno exhibía altos efectos de protección inmunológica, y se completó la presente invención.

5

La presente invención se refiere a:

[1] Una vacuna de ADN para peces, caracterizada por:

10

- impartir inmunidad contra la pseudotuberculosis causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*;
- que comprende, como ingrediente activo:

15

un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunogénico contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos preparada modificando la secuencia basada en un uso de codón en platija japonesa; o un vector de expresión que comprende el ADN,

20

en el que el polipéptido inmunogénico es:

25

- (1) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- (2) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; o
- (3) un polipéptido homólogo con inmunogenicidad contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; o

30

un fragmento parcial inmunogénico de cualquiera de los polipéptidos (1) a (3), por medio del que la longitud del fragmento parcial no está limitada, siempre que un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos parcial pueda inducir inmunidad, incluyendo inmunidad humoral e inmunidad celular, contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en el cuerpo vivo.

[2] la vacuna de ADN para peces de acuerdo con [1], en la que la secuencia de nucleótidos es:

35

- (1) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o 7; o
- (2) una secuencia de nucleótidos que tiene una homología del 80% o más con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o 7, y que codifica un polipéptido con inmunogenicidad contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* o un fragmento parcial inmunogénico de cualquiera de las secuencias de nucleótidos (1) y (2), por lo que la longitud del fragmento parcial no está limitada, siempre que un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos pueda inducir inmunidad, incluyendo inmunidad humoral e inmunidad celular, contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en el cuerpo vivo.

40

[3] la vacuna de ADN para peces de acuerdo con [1], en la que el vector de expresión es un plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o 7.

45

[4] una vacuna de ADN para peces de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3] para su uso en un procedimiento de prevención de pseudotuberculosis, en la que el procedimiento se caracteriza por administrar la vacuna de ADN para peces de acuerdo con cualquiera de [1] a [3] a peces.

50

[5] la vacuna de ADN para peces para uso de acuerdo con [4], en la que el pescado es pescado que pertenece a Perciformes, Tetraodontiformes u Osmeriformes.

Además, la presente invención se refiere a:

55

un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunogénico contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, o un vector de expresión que comprende el ADN, para una vacuna de ADN para peces, o para la prevención de pseudotuberculosis, y el uso de un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunogénico contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, o un vector de expresión que comprende el ADN, en la fabricación de una vacuna de ADN para peces.

60

Efectos ventajosos de la invención

65

De acuerdo con la vacuna de ADN para peces de la presente invención, se puede impartir la inmunidad contra la pseudotuberculosis causada por *P. damsela* subsp. *piscicida*. Más particularmente, la vacuna de ADN para

peces de la presente invención puede inducir una respuesta inmunitaria (que incluye una respuesta inmunitaria humoral y una respuesta inmunitaria celular) contra enfermedades infecciosas de *P. damsela* subsp. *piscicida* o pseudotuberculosis causada por la infección de *P. damsela* subsp. *piscicida* y, por lo tanto, es eficaz en la prevención de la infección de *P. damsela* subsp. *piscicida*, o la prevención de pseudotuberculosis. Por ejemplo, los plásmidos que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o 7, que pueden usarse como ingrediente activo de la vacuna de ADN para peces de la presente invención, son eficaces para el ingrediente activo de la vacuna de ADN, sobre la base de una prueba de protección contra la infección de *P. damsela* subsp. *piscicida* en peces marinos, y los resultados en los que se confirmaron incrementos notables en los niveles de expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario y, por lo tanto, se puede esperar que los plásmidos prevengan la infección de *P. damsela* subsp. *piscicida* en peces marinos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura1 es un gráfico que muestra, con una mortalidad acumulada después del desafío de *P. damsela* subsp. *piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02 (inmersión a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml), el cambio en una tasa de mortalidad acumulativa en platija japonesa tratada con vacunas de ADN (ppa1-salvaje, ppa2-salvaje o ppars1-salvaje), en un grupo de inmersión a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml.

La Figura2 es un gráfico que muestra, con una mortalidad acumulada después del desafío de *P. damsela* subsp. *piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02 (inmersión a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml), el cambio en una tasa de mortalidad acumulativa en platija japonesa tratada con vacunas de ADN (ppa1-salvaje u opt-ppa1), en un grupo de inmersión a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml.

La Figura3 es un gráfico que muestra, con una mortalidad acumulada después del desafío de *P. damsela* subsp. *piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02 (inmersión a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml), el cambio en una tasa de mortalidad acumulativa en platija japonesa tratada con vacunas de ADN (ppa2-salvaje u opt-ppa2), en un grupo de inmersión a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml.

La Figura4 es un gráfico que muestra, con una mortalidad acumulada después del desafío de *P. damsela* subsp. *piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02 (inmersión a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml), el cambio en una tasa de mortalidad acumulada en platija japonesa tratada con vacunas de ADN (ppa3-salvaje u opt-ppa3), en un grupo de inmersión a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml.

Descripción de realizaciones

La vacuna de ADN para peces de la presente invención no está limitada, siempre que se trate de un constructo de ADN que comprende al menos una (es decir, una o más) secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunogénico contra *P. damsela* subsp. *piscicida*. Ejemplos de la vacuna de ADN para peces de la presente invención incluyen:

- (a) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunogénico contra *P. damsela* subsp. *piscicida*, y
- (b) un vector de expresión que comprende el ADN (a).

El ADN (a) puede contener además varias secuencias reguladoras requeridas para la expresión del polipéptido inmunogénico, y el vector de expresión (b) también puede contener tales secuencias reguladoras.

El término "polipéptido inmunogénico contra pseudotuberculosis" como se usa en la presente memoria significa un polipéptido capaz de inducir inmunidad (incluyendo inmunidad humoral e inmunidad celular) contra *P. damsela* subsp. *piscicida* en el cuerpo vivo.

El polipéptido inmunogénico contra *P. damsela* subsp. *piscicida* no está limitado, siempre que sea un polipéptido capaz de inducir inmunidad (incluyendo inmunidad humoral e inmunidad celular) contra *P. damsela* subsp. *piscicida* en el cuerpo vivo. El polipéptido inmunogénico es un polipéptido codificado por ppa1 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, o su fragmento parcial, y un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o su fragmento parcial.

Ejemplos del polipéptido inmunogénico además incluyen:

- (1) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- (2) un polipéptido modificado con inmunogenicidad contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se delecionan, sustituyen o añaden en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y
- (3) un polipéptido homólogo con inmunogenicidad contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más con la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y un fragmento parcial de cualquiera de los polipéptidos (1) a (3).

5 La vacuna de ADN para peces de la presente invención puede ser una vacuna de ADN capaz de inducir solo un polipéptido inmunogénico (ppa1 o solo el polipéptido modificado u homólogo del mismo), o una vacuna de ADN capaz de inducir dos o más polipéptidos inmunogénicos (preferentemente una combinación de ppa1 o el polipéptido modificado u homólogo del mismo con uno o más polipéptidos seleccionados de los polipéptidos codificados por ppa1, ppa2 y ppars1, y los polipéptidos modificados u homólogos del mismo). Ejemplos de estos últimos incluyen una combinación de la proteína ppa1 (o su polipéptido modificado u homólogo) y la proteína ppa2 (o su polipéptido modificado u homólogo), una combinación de la proteína ppa1 (o su polipéptido modificado u homólogo) y la proteína ppars1 (o su polipéptido modificado u homólogo), y una combinación de la proteína ppa1 (o su polipéptido modificado u homólogo), la proteína ppa2 (o su polipéptido modificado u homólogo) y la proteína ppars1 (o su polipéptido modificado u homólogo).

15 El "polipéptido modificado" como se usa en la presente memoria significa una proteína en la que uno o más (por ejemplo, 1 a varios, preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 5, aún más preferentemente 1 a 3, aún más preferentemente 1 a 2, y lo más preferentemente 1) aminoácidos son modificados (por ejemplo, se delecionan, sustituyen y/o agregan) en la secuencia de aminoácidos de un cierto número de SEQ ID, y la inmunidad todavía puede ser impartida al pez al que se puede aplicar la presente invención.

20 El término "identidad en secuencias de aminoácidos", como se usa en la presente memoria, significa una identidad calculada comparando y analizando dos secuencias de aminoácidos usando un software de análisis informático (software SDC), y considerando las dos secuencias de aminoácidos como iguales cuando un mismo tipo de aminoácido se encuentra en la misma posición.

25 Como la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido inmunogénico, que se puede usar en la presente invención, se pueden ejemplificar las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente que codifican cada polipéptido inmunogénico. Ejemplos de la secuencia de nucleótidos incluyen los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, los polipéptidos modificados o los polipéptidos homólogos, y fragmentos parciales de los mismos.

30 Como la secuencia de nucleótidos:

(1) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, o
 (2) una secuencia de nucleótidos que tiene una homología del 80% o más con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y que codifica un polipéptido con inmunogenicidad contra *Photobacterium damselae subsp. piscicida*;
 o un fragmento parcial de cualquiera de las secuencias de nucleótidos (1) y (2) es preferible.

40 El término "homología en secuencias de nucleótidos", como se usa en la presente memoria, significa un valor calculado comparando y analizando dos secuencias de nucleótidos usando un software de análisis informático (software SDC), y considerando las dos secuencias de nucleótidos como iguales cuando el mismo tipo de nucleótido se encuentra en la misma posición.

45 La longitud del fragmento parcial no está limitada, siempre que un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos parcial pueda inducir inmunidad (incluyendo inmunidad humoral e inmunidad celular) contra *P. damselae subsp. piscicida* en el cuerpo vivo.

50 La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido inmunogénico puede ser una secuencia natural, una secuencia completamente sintética o una secuencia parcialmente sintética que utiliza una secuencia natural.

55 La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido inmunogénico (por ejemplo, una lipoproteína), que puede usarse en la presente invención, puede obtenerse, por ejemplo, a partir de *P. damselae subsp. piscicida*. Como un procedimiento típico para obtener la secuencia de nucleótidos usada en la presente invención, se puede ejemplificar un procedimiento convencional en el campo de la ingeniería genética, por ejemplo, un procedimiento de detección que usa una sonda de ADN apropiada diseñada con base en la información de una secuencia de aminoácidos parcial.

