



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201530830	
Fecha de recepción:	15 junio 2015, 13:40 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES3041.1	
Solicitante:	INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	ANTICUERPO MONOCLONAL PARA LA DETECCIÓN DE IgM TOTALES Y ESPECÍFICAS DE ANTÍGENOS DE PEZ CEBRA	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (26 p.) Reivindicaciones-1.pdf (4 p.) Dibujos-1.pdf (4 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.) FEERCPT-2.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (1 p.) SEQLTXT.txt BIORCPT-1.pdf (5 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	15 junio 2015, 13:40 (CEST)	

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.

Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	☒ ☐
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPANOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	☒ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN: PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA) ☐ España ES Q2821013F ctra. de la Coruña, km. 7,5 Madrid 28 Madrid 28040 España ES ☒ ☐ ☐ 100,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	GÓMEZ-CASADO EDUARDO España ES
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	CHINCHILLA RODRÍGUEZ BLANCA España ES
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS:	COLL MORALES

NOMBRE: JULIO NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:	
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:	ANTICUERPO MONOCLONAL PARA LA DETECCIÓN DE IgM TOTALES Y ESPECÍFICAS DE ANTÍGENOS DE PEZ CEBRA
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA: SI NO	☒ ☐
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN SI NO	☒ ☐
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: SI NO	☒ ☐
(11-1) DEPÓSITO 1: REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	4F6E7 anti-IgM-zf Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany DSM ACC3243 ☒
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS: LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	☒ ☒
(13) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL: APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE: NÚMERO DE PODER:	PONS ARIÑO ANGEL 0499/5
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): JUSTIFICANTE DE PAGO (2): JUSTIFICANTE DEL DEPÓSITO BIOLÓGICO (1): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	☒ N.º de páginas: 26 ☒ N.º de reivindicaciones: 27 ☒ N.º de dibujos: 5 ☒ N.º de páginas: 1 ☐ N.º de figura(s): ☒ ☐ N.º de páginas: ☒ N.º de páginas: 1 ☒ N.º de páginas: 1 ☒ N.º de páginas: 5 ☒ N.º de páginas: 1 ☒

(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA: DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	[] [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas:
(18) NOTAS:	
(19) FIRMA: FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:	

Identificación

Ejercicio: 2015
Nro Justificante: 7915110319051

Sujeto Pasivo

NIF/CIF:

Apellidos y Nombre o Razón Social:

Agente o Representante legal (1):

NIF/CIF: **50534279J**

Apellidos y Nombre o Razón Social: **ÁNGEL PONS ARIÑO**

Código de Agente o Representante (2): **0499**

Autoliquidación

Titular del expediente si es distinto del pagador: **INST. NACIONAL DE INVEST. Y TECNOL.**

Modalidad Expediente: **P** Número Expediente: Tipo (3):

Clave: **IE01** Año: **2015** Concepto: **SOL. DE INVENCIÓN O REAHABILITACIÓN POR INTERNET**

Unidades: **1** Importe: **63,68**



Referencia OEPM: **88113156122**

909992100200188113156122

Declarante

Fecha: **15/06/15 13:25**

Firma: **ÁNGEL PONS ARIÑO**

Ingreso

Importe en euros: **63,68**

Adeudo en cuenta: 

NRC Asignado: **7915110319051000000001**

Modelo 791

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
(2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
(3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.

Identificación

Ejercicio: 2015
Nro Justificante: 7915110319060

Sujeto Pasivo

NIF/CIF:

Apellidos y Nombre o Razón Social:

Agente o Representante legal (1):

NIF/CIF: **50534279J**

Apellidos y Nombre o Razón Social: **ÁNGEL PONS ARIÑO**

Código de Agente o Representante (2): **0499**

Autoliquidación

Titular del expediente si es distinto del pagador: **INST. NACIONAL DE INVEST. Y TECNOL.**

Modalidad Expediente: **P** Número Expediente: Tipo (3):

Clave: **IE04** Año: **2015** Concepto: **SOLICITUD I.E.T. INTERNET**

Unidades: **1** Importe: **587,78**



Referencia OEPM: **88113156348**

909992100200188113156348

Declarante

Fecha: **15/06/15 13:28**

Firma: **ÁNGEL PONS ARIÑO**

Ingreso

Importe