60 El vector de expresión usado en la presente invención no está limitado, siempre que sea un vector capaz de expresarse en células de peces. El vector de expresión usado en la presente invención puede construirse sobre la base de un vector autorreplicante, tal como un plásmido, que existe como un cuerpo independiente extracromosómico y no depende de la replicación cromosómica. El vector de expresión puede ser uno que puede incorporarse al genoma de un microorganismo huésped, cuando se transforma con el vector de expresión, y que puede replicarse junto con el cromosoma en el que se incorpora. El vector de expresión, que puede usarse en la presente invención, puede construirse de acuerdo con procedimientos y métodos ampliamente utilizados en el campo de la ingeniería genética.

Como la secuencia reguladora de la transcripción, que puede usarse en la presente invención, por ejemplo, se puede ejemplificar un promotor constitutivo, un promotor inducible o regulador, un promotor específico de tejido, un promotor derivado del gen de un antígeno expresado, o similares, pero la secuencia reguladora de la transcripción no se limita a estos promotores, siempre que pueda expresarse en células de peces. Los ejemplos del promotor constitutivo incluyen una secuencia promotora derivada del citomegalovirus (CMV), o promotores fuertes como el virus del sarcoma de Rous (RSV), el virus simio 40 (SV-40), el promotor de β -actina muscular, el virus del herpes simple (HSV), o similar. Como promotor específico de tejido, por ejemplo, puede ejemplificarse un promotor de timidina quinasa. Ejemplos del promotor inducible o regulador incluyen un promotor regulador de la hormona del crecimiento, un promotor que está bajo el control de una secuencia de operón lac, o un promotor de metalotioneína inducible por zinc. La secuencia reguladora de la transcripción puede estar operativamente unida a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido inmunogénico (es decir, para regular la expresión de la secuencia de nucleótidos).

La secuencia reguladora puede contener una secuencia reguladora de la expresión que incluye la secuencia de ADN del promotor (por ejemplo, el promotor inducible o constitutivo) y, si se desea, una copia o más copias seleccionadas de un elemento mejorador, una secuencia de intrones para empalmar una señal de transcripción o poliadenilación (por ejemplo, virus simio-40 (SV-40) o derivado de la hormona de crecimiento bovina), o una secuencia de ADN inmunoestimulante conocida como motivo CpG.

El vector de expresión puede contener, si se desea, por ejemplo, una secuencia de origen de replicación bacteriana, o un marcador de selección para la detección, tal como un gen con resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina) o un gen sin resistencia a antibióticos (por ejemplo, un gen de β -galactosidasa).

Se sabe que un oligonucleótido que contiene nucleótidos CpG no metilados activa el sistema inmunitario (A. Krieg et al., Nature, 1995, 374, 546-549). Un determinado motivo CpG es inmunoestimulador contra una respuesta de células B o células T, dependiendo de una secuencia de flanqueo, y preferentemente estimula una determinada especie. La copia del motivo CpG en el vector de expresión de ADN funciona como un adyuvante que induce una respuesta inmunitaria contra la proteína expresada. El motivo CpG, es decir, una porción de alargamiento de ADN que contiene el dinucleótido CpG en la secuencia especificada, se puede seleccionar de longitudes de aproximadamente 5 a 40 pares de bases. Se pueden insertar motivos plurales en regiones no codificantes del vector de expresión. En el caso donde se desea una respuesta humoral, es preferible un motivo CpG que estimule la secreción de citocinas que se sabe que estimulan una respuesta de células T CD8+.

El pescado al que se aplica la presente invención no está limitado, siempre que pueda estar infectado con *P. damselae subsp. piscicida*. Ejemplos de los peces incluyen peces que pertenecen a Perciformes (cola amarilla, pez limón, porgy negro japonés, pargo rojo, mero rojo y similares), peces que pertenecen a Osmeriformes (ayu de agua dulce y similares) y peces que pertenecen a Tetraodontiformes (scrapers negro y similares).

Ejemplos de un procedimiento para inocular la vacuna de ADN incluyen una administración oral, una inyección intramuscular, una inyección intraperitoneal, una administración que usa una pistola de genes y una inmersión, y es preferible la inyección intramuscular o la administración que usa una pistola de genes. La administración usando una pistola de genes es un procedimiento en el cual las partículas de oro que tienen un diámetro de aproximadamente 1 μ m se recubren con el plásmido, y las partículas se inyectan en la piel, las células o el tejido de un sujeto con un instrumento específico, utilizando gas helio de alta presión, a la manera de una pistola de aire. La administración con una pistola de genes tiene características superiores, en comparación con la inyección intramuscular, de que se pueden lograr efectos inmunitarios equivalentes con el ADN en una cantidad de 1/100 a 1/1000, y que tiene una reproducibilidad superior a la inyección intramuscular.

Un adyuvante mejora una reacción inmunitaria contra un antígeno mediante la estimulación del sistema inmunitario, y generalmente se agrega a la vacuna como auxiliar. Por ejemplo, un compuesto de aluminio, un polinucleótido, un componente bacteriano de bacterias y similares son conocidos por los adyuvantes típicos, pero muchos de ellos no son suficientes para obtener los efectos de la presente invención. En particular, dado que la acción de los adyuvantes es ampliamente efectiva en las sustancias antigénicas, existe el riesgo de que aumente la estimulación antigénica de las impurezas contenidas en los antígenos o que aumenten los efectos secundarios nocivos, y existe un problema que es necesario considerar suficientemente a la pureza del antígeno utilizado. Bajo estas circunstancias, se ha reportado que, por ejemplo, IL-1 β es eficaz como adyuvante (J. Y. Scheerlinck, Genetic Adjuvants for DNA Vaccine (Adyuvantes genéticos para vacuna de ADN), 19, 2647-2656, 2001). En la presente invención, se puede preparar un plásmido en el que se introduce un gen IL-1 β para que pueda expresarse en el cuerpo vivo de los peces (por ejemplo, platija), y los peces pueden inocularse con el plásmido junto con la vacuna de la presente invención.

El mecanismo inmunitario demuestra una variedad de funciones fisiológicas, mientras que las células que juegan diversos roles regulan mutuamente las funciones. La activación del sistema inmunitario se puede analizar utilizando, como índice, los niveles de expresión de un receptor de antígeno de células T (TCR), un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) o una inmunoglobulina (Ig), que está presente en la superficie celular de

células T y células B, que son factores que juegan un papel importante en la defensa biológica. En la presente invención, por ejemplo, después de inocular la platija con la vacuna de ADN contra la pseudotuberculosis, para analizar la activación del mecanismo de defensa biológica en el cuerpo vivo de los peces, por ejemplo, un cambio en los niveles de expresión de TCR, MHC e Ig puede confirmarse cuantitativamente llevando a cabo una PCR en tiempo real, y puede analizarse la activación del sistema inmunitario.

La PCR en tiempo real es una técnica de detección monitorizando el proceso de amplificación génica por PCR en tiempo real, utilizando un dispositivo de detección de fluorescencia y perfilando la curva de reacción de PCR. Cuando una muestra a analizar se amplifica por PCR, se puede calcular la cantidad exacta de ADN examinando el número de ciclos de PCR que alcanzan la curva de aumento exponencial. La PCR en tiempo real se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, TaqMan (Perkin-Elmer) y iCycler (BioRad).

En la PCR en tiempo real, se usan dos tipos de cebadores, un cebador para PCR en tiempo real (SG) y un cebador para ADN estándar (SG200). El cebador para PCR en tiempo real (SG) está diseñado para que el amplicón sea corto (60 a 100 pb) y el contenido de GC sea bajo. En el caso de que el cebador se diseñe en la porción 3' UTR, se puede diseñar un cebador específico de gen con relativa facilidad y precisión. Además, existe un procedimiento para diseñar el cebador en un ordenador utilizando un software (por ejemplo, primer express: PE Biosystems Japan Ltd.). El cebador para ADN estándar (SG200) está diseñado en el exterior del cebador diseñado en PCR en tiempo real. En el caso en que los genes se comparan entre sí, es preferible ajustar el amplicón.

En la preparación de ADN estándar, se usan cebadores específicos (SG200) correspondientes a cada gen a medir para llevar a cabo la PCR (volumen total: 50 µl) hasta que alcanza una meseta. En la PCR, después de una reacción a 95 °C durante 2 minutos, se repite un ciclo que consiste en reacciones a 95 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 1 minuto 30 veces. Posteriormente, los productos de PCR resultantes se someten a una columna (por ejemplo, Dispositivos de Filtro Centrifugo Microcon-PCR; MILLIPORE) para eliminar el exceso de cebadores, y se mide la concentración. El número de copias se calcula a partir de la constante de Avogadro (1 mol = 6,022 × 10²³ moléculas). A continuación, cada producto de PCR se diluye para preparar una serie de diluciones (21 etapas, número de copia: 10¹³ a 10⁻⁷), y la PCR se llevó a cabo utilizando los cebadores (SG) que están diseñados en el interior. Esta PCR se lleva a cabo en un número de ciclo de 14 ciclos para que la amplificación ocurra exponencialmente. Los resultados de PCR resultantes se someten a electroforesis en agarosa. Dado que la amplificación exponencial se produce en las siguientes 5 etapas después de que las bandas son completamente invisibles, estas 5 etapas se utilizan, como ADN estándar, en la verdadera PCR en tiempo real.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente, pero no se limita a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Aislamiento del gen ppa1, el gen ppa2 y el gen ppars1 derivados de *P. damselae subsp. piscicida*

(1) Preparación de cebadores de PCR

Los siguientes cebadores de PCR se prepararon de acuerdo con un procedimiento convencional, basado en las secuencias de nucleótidos de ADN correspondientes a un gen ppa1 (SEQ ID NO: 1), un gen ppa2 (SEQ ID NO: 3) y un gen ppars1 (SEQ ID NO: 5) derivado de *P. damselae subsp. piscicida*

ppa1-directo = 5'CGGAATTCACCATGAATCGTAAAGTAACTA 3' (SEQ ID NO: 13)
 ppa1-inverso = 5'CCGCTCGAGCTTAGTGTAAGAACCAC 3' (SEQ ID NO: 14)
 ppa2-directo = 5'CGGAATTCACCATGAGAAAACCTCTGCTTG 3' (SEQ ID NO: 15)
 ppa2-inverso = 5'CCGCTCGAGACGCATGATTAATACA 3' (SEQ ID NO: 16)
 ppars1-directo = 5'CGGAATTCACCATGTCTAAAGTTCGTTATG 3' (SEQ ID NO: 17)
 ppars1-inverso = 5'CCGCTCGAGTTCAGCAAGAACTTGAG 3' (SEQ ID NO: 18)

(2) Preparación de vacunas de ADN.

P. damselae subsp. piscicida cepa TUMSAT-PPE05-02 se inoculó en un medio líquido HI suplementado con NaCl al 2% y se cultivó con agitación a 25 °C durante la noche. Las células se recogieron y se suspendieron en un solvente para extracción (SDS al 0,5% y proteasa K 0,01 mg/ml), y se trataron a 37 °C durante 1 hora. Al líquido, se añadieron 100 µl de NaCl 5 mol/l y 84 µl de CTAB/NaCl y se mezclaron bien, y se trataron a 65 °C durante 10 minutos. La mezcla resultante se purificó usando un volumen igual de isopropanol/cloroformo, 600 µl de PCI y 99% de etanol a su vez. El sobrenadante se descartó y el ADN genómico como un gránulo se secó y se disolvió en 30 µl de un tampón TE.

El ADN genómico extraído se usó como plantilla para realizar una PCR, usando reactivos de reacción de PCR

disponibles comercialmente (ADN polimerasa ExTaq; Takara Shuzo Co., Ltd.), de acuerdo con un manual adjunto a los mismos, y los cebadores de PCR preparados en el Ejemplo 1(1), de acuerdo con un procedimiento convencional. En la PCR, se mezclaron 5 µl de 10xtampón añadido, 4 µl de dNTP, 1 µl de cebadores directo e inverso (25 pmol/µl), 0.5 µl de ADN polimerasa (5 unidades/µl), 1 µl de ADN (10 ng) y 37,5 µl de agua estéril para ajustar a 50 µl, y después de calentar a 95 °C durante 5 minutos, un ciclo compuesto de reacciones a 95 °C durante 30 segundos, a 53 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 1 minuto se repitió 30 veces y se realizó una reacción a 72 °C durante 5 minutos. Los productos resultantes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, y se confirmó visualmente que se amplificaron fragmentos de ADN de aproximadamente 0,2, 1,4 y 1,0 kbp.

(3) Análisis de secuencias de nucleótidos de ADN

Los fragmentos de ADN amplificados se insertaron en un vector pGEM-T Eazy (Promega), y las muestras se prepararon mediante un procedimiento didesoxi, usando un cebador M13 marcado fluorescente (Nisshinbo Industries Inc.) y un kit de secuenciación disponible comercialmente (Kit de Secuenciación del Ciclo de Cebador Etiquetado Fluorescente Thermo Sequence con 7-deaza-dGTP; amersham farmacia bitech), y las secuencias de nucleótidos se determinaron usando un secuenciador de ADN (secuenciador de ADN modelo 4000; LI-COR). DE acuerdo con este análisis, los fragmentos de ADN amplificados por PCR contenían marcos de lectura abiertos que constaban de 249 pb (ppa1), 1356 pb (ppa2) y 996 pb (ppars1), respectivamente (SEQ ID NO: 1, 3 y 5). Las proteínas predichas a partir de estos ORF tenían 89, 462 y 341 residuos de aminoácidos.

Ejemplo 2: Preparación del gen ppa1 modificado, el gen ppa2 y el gen ppars1 en función del uso de codones en la platija japonesa

(1) Preparación de genes artificiales usando secuencias modificadas

Hay varios codones que especifican un aminoácido en cualquier especie, y los usos de los codones del mismo son diferentes entre sí. Un gen ppa1 (SEQ ID NO: 7), un gen ppa2 (SEQ ID NO: 9) y un gen ppars1 (SEQ ID NO: 11) en el que las secuencias de nucleótidos se modificaron con base en los usos del codón en *P. damselae subsp. piscicida* y platija japonesa se sintetizaron artificialmente y se insertaron en un plásmido.

Ejemplo 3: Preparación de plásmidos ppa1-salvaje, ppa2-salvaje, ppars1-salvaje, opt-ppa1, opt-ppa2 y opt-ppars1

Los plásmidos que se habían usado en el análisis de secuencias de nucleótidos de ADN en los Ejemplos 1(3) y 2(1) se trataron con EcoRI y XhoI. El gen ppa1, el gen ppa2 y el gen ppars1 derivado de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02, y el gen ppa1 artificial, el gen ppa2 artificial y el gen ppars1 artificial, que se extirparon de cada vector, se insertaron entre los sitios de reconocimiento EcoRI y XhoI de un sitio de clonación múltiple en dirección 3' de una secuencia que codifica una región del promotor de citomegalovirus humano de un vector pcDNA3.1/myc-his (Invitrogen), para preparar plásmidos ppa1-salvaje, ppa2-salvaje, ppars1-salvaje, opt-ppa1, opt-ppa2 y opt-ppars1.

Ejemplo 4: Introducción de ADN plasmídicos a la platija japonesa

Los genes ppa1-salvaje, ppa2-salvaje, el ppars1-salvaje, opt-ppa1, opt-ppa2 y opt-ppars1 (10,0 µg/platija) se administraron en el músculo, junto con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS), usando una jeringa con una aguja 29G.

Ejemplo 5: Prueba de protección contra infección en platija japonesa

Se usaron platijas japonesas jóvenes (longitud total: aproximadamente 8 cm, peso medio de pescado: 10,0 g) en cada grupo de prueba. Los peces de prueba fueron criados a una temperatura promedio de agua de 19.0 °C en un baño de agua de 60 l mientras circulaba agua de mar artificial.

De acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 4, se administraron por separado 10,0 µg de ppa1-salvaje, ppa2-salvaje, ppars1-salvaje, opt-ppa1, opt-ppa2 y opt-ppars1 a la platija. Como controles, se administraron por separado 100 µl de PBS y 10,0 µg del vector pcDNA3.1. Después de 30 días de la administración, se obtuvo un medio de cultivo al cultivar *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02 en el medio líquido HI suplementado con NaCl al 2%, de manera similar a la del Ejemplo 1(2), se diluyó a $1,0 \times 10^5$ ufc/ml usando agua de mar artificial y se llevó a cabo una infección por inmersión durante 30 minutos. Los grupos de prueba en los que se realizó una prueba de protección contra la infección fueron los siguientes:

Grupo de prueba 1: ppa1-salvaje 10,0 µg/platija + $1,0 \times 10^5$ ufc/ml de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02

Grupo de Prueba Comparativa 2: ppa2-salvaje 10,0 µg/platija + $1,0 \times 10^5$ ufc/ml de *P. damselae subsp.*

piscicida cepa TUMSAT-PPE05-02

Grupo de Prueba Comparativa 3: ppars1-salvaje 10,0 µg/platija + 1,0×10⁵ ufc/ml de *P. damselae subsp.*

piscicida cepa TUMSAT-PPE05-02

Grupo de prueba 4: opt-ppa1 10,0 µg/platija + 1,0×10⁵ ufc/ml de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02

Grupo de Prueba Comparativa 5: opt-ppa2 10,0 µg/platija + 1,0×10⁵ ufc/ml de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02

Grupo de Prueba Comparativa 6: opt-ppars1 10,0 pg/platija + 1,0×10⁵ ufc/ml de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02

Grupo de prueba 7: vector pcDNA3.1/myc-his 10,0 µg/platija + 1,0×10⁵ ufc/ml de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02

Grupo de prueba 8: PBS 100 µl/platija + 1,0×10⁵ ufc/ml de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02

Después de la infección de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02, se observaron las platijas durante 14 días y se calculó "una tasa de mortalidad acumulativa de platijas (población de muerte/población de prueba) × 100 (%)" en los grupos de prueba 1 a 8. Los resultados se muestran en las Figuras 1, 2, 3 y 4, y en la Tabla 1. "RPS" en la Tabla es una abreviatura de "supervivencia porcentual relativa", y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$RPS = \{1 - (X/C)\} \times 100$$

[El símbolo "X" es "una tasa de mortalidad en cada grupo de vacunación (%)", y "C" es "una tasa de mortalidad en el grupo de control negativo"]

Los efectos de las vacunas se evaluaron por comparación.

Como resultado, las tasas de mortalidad en los grupos de prueba 1 a 6 fueron respectivamente de aproximadamente 17%, 8%, 58%, 8%, 17% y 15%, mientras que las de los grupos de prueba 7 y 8 fueron de 75% y 90% y, por lo tanto, se reveló que los genes ppa1-salvaje, ppa2-salvaje, ppars1-salvaje, opt-ppa1, opt-ppa2 y opt-ppars1 fueron eficaces en la protección contra la infección de *P. damselae subsp. piscicida* cepa TUMSAT-PPE05-02, es decir, se revelaron los efectos de la vacuna.

Tabla 1

Grupo de Prueba	Tasa de mortalidad acumulativa (%)	RPS contra el Grupo de Prueba 8
1 ppa1-salvaje	16,7	81,9
2 * ppa2-salvaje	8,33	91
3 * ppars1-salvaje	58,3	36,8
4 opt-ppa1	8,33	91
5 * opt-ppa2	16,7	81,9
6 * opt-ppars1	15,4	83,3
7 Vector	75	18,7
8 PBS	92,3	-
* comparativo		

Aplicabilidad industrial

La vacuna de ADN de la presente invención se puede aplicar para la prevención de pseudotuberculosis en peces marinos.

Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a realizaciones específicas, diversos cambios y modificaciones obvios para los expertos en la materia son posibles sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Texto libre en el listado de secuencias

Las características de la "Secuencia Artificial" se describen en el identificador numérico <223> en el Listado de Secuencias. Más particularmente, las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, 9 y 11 son secuencias modificadas derivadas de *P. damselae subsp. piscicida*. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13 es el cebador ppa1-directo. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 14 es el cebador ppa1-inverso. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15 es el cebador ppa2-directo. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16 es el cebador ppa2-inverso. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17 es el cebador ppars1-directo. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 18 es el cebador ppars1-inverso.

Listado de secuencias

<110> National University Corporation Tokyo University of Marine Science and Technology

5 <120> Vacuna de ADN para pseudotuberculosis de peces marinos

<130> KYD-918

10 <150> JP 2012-198719
<151> 2012-09-10

<160> 18

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 303
<212> ADN
<213> Photobacterium damsela subsp. piscicida

20 <220>
<221> CDS
<222> (19)..(288)

25 <400> 1

30 agtgtggtgg aattcacc atg aat cgt aaa gta act atc cta gct ggt gtt 51
Met Asn Arg Lys Val Thr Ile Leu Ala Gly Val
1 5 10

35 att cta agt gca act cta atg ggt tgt tca agc tca agc gaa atg cag 99
Ile Leu Ser Ala Thr Leu Met Gly Cys Ser Ser Ser Ser Glu Met Gln
15 20 25

40 caa cta act aac aaa gtt gac gca ctt tct gat caa gta agc gct cta 147
Gln Leu Thr Asn Lys Val Asp Ala Leu Ser Asp Gln Val Ser Ala Leu
30 35 40

45 caa gcc aac aga tca act agt ggc gct gtt aac gac gct cgt gca gca 195
Gln Ala Asn Arg Ser Thr Ser Gly Ala Val Asn Asp Ala Arg Ala Ala
45 50 55

50 tct gac gca gct tac caa gaa gca atg cgt gct aac cag cgc atc gac 243
Ser Asp Ala Ala Tyr Gln Glu Ala Met Arg Ala Asn Gln Arg Ile Asp
60 65 70 75

55 aac atc cgt ggt tct tac act aag cat cat cac cat cac cac tag 288
Asn Ile Arg Gly Ser Tyr Thr Lys His His His His His His
80 85

60 ctcgagtcta gaggg 303

<210> 2
<211> 89
<212> PRT
<213> Photobacterium damsela subsp. piscicida

<400> 2

65

ES 2 809 216 T3

	Met	Asn	Arg	Lys	Val	Thr	Ile	Leu	Ala	Gly	Val	Ile	Leu	Ser	Ala	Thr	
	1				5					10					15		
5	Leu	Met	Gly	Cys	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Met	Gln	Gln	Leu	Thr	Asn	Lys	
				20					25					30			
10	Val	Asp	Ala	Leu	Ser	Asp	Gln	Val	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Asn	Arg	Ser	
			35					40					45				
15	Thr	Ser	Gly	Ala	Val	Asn	Asp	Ala	Arg	Ala	Ala	Ser	Asp	Ala	Ala	Tyr	
		50					55					60					
20	Gln	Glu	Ala	Met	Arg	Ala	Asn	Gln	Arg	Ile	Asp	Asn	Ile	Arg	Gly	Ser	
	65					70					75					80	
25	Tyr	Thr	Lys	His	His	His	His	His	His								
					85												
	<210>	3															
	<211>	1419															
	<212>	ADN															
	<213>	Photobacterium	damselae	subsp.	piscicida												
	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(19)..(1404)															
	<400>	3															
35	agtg	tggt	gg	aattc	acc	atg	aga	aaa	cct	ctg	ctt	gtt	tta	agt	gca	ctg	51
						Met	Arg	Lys	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Ala	Leu	
						1				5					10		
40	gct	tta	ggt	att	agt	tca	gtt	gtc	acc	ccg	atg	acg	gca	act	gcg	gcg	99
	Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Pro	Met	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	
				15					20					25			
45	tta	cct	acc	gcc	ggt	aat	aat	caa	caa	gta	cct	agc	ctt	gcg	cca	atg	147
	Leu	Pro	Thr	Ala	Val	Asn	Asn	Gln	Gln	Val	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Met	
			30					35					40				
50	ctt	gag	caa	gta	aca	cca	gct	gta	gta	agc	att	gca	ggt	gaa	ggt	aaa	195
	Leu	Glu	Gln	Val	Thr	Pro	Ala	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Val	Glu	Gly	Lys	
		45					50					55					
55	cac	ggt	tcc	aaa	cag	cg	cta	cct	gag	gct	tat	cg	ttt	ttc	ttt	ggt	243
	His	Val	Ser	Lys	Gln	Arg	Leu	Pro	Glu	Ala	Tyr	Arg	Phe	Phe	Phe	Gly	
	60					65					70					75	
60	cca	gat	ttt	cct	acc	gag	caa	gta	cga	gaa	caa	cca	ttt	agg	ggg	tta	291
	Pro	Asp	Phe	Pro	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Glu	Gln	Pro	Phe	Arg	Gly	Leu	
					80					85					90		
65	ggc	tcg	ggg	ggt	atc	att	gac	gct	aaa	aaa	ggg	tat	gtc	ggt	acc	aat	339
	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr	Asn	
				95					100					105			
65	aac	cat	ggt	att	gat	ggc	gca	gat	acc	atc	aaa	gta	cag	ctt	tct	gac	387
	Asn	His	Val	Ile	Asp	Gly	Ala	Asp	Thr	Ile	Lys	Val	Gln	Leu	Ser	Asp	

ES 2 809 216 T3

	110	115	120	
5	gga cgt gag Gly Arg Glu 125	ata aaa gca aag ctg ctt ggt acc gat Ile Lys Ala Lys Leu Leu Gly Thr Asp Lys 130	Met Ser Asp 135	435
10	att gcg ttg ctg caa tta gaa gat gcc aaa gat ctt acg gct atc aaa Ile Ala Leu Leu Gln Leu Glu Asp Ala Lys Asp Leu Thr Ala Ile Lys 140 145 150 155			483
15	ctc gct gat tct gat aat ctt cgc gta ggc gat ttc gcc gtt gct atc Leu Ala Asp Ser Asp Asn Leu Arg Val Gly Asp Phe Ala Val Ala Ile 160 165 170			531
20	ggt aac cca ttt ggc cta gga caa aca gta aca tca ggt att gtt tcc Gly Asn Pro Phe Gly Leu Gly Gln Thr Val Thr Ser Gly Ile Val Ser 175 180 185			579
25	gct ctt ggt cgt agt ggt tta aat atc gag aac ttc gaa aac ttt atc Ala Leu Gly Arg Ser Gly Leu Asn Ile Glu Asn Phe Glu Asn Phe Ile 190 195 200			627
30	caa act gat gcg cca atc aat agc ggt aac tca ggt ggt gcc tta gta Gln Thr Asp Ala Pro Ile Asn Ser Gly Asn Ser Gly Gly Ala Leu Val 205 210 215			675
35	aac tta aac ggt gag ttg att ggt att aat acc gcg att ctt gcg cct Asn Leu Asn Gly Glu Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Leu Ala Pro 220 225 230 235			723
40	aac ggt ggt aac gtc ggt atc ggt ttt gca atc cct gct aat atg gtg Asn Gly Gly Asn Val Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ala Asn Met Val 240 245 250			771
45	aaa aac tta aca gat caa ctt atc gaa ttt ggt caa gtt aag cgc ggt Lys Asn Leu Thr Asp Gln Leu Ile Glu Phe Gly Gln Val Lys Arg Gly 255 260 265			819
50	ggt ctg ggt gtt act ggt ggt gag cta acc tct gag cta gct gaa acc Val Leu Gly Val Thr Gly Gly Glu Leu Thr Ser Glu Leu Ala Glu Thr 270 275 280			867
55	ttt ggt tat aaa aca aat cac ggc gcg ttt gta aac caa gta ctt cct Phe Gly Tyr Lys Thr Asn His Gly Ala Phe Val Asn Gln Val Leu Pro 285 290 295			915
60	gaa ggc tct gcg gca aaa gca ggt cta aaa gca ggt gat att att gtt Glu Gly Ser Ala Ala Lys Ala Gly Leu Lys Ala Gly Asp Ile Ile Val 300 305 310 315			963
65	tca gtc aat aat aag ccg att cgt act ttc agt gaa tta cgc gca aaa Ser Val Asn Asn Lys Pro Ile Arg Thr Phe Ser Glu Leu Arg Ala Lys 320 325 330			1011
70	att gta act cta ggt gct ggt aag aaa gta aca cta ggc cta att cgc Ile Val Thr Leu Gly Ala Gly Lys Lys Val Thr Leu Gly Leu Ile Arg 335 340 345			1059
75	gat ggt aaa gag ctg aat gtt cct gtg act tta gaa gca gca aaa cag Asp Gly Lys Glu Leu Asn Val Pro Val Thr Leu Glu Ala Ala Lys Gln 350 355 360			1107
80	act caa gtt aaa gct gat gat ctg cat gaa agc tta gcc ggt gct gaa			1155

ES 2 809 216 T3

	Thr	Gln	Val	Lys	Ala	Asp	Asp	Leu	His	Glu	Ser	Leu	Ala	Gly	Ala	Glu	
		365						370				375					
5	ttt	gct	aat	act	agc	cca	gaa	gat	aaa	ggt	cac	gga	ggt	aaa	gta	acc	1203
	Phe	Ala	Asn	Thr	Ser	Pro	Glu	Asp	Lys	Val	His	Gly	Val	Lys	Val	Thr	
	380					385				390					395		
10	gag	ctg	aac	aag	caa	tct	att	gcg	gct	cgc	tat	ggc	ttg	aag	aag	ggc	1251
	Glu	Leu	Asn	Lys	Gln	Ser	Ile	Ala	Ala	Arg	Tyr	Gly	Leu	Lys	Lys	Gly	
					400					405					410		
15	gat	atc	att	att	ggt	cta	aac	cgt	cag	cca	att	aaa	aac	ctt	ggc	gaa	1299
	Asp	Ile	Ile	Ile	Gly	Leu	Asn	Arg	Gln	Pro	Ile	Lys	Asn	Leu	Gly	Glu	
					415				420					425			
20	ctt	cgt	aag	gcg	ctt	gag	aaa	aaa	cca	aac	gta	ctt	gca	atg	gaa	ggt	1347
	Leu	Arg	Lys	Ala	Leu	Glu	Lys	Lys	Pro	Asn	Val	Leu	Ala	Met	Glu	Val	
			430					435					440				
25	aaa	cgt	ggt	gat	agc	gta	ctg	tat	tta	atc	atg	cgt	cat	cat	cac	cat	1395
	Lys	Arg	Gly	Asp	Ser	Val	Leu	Tyr	Leu	Ile	Met	Arg	His	His	His	His	
			445				450					455					
30	cac	cac	tag	ctc	gagtcta	gaggg											1419
	His	His															
	460																
	<210>	4															
	<211>	461															
	<212>	PRT															
	<213>	Photobacterium	damselae	subsp.	piscicida												
	<400>	4															
35	Met	Arg	Lys	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	
	1				5					10					15		
40	Ser	Val	Val	Thr	Pro	Met	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Pro	Thr	Ala	Val	
				20					25					30			
45	Asn	Asn	Gln	Gln	Val	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Met	Leu	Glu	Gln	Val	Thr	
			35					40					45				
50	Pro	Ala	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Val	Glu	Gly	Lys	His	Val	Ser	Lys	Gln	
		50					55					60					
55	Arg	Leu	Pro	Glu	Ala	Tyr	Arg	Phe	Phe	Phe	Gly	Pro	Asp	Phe	Pro	Thr	
	65					70					75					80	
60	Glu	Gln	Val	Arg	Glu	Gln	Pro	Phe	Arg	Gly	Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	
					85					90					95		
65	Ile	Asp	Ala	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr	Asn	Asn	His	Val	Ile	Asp	
				100					105					110			

ES 2 809 216 T3

Gly Ala Asp Thr Ile Lys Val Gln Leu Ser Asp Gly Arg Glu Ile Lys
 115 120 125
 5 Ala Lys Leu Leu Gly Thr Asp Lys Met Ser Asp Ile Ala Leu Leu Gln
 130 135 140
 10 Leu Glu Asp Ala Lys Asp Leu Thr Ala Ile Lys Leu Ala Asp Ser Asp
 145 150 155 160
 15 Asn Leu Arg Val Gly Asp Phe Ala Val Ala Ile Gly Asn Pro Phe Gly
 165 170 175
 20 Leu Gly Gln Thr Val Thr Ser Gly Ile Val Ser Ala Leu Gly Arg Ser
 180 185 190
 25 Gly Leu Asn Ile Glu Asn Phe Glu Asn Phe Ile Gln Thr Asp Ala Pro
 195 200 205
 30 Ile Asn Ser Gly Asn Ser Gly Gly Ala Leu Val Asn Leu Asn Gly Glu
 210 215 220
 35 Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ala Asn Met Val Lys Asn Leu Thr Asp
 245 250 255
 40 Gln Leu Ile Glu Phe Gly Gln Val Lys Arg Gly Val Leu Gly Val Thr
 260 265 270
 45 Gly Gly Glu Leu Thr Ser Glu Leu Ala Glu Thr Phe Gly Tyr Lys Thr
 275 280 285
 50 Asn His Gly Ala Phe Val Asn Gln Val Leu Pro Glu Gly Ser Ala Ala
 290 295 300
 55 Lys Ala Gly Leu Lys Ala Gly Asp Ile Ile Val Ser Val Asn Asn Lys
 305 310 315 320
 60 Pro Ile Arg Thr Phe Ser Glu Leu Arg Ala Lys Ile Val Thr Leu Gly
 325 330 335
 65 Ala Gly Lys Lys Val Thr Leu Gly Leu Ile Arg Asp Gly Lys Glu Leu
 340 345 350
 Asn Val Pro Val Thr Leu Glu Ala Ala Lys Gln Thr Gln Val Lys Ala
 355 360 365

ES 2 809 216 T3

Asp Asp Leu His Glu Ser Leu Ala Gly Ala Glu Phe Ala Asn Thr Ser
 370 375 380

5
 Pro Glu Asp Lys Val His Gly Val Lys Val Thr Glu Leu Asn Lys Gln
 385 390 395 400

10
 Ser Ile Ala Ala Arg Tyr Gly Leu Lys Lys Gly Asp Ile Ile Ile Gly
 405 410 415

15
 Leu Asn Arg Gln Pro Ile Lys Asn Leu Gly Glu Leu Arg Lys Ala Leu
 420 425 430

20
 Glu Lys Lys Pro Asn Val Leu Ala Met Glu Val Lys Arg Gly Asp Ser
 435 440 445

25
 Val Leu Tyr Leu Ile Met Arg His His His His His His
 450 455 460

<210> 5
 <211> 1059
 <212> ADN
 <213> Photobacterium damsela subsp. piscicida

30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (19)..(1044)

35
 <400> 5

agtgtggtgg aattcacc atg tct aaa gtt cgt tat gtt ctt ccg ttg gca 51
 Met Ser Lys Val Arg Tyr Val Leu Pro Leu Ala
 1 5 10

40
 ctt cta att tca ggt gtc gct aac gca gca gca gat aac cca tgg tat 99
 Leu Leu Ile Ser Gly Val Ala Asn Ala Ala Ala Asp Asn Pro Trp Tyr
 15 20 25

45
 gcg ggt ttc cga gtt ggt gct act cac tat aat gat att tct gta aat 147
 Ala Gly Phe Arg Val Gly Ala Thr His Tyr Asn Asp Ile Ser Val Asn
 30 35 40

50
 ggt gtg gac agt aat tct aca ttt gac cgc gat gat atg ggc ggt ggt 195
 Gly Val Asp Ser Asn Ser Thr Phe Asp Arg Asp Asp Met Gly Gly Gly
 45 50 55

55
 ttg ttt gca ggt tac aac gta act cct tgg ttc gcg gtt gaa act ggc 243
 Leu Phe Ala Gly Tyr Asn Val Thr Pro Trp Phe Ala Val Glu Thr Gly
 60 65 70 75

60
 tac act tgg cta ggc cgt gct gag ttt gat aat aac tac aaa atg cga 291
 Tyr Thr Trp Leu Gly Arg Ala Glu Phe Asp Asn Asn Tyr Lys Met Arg
 80 85 90

65
 gtt gat cag caa gcg atc gat ctt gtt ggt aaa ttt aca tgg cat gca 339
 Val Asp Gln Gln Ala Ile Asp Leu Val Gly Lys Phe Thr Trp His Ala
 95 100 105

ES 2 809 216 T3

	aca gac tat atg ggt ctt tat gcg aaa ctg ggt ggt gca tac tac ttc	387
	Thr Asp Tyr Met Gly Leu Tyr Ala Lys Leu Gly Gly Ala Tyr Tyr Phe	
	110 115 120	
5	tca gag gcg aaa ggt ttt ggt gca gcc aaa tat aaa gat gat ggt gta	435
	Ser Glu Ala Lys Gly Phe Gly Ala Ala Lys Tyr Lys Asp Asp Gly Val	
	125 130 135	
10	ggt ggt act gca ggt gca ggt ctt gag ttc ttc tta gat gat cat ctt	483
	Val Gly Thr Ala Gly Ala Gly Leu Glu Phe Phe Leu Asp Asp His Leu	
	140 145 150 155	
15	tct gct cgt cta gaa tat cag tac tac cat gat gta gaa cta aaa gac	531
	Ser Ala Arg Leu Glu Tyr Gln Tyr Tyr His Asp Val Glu Leu Lys Asp	
	160 165 170	
20	aaa gat gtt cgc gca aat tgg gac act cac ttc tat ggt cta agc cta	579
	Lys Asp Val Arg Ala Asn Trp Asp Thr His Phe Tyr Gly Leu Ser Leu	
	175 180 185	
25	gta tat agc tgg ggc gct cca gag cca gtt gca gaa cct gta tat gta	627
	Val Tyr Ser Trp Gly Ala Pro Glu Pro Val Ala Glu Pro Val Tyr Val	
	190 195 200	
30	gat caa gtg tct gtt gcg act tta gaa gag ctt aaa ctg gcc gtt cca	675
	Asp Gln Val Ser Val Ala Thr Leu Glu Glu Leu Lys Leu Ala Val Pro	
	205 210 215	
35	ttt gcc ttt gat agc tca tca att tct gca ggt gat gca gct aag cta	723
	Phe Ala Phe Asp Ser Ser Ser Ile Ser Ala Gly Asp Ala Ala Lys Leu	
	220 225 230 235	
40	gtt cca ttt gag cag cgt cta caa gag caa gat gca gca caa atc tat	771
	Val Pro Phe Glu Gln Arg Leu Gln Glu Gln Asp Ala Ala Gln Ile Tyr	
	240 245 250	
45	gtt gtt ggt tat acc gat agc aaa ggt tct gaa gct tac aac cag aaa	819
	Val Val Gly Tyr Thr Asp Ser Lys Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Lys	
	255 260 265	
50	ctg tct gag cgt cgt gca gat gct gtg gct gat gcg ctt cgt gca cat	867
	Leu Ser Glu Arg Arg Ala Asp Ala Val Ala Asp Ala Leu Arg Ala His	
	270 275 280	
55	cta aat gtt gat ggt tct cgt att att gct gaa ggc cgt ggt gaa gca	915
	Leu Asn Val Asp Gly Ser Arg Ile Ile Ala Glu Gly Arg Gly Glu Ala	
	285 290 295	
60	gat cca gtt gct tct aac caa aca gaa gaa ggt cgc gca cag aac cgt	963
	Asp Pro Val Ala Ser Asn Gln Thr Glu Glu Gly Arg Ala Gln Asn Arg	
	300 305 310 315	
65	cgt gtt gag atc gtt tct cct tca atc gat att gaa aca gta act caa	1011
	Arg Val Glu Ile Val Ser Pro Ser Ile Asp Ile Glu Thr Val Thr Gln	
	320 325 330	
65	gtt ctt gct gaa cat cat cac cat cac cac tag ctcgagtcta gaggg	1059
	Val Leu Ala Glu His His His His His His	
	335 340	
	<210> 6	
	<211> 341	
	<212> PRT	
	<213> Photobacterium damsela subsp. piscicida	

ES 2 809 216 T3

<400> 6

5 Met Ser Lys Val Arg Tyr Val Leu Pro Leu Ala Leu Leu Ile Ser Gly
1 5 10 15

10 Val Ala Asn Ala Ala Ala Asp Asn Pro Trp Tyr Ala Gly Phe Arg Val
20 25 30

15 Gly Ala Thr His Tyr Asn Asp Ile Ser Val Asn Gly Val Asp Ser Asn
35 40 45

20 Ser Thr Phe Asp Arg Asp Asp Met Gly Gly Gly Leu Phe Ala Gly Tyr
50 55 60

25 Asn Val Thr Pro Trp Phe Ala Val Glu Thr Gly Tyr Thr Trp Leu Gly
65 70 75 80

30 Arg Ala Glu Phe Asp Asn Asn Tyr Lys Met Arg Val Asp Gln Gln Ala
85 90 95

35 Ile Asp Leu Val Gly Lys Phe Thr Trp His Ala Thr Asp Tyr Met Gly
100 105 110

40 Leu Tyr Ala Lys Leu Gly Gly Ala Tyr Tyr Phe Ser Glu Ala Lys Gly
115 120 125

45 Phe Gly Ala Ala Lys Tyr Lys Asp Asp Gly Val Val Gly Thr Ala Gly
130 135 140

50 Ala Gly Leu Glu Phe Phe Leu Asp Asp His Leu Ser Ala Arg Leu Glu
145 150 155 160

55 Tyr Gln Tyr Tyr His Asp Val Glu Leu Lys Asp Lys Asp Val Arg Ala
165 170 175

60 Asn Trp Asp Thr His Phe Tyr Gly Leu Ser Leu Val Tyr Ser Trp Gly
180 185 190

65 Ala Pro Glu Pro Val Ala Glu Pro Val Tyr Val Asp Gln Val Ser Val
195 200 205

Ala Thr Leu Glu Glu Leu Lys Leu Ala Val Pro Phe Ala Phe Asp Ser
210 215 220

Ser Ser Ile Ser Ala Gly Asp Ala Ala Lys Leu Val Pro Phe Glu Gln

ES 2 809 216 T3

	225				230					235					240	
5	Arg	Leu	Gln	Glu	Gln	Asp	Ala	Ala	Gln	Ile	Tyr	Val	Val	Gly	Tyr	Thr
					245					250					255	
10	Asp	Ser	Lys	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Leu	Ser	Glu	Arg	Arg
				260					265					270		
15	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Arg	Ala	His	Leu	Asn	Val	Asp	Gly
			275					280					285			
20	Ser	Arg	Ile	Ile	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Asp	Pro	Val	Ala	Ser
	290						295					300				
25	Asn	Gln	Thr	Glu	Glu	Gly	Arg	Ala	Gln	Asn	Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Val
	305					310					315					320
30	Ser	Pro	Ser	Ile	Asp	Ile	Glu	Thr	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Ala	Glu	His
				325						330					335	
35	His	His	His	His	His											
				340												
	<210>	7														
	<211>	303														
	<212>	ADN														
	<213>	secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	modificado de P. damselae subsp. piscicida														
40	<220>															
	<221>	CDS														
	<222>	(19)..(288)														
45	<400>	7														
50																
55																
60																
65																

ES 2 809 216 T3

<223> modificado de P. damselae subsp. piscicida

<220>

<221> CDS

5 <222> (16)..(1401)

<400> 9

10 agtgtggtgg aattc atg aga aaa cct ctg ctg gtt ctg agt gca ctg gct 51
 Met Arg Lys Pro Leu Leu Val Leu Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

15 ctg ggt att agt tca gtt gtc acc ccc atg acc gca act gct gct ctg 99
 Leu Gly Ile Ser Ser Val Val Thr Pro Met Thr Ala Thr Ala Ala Leu
 15 20 25

cct acc gcc gtt aat aat cag cag gtg cct agc ctg gct cca atg ctg 147

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 809 216 T3

	Pro	Thr	Ala	Val	Asn	Asn	Gln	Gln	Val	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Met	Leu	
		30					35					40					
5	gag	cag	gtg	aca	cca	gct	gtg	gtg	agc	att	gca	gtt	gaa	ggt	aaa	cac	195
	Glu	Gln	Val	Thr	Pro	Ala	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Val	Glu	Gly	Lys	His	
	45					50				55					60		
10	gtt	tcc	aaa	cag	cgc	ctg	cct	gag	gct	tat	cgc	ttt	ttc	ttt	ggt	cca	243
	Val	Ser	Lys	Gln	Arg	Leu	Pro	Glu	Ala	Tyr	Arg	Phe	Phe	Phe	Gly	Pro	
					65					70					75		
15	gat	ttt	cct	acc	gag	cag	gtg	cga	gaa	cag	cca	ttt	cgg	gga	ctg	ggc	291
	Asp	Phe	Pro	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Glu	Gln	Pro	Phe	Arg	Gly	Leu	Gly	
				80					85					90			
20	tct	gga	gtt	atc	att	gac	gct	aaa	aaa	gga	tat	gtc	gtt	acc	aat	aac	339
	Ser	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr	Asn	Asn	
			95					100					105				
25	cac	ggt	att	gat	ggc	gca	gat	acc	atc	aaa	gtg	cag	ctg	tct	gac	gga	387
	His	Val	Ile	Asp	Gly	Ala	Asp	Thr	Ile	Lys	Val	Gln	Leu	Ser	Asp	Gly	
		110					115					120					
30	cg	gag	atc	aaa	gca	aag	ctg	ctg	ggt	acc	gat	aaa	atg	tct	gat	att	435
	Arg	Glu	Ile	Lys	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Thr	Asp	Lys	Met	Ser	Asp	Ile	
	125					130					135					140	
35	gct	ctg	ctg	cag	ctg	gaa	gat	gcc	aaa	gat	ctg	acc	gct	atc	aaa	ctc	483
	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Ala	Lys	Asp	Leu	Thr	Ala	Ile	Lys	Leu	
					145						150					155	
40	gct	gat	tct	gat	aat	ctg	cg	gtg	ggc	gat	ttc	gcc	ggt	gct	atc	ggt	531
	Ala	Asp	Ser	Asp	Asn	Leu	Arg	Val	Gly	Asp	Phe	Ala	Val	Ala	Ile	Gly	
				160					165					170			
45	aac	cca	ttt	ggc	ctg	gga	cag	aca	gtg	aca	tca	ggt	att	ggt	tcc	gct	579
	Asn	Pro	Phe	Gly	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Thr	Ser	Gly	Ile	Val	Ser	Ala	
			175					180					185				
50	ctg	ggt	cg	agt	ggt	ctg	aat	atc	gag	aac	ttc	gaa	aac	ttt	atc	cag	627
	Leu	Gly	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Ile	Glu	Asn	Phe	Glu	Asn	Phe	Ile	Gln	
		190					195					200					
55	act	gat	gct	cca	atc	aat	agc	ggt	aac	tca	ggt	ggt	gcc	ctg	gtg	aac	675
	Thr	Asp	Ala	Pro	Ile	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Asn	
		205				210					215					220	
60	ctg	aac	ggt	gag	ctg	att	ggt	att	aat	acc	gct	att	ctg	gct	cct	aac	723
	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Ile	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Pro	Asn	
					225					230					235		
65	ggt	ggt	aac	gtc	ggt	atc	ggt	ttt	gca	atc	cct	gct	aat	atg	gtg	aaa	771
	Gly	Gly	Asn	Val	Gly	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Pro	Ala	Asn	Met	Val	Lys	
				240					245					250			
70	aac	ctg	aca	gat	cag	ctg	atc	gaa	ttt	ggt	cag	ggt	aag	cg	ggt	ggt	819
	Asn	Leu	Thr	Asp	Gln	Leu	Ile	Glu	Phe	Gly	Gln	Val	Lys	Arg	Gly	Val	
			255					260					265				
75	ctg	ggt	ggt	act	ggt	ggt	gag	ctg	acc	tct	gag	ctg	gct	gaa	acc	ttt	867
	Leu	Gly	Val	Thr	Gly	Gly	Glu	Leu	Thr	Ser	Glu	Leu	Ala	Glu	Thr	Phe	
		270					275					280					

ES 2 809 216 T3

ggt tat aaa aca aat cac ggc gct ttt gtg aac cag gtg ctg cct gaa 915
 Gly Tyr Lys Thr Asn His Gly Ala Phe Val Asn Gln Val Leu Pro Glu
 285 290 295 300

5 ggc tct gct gca aaa gca ggt ctg aaa gca ggt gat att att gtt tca 963
 Gly Ser Ala Ala Lys Ala Gly Leu Lys Ala Gly Asp Ile Ile Val Ser
 305 310 315

10 gtc aat aat aag ccc att cgt act ttc agt gaa ctg cgc gca aaa att 1011
 Val Asn Asn Lys Pro Ile Arg Thr Phe Ser Glu Leu Arg Ala Lys Ile
 320 325 330

15 gtg act ctg ggt gct ggt aag aaa gtg aca ctg ggc ctg att cgc gat 1059
 Val Thr Leu Gly Ala Gly Lys Lys Val Thr Leu Gly Leu Ile Arg Asp
 335 340 345

20 ggt aaa gag ctg aat gtt cct gtg act ctg gaa gca gca aaa cag act 1107
 Gly Lys Glu Leu Asn Val Pro Val Thr Leu Glu Ala Ala Lys Gln Thr
 350 355 360

25 cag gtt aaa gct gat gat ctg cac gaa agc ctg gcc ggt gct gaa ttt 1155
 Gln Val Lys Ala Asp Asp Leu His Glu Ser Leu Ala Gly Ala Glu Phe
 365 370 375 380

30 gct aat act agc cca gaa gat aaa gtt cac gga gtt aaa gtg acc gag 1203
 Ala Asn Thr Ser Pro Glu Asp Lys Val His Gly Val Lys Val Thr Glu
 385 390 395

35 ctg aac aag cag tct att gct gct cgc tat ggc ctg aag aag ggc gat 1251
 Leu Asn Lys Gln Ser Ile Ala Ala Arg Tyr Gly Leu Lys Lys Gly Asp
 400 405 410

40 atc att att ggt ctg aac cgt cag cca att aaa aac ctg ggc gaa ctg 1299
 Ile Ile Ile Gly Leu Asn Arg Gln Pro Ile Lys Asn Leu Gly Glu Leu
 415 420 425

45 cgt aag gct ctg gag aaa aaa cca aac gtg ctg gca atg gaa gtt aaa 1347
 Arg Lys Ala Leu Glu Lys Lys Pro Asn Val Leu Ala Met Glu Val Lys
 430 435 440

50 cgt ggt gat agc gtg ctg tat ctg atc atg cgt cat cat cac cat cac 1395
 Arg Gly Asp Ser Val Leu Tyr Leu Ile Met Arg His His His His His
 445 450 455 460

55 cac tag ctcgagtcta gaggg 1416
 His

<210> 10
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Photobacterium damsela subsp. piscicida

<400> 10

55 Met Arg Lys Pro Leu Leu Val Leu Ser Ala Leu Ala Leu Gly Ile Ser
 1 5 10 15

60 Ser Val Val Thr Pro Met Thr Ala Thr Ala Ala Leu Pro Thr Ala Val
 20 25 30

65

ES 2 809 216 T3

	Asn	Asn	Gln	Gln	Val	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Met	Leu	Glu	Gln	Val	Thr
			35					40					45			
5	Pro	Ala	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Val	Glu	Gly	Lys	His	Val	Ser	Lys	Gln
	50						55					60				
10	Arg	Leu	Pro	Glu	Ala	Tyr	Arg	Phe	Phe	Phe	Gly	Pro	Asp	Phe	Pro	Thr
	65					70					75					80
15	Glu	Gln	Val	Arg	Glu	Gln	Pro	Phe	Arg	Gly	Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Ile
					85					90					95	
20	Ile	Asp	Ala	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr	Asn	Asn	His	Val	Ile	Asp
				100					105					110		
25	Gly	Ala	Asp	Thr	Ile	Lys	Val	Gln	Leu	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Ile	Lys
			115					120					125			
30	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Thr	Asp	Lys	Met	Ser	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln
		130					135					140				
35	Leu	Glu	Asp	Ala	Lys	Asp	Leu	Thr	Ala	Ile	Lys	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp
	145					150					155					160
40	Asn	Leu	Arg	Val	Gly	Asp	Phe	Ala	Val	Ala	Ile	Gly	Asn	Pro	Phe	Gly
					165					170					175	
45	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Thr	Ser	Gly	Ile	Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser
				180					185					190		
50	Gly	Leu	Asn	Ile	Glu	Asn	Phe	Glu	Asn	Phe	Ile	Gln	Thr	Asp	Ala	Pro
			195					200					205			
55	Ile	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Asn	Leu	Asn	Gly	Glu
		210					215					220				
60	Leu	Ile	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Pro	Asn	Gly	Gly	Asn	Val
	225					230					235					240
65	Gly	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Pro	Ala	Asn	Met	Val	Lys	Asn	Leu	Thr	Asp
				245						250					255	
70	Gln	Leu	Ile	Glu	Phe	Gly	Gln	Val	Lys	Arg	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Thr
				260					265					270		
75	Gly	Gly	Glu	Leu	Thr	Ser	Glu	Leu	Ala	Glu	Thr	Phe	Gly	Tyr	Lys	Thr
			275					280					285			

ES 2 809 216 T3

	Asn	His	Gly	Ala	Phe	Val	Asn	Gln	Val	Leu	Pro	Glu	Gly	Ser	Ala	Ala	
	290						295					300					
5	Lys	Ala	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Ser	Val	Asn	Asn	Lys	
	305					310					315					320	
10	Pro	Ile	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	Thr	Leu	Gly	
					325					330					335		
15	Ala	Gly	Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Gly	Leu	Ile	Arg	Asp	Gly	Lys	Glu	Leu	
				340					345					350			
20	Asn	Val	Pro	Val	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Gln	Thr	Gln	Val	Lys	Ala	
			355					360					365				
25	Asp	Asp	Leu	His	Glu	Ser	Leu	Ala	Gly	Ala	Glu	Phe	Ala	Asn	Thr	Ser	
	370						375					380					
30	Pro	Glu	Asp	Lys	Val	His	Gly	Val	Lys	Val	Thr	Glu	Leu	Asn	Lys	Gln	
	385					390					395					400	
35	Ser	Ile	Ala	Ala	Arg	Tyr	Gly	Leu	Lys	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Ile	Gly	
					405					410					415		
40	Leu	Asn	Arg	Gln	Pro	Ile	Lys	Asn	Leu	Gly	Glu	Leu	Arg	Lys	Ala	Leu	
				420					425					430			
45	Glu	Lys	Lys	Pro	Asn	Val	Leu	Ala	Met	Glu	Val	Lys	Arg	Gly	Asp	Ser	
			435					440					445				
50	Val	Leu	Tyr	Leu	Ile	Met	Arg	His	His	His	His	His	His				
	450						455						460				
55	<210>	11															
	<211>	1056															
	<212>	ADN															
	<213>	secuencia artificial															
60	<220>																
	<223>	modificado de P. damsela	subsp. piscicida														
65	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(16)..(1041)															
	<400>	11															
60	agtgtggtgg	aattc	atg	tct	aaa	gtt	cgt	tat	gtt	ctg	ccc	ctg	gca	ctg		51	
			Met	Ser	Lys	Val	Arg	Tyr	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu			
			1				5					10					

ES 2 809 216 T3

	ctg att tca ggt gtc gct aac gca gca gca gat aac cca tgg tat gct	99
	Leu Ile Ser Gly Val Ala Asn Ala Ala Ala Asp Asn Pro Trp Tyr Ala	
	15 20 25	
5	ggt ttc cga gtt ggt gct act cac tat aat gat att tct gtg aat ggt	147
	Gly Phe Arg Val Gly Ala Thr His Tyr Asn Asp Ile Ser Val Asn Gly	
	30 35 40	
10	gtg gac agt aat tct aca ttt gac cgc gat gat atg ggc ggt ggt ctg	195
	Val Asp Ser Asn Ser Thr Phe Asp Arg Asp Asp Met Gly Gly Gly Leu	
	45 50 55 60	
15	ttt gca ggt tac aac gtg act cct tgg ttc gct gtt gaa act ggc tac	243
	Phe Ala Gly Tyr Asn Val Thr Pro Trp Phe Ala Val Glu Thr Gly Tyr	
	65 70 75	
20	act tgg ctg ggc cgt gct gag ttt gat aat aac tac aaa atg cga gtt	291
	Thr Trp Leu Gly Arg Ala Glu Phe Asp Asn Asn Tyr Lys Met Arg Val	
	80 85 90	
25	gat cag cag gct atc gat ctg gtt ggt aaa ttt aca tgg cac gca aca	339
	Asp Gln Gln Ala Ile Asp Leu Val Gly Lys Phe Thr Trp His Ala Thr	
	95 100 105	
30	gac tat atg ggt ctg tat gct aaa ctg ggt ggt gca tac tac ttc tca	387
	Asp Tyr Met Gly Leu Tyr Ala Lys Leu Gly Gly Ala Tyr Tyr Phe Ser	
	110 115 120	
35	gag gct aaa ggt ttt ggt gca gcc aaa tat aaa gat gat ggt gtg gtt	435
	Glu Ala Lys Gly Phe Gly Ala Ala Lys Tyr Lys Asp Asp Gly Val Val	
	125 130 135 140	
40	ggt act gca ggt gca ggt ctg gag ttc ttc ctg gat gat cac ctg tct	483
	Gly Thr Ala Gly Ala Gly Leu Glu Phe Phe Leu Asp Asp His Leu Ser	
	145 150 155	
45	gct cgt ctg gaa tat cag tac tac cac gat gtg gaa ctg aaa gac aaa	531
	Ala Arg Leu Glu Tyr Gln Tyr Tyr His Asp Val Glu Leu Lys Asp Lys	
	160 165 170	
50	gat gtt cgc gca aat tgg gac act cac ttc tat ggt ctg agc ctg gtg	579
	Asp Val Arg Ala Asn Trp Asp Thr His Phe Tyr Gly Leu Ser Leu Val	
	175 180 185	
55	tat agc tgg ggc gct cca gag cca gtt gca gaa cct gtg tat gtg gat	627
	Tyr Ser Trp Gly Ala Pro Glu Pro Val Ala Glu Pro Val Tyr Val Asp	
	190 195 200	
60	cag gtg tct gtt gct act ctg gaa gag ctg aaa ctg gcc gtt cca ttt	675
	Gln Val Ser Val Ala Thr Leu Glu Glu Leu Lys Leu Ala Val Pro Phe	
	205 210 215 220	
65	gcc ttt gat agc tca tca att tct gca ggt gat gca gct aag ctg gtt	723
	Ala Phe Asp Ser Ser Ser Ile Ser Ala Gly Asp Ala Ala Lys Leu Val	
	225 230 235	
70	cca ttt gag cag cgt ctg cag gag cag gat gca gca cag atc tat gtt	771
	Pro Phe Glu Gln Arg Leu Gln Glu Gln Asp Ala Ala Gln Ile Tyr Val	
	240 245 250	
75	ggt ggt tat acc gat agc aaa ggt tct gaa gct tac aac cag aaa ctg	819
	Val Gly Tyr Thr Asp Ser Lys Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Lys Leu	

ES 2 809 216 T3

	130		135		140												
5	Ala 145	Gly	Leu	Glu	Phe 150	Phe	Leu	Asp	Asp	His	Leu 155	Ser	Ala	Arg	Leu	Glu 160	
10	Tyr	Gln	Tyr	Tyr	His 165	Asp	Val	Glu	Leu	Lys 170	Asp	Lys	Asp	Val	Arg 175	Ala	
15	Asn	Trp	Asp	Thr 180	His	Phe	Tyr	Gly	Leu 185	Ser	Leu	Val	Tyr	Ser 190	Trp	Gly	
20	Ala	Pro	Glu 195	Pro	Val	Ala	Glu	Pro 200	Val	Tyr	Val	Asp	Gln 205	Val	Ser	Val	
25	Ala	Thr 210	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys 215	Leu	Ala	Val	Pro	Phe 220	Ala	Phe	Asp	Ser	
30	Ser 225	Ser	Ile	Ser	Ala	Gly 230	Asp	Ala	Ala	Lys	Leu 235	Val	Pro	Phe	Glu	Gln 240	
35	Arg	Leu	Gln	Glu	Gln 245	Asp	Ala	Ala	Gln	Ile 250	Tyr	Val	Val	Gly	Tyr 255	Thr	
40	Asp	Ser	Lys	Gly 260	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn 265	Gln	Lys	Leu	Ser	Glu 270	Arg	Arg	
45	Ala	Asp	Ala 275	Val	Ala	Asp	Ala	Leu 280	Arg	Ala	His	Leu	Asn 285	Val	Asp	Gly	
50	Ser	Arg 290	Ile	Ile	Ala	Glu	Gly 295	Arg	Gly	Glu	Ala	Asp 300	Pro	Val	Ala	Ser	
55	Asn 305	Gln	Thr	Glu	Glu	Gly 310	Arg	Ala	Gln	Asn 315	Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Val 320	
60	Ser	Pro	Ser	Ile	Asp 325	Ile	Glu	Thr	Val	Thr 330	Gln	Val	Leu	Ala	Glu 335	His	
65	His	His	His	His	His 340												

<210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador ppa1-directo

ES 2 809 216 T3

<400> 13
 cggaattcac catgaatcgt aaagtaacta 30

5 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador ppa1-inverso

<400> 14
 ccgctcgagc ttagtgtaag aaccac 26

15 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador ppa2-directo

<400> 15
 cggaattcac catgagaaaa cctctgcttg 30

25 <210> 16
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador ppa2-inverso

<400> 16
 ccgctcgaga cgcatgatta aataca 26

35 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador ppars1-directo

45 <400> 17
 cggaattcac catgtctaaa gttcggtatg 30

<210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> ppars1-primer inverso

55 <400> 18
 ccgctcgagt tcagcaagaa cttgag 26

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna de ADN para peces, **caracterizada por:**

- 5 - impartir inmunidad contra la pseudotuberculosis causada por *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida*
 - que comprende, como ingrediente activo:

10 un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunogénico contra *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida*;
 un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos preparada modificando la secuencia basada en el uso de un codón en la platija japonesa; o
 un vector de expresión que comprende el ADN,

15 en la que el polipéptido inmunogénico es:

- (1) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
 (2) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; o
 20 (3) un polipéptido homólogo con inmunogenicidad contra *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida*, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; o
 un fragmento parcial inmunogénico de uno cualquiera de los polipéptidos (1) a (3), por medio del cual la longitud del fragmento parcial no está limitada, siempre que un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos parcial pueda inducir inmunidad, incluyendo inmunidad humoral e
 25 inmunidad celular, contra *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida* en el cuerpo vivo.

2. La vacuna de ADN para peces de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia de nucleótidos es:

- 30 (1) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 7; o
 (2) una secuencia de nucleótidos que tiene una homología del 80% o más con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 7, y que codifica un polipéptido con inmunogenicidad contra *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida*; o
 un fragmento parcial inmunogénico de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (1) y (2), por medio del cual la longitud del fragmento parcial no está limitada, siempre que un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos parcial pueda inducir inmunidad, incluyendo inmunidad humoral e
 35 inmunidad celular contra *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida* en el cuerpo vivo.

3. La vacuna de ADN para peces de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el vector de expresión es un plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 7.

40 **4.** Una vacuna de ADN para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un procedimiento de prevención de la pseudotuberculosis, en la que el procedimiento se **caracteriza por** administrar la vacuna de ADN para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a peces.

5. La vacuna de ADN para peces para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el pez es un pez que pertenece a Perciformes, Tetraodontiformes u Osmeriformes.

50

55

60

65

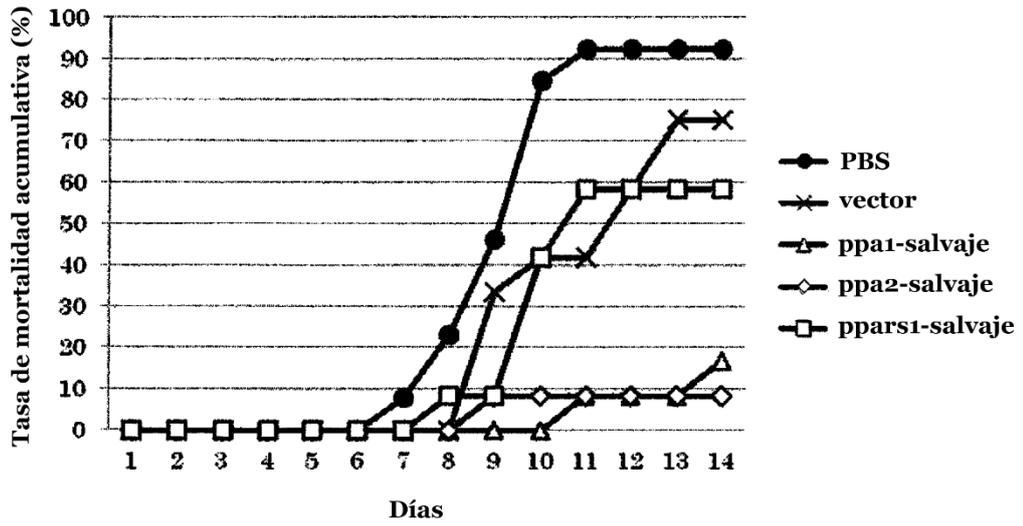


Figura 1

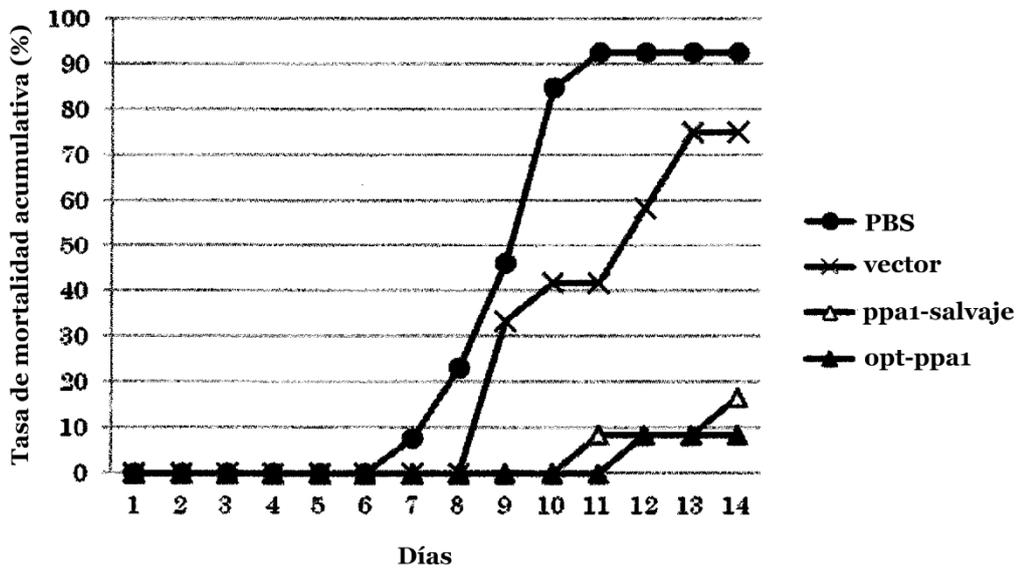


Figura 2

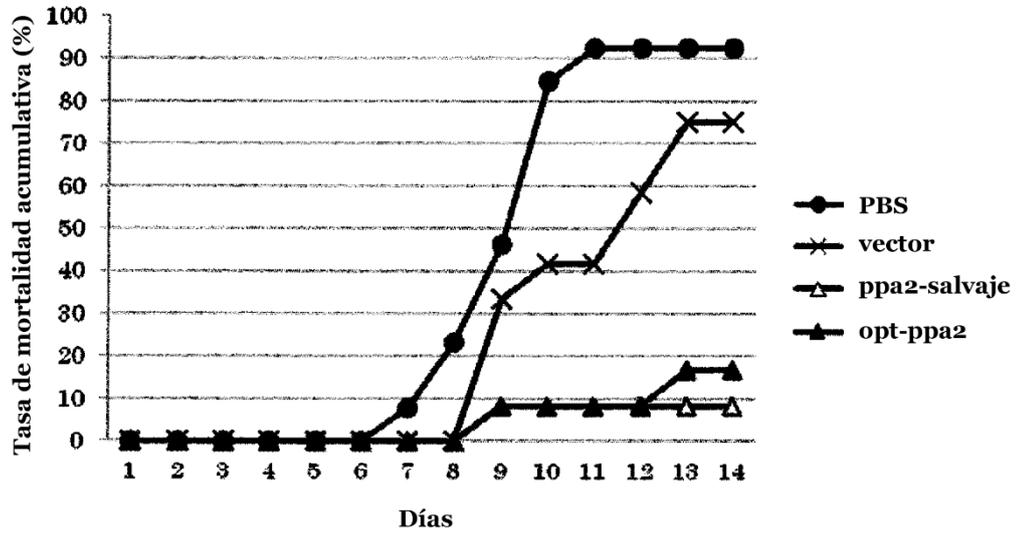


Figura 3

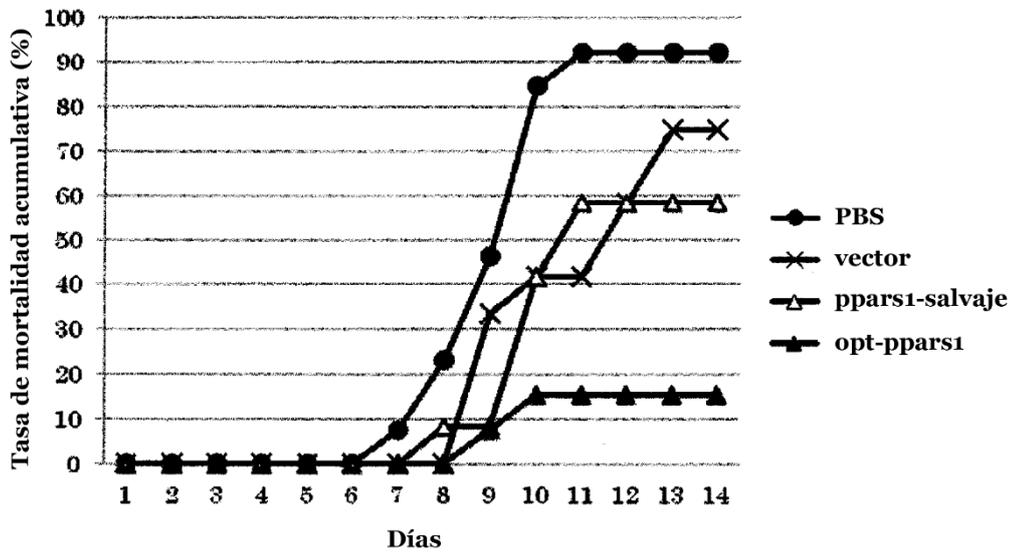


Figura 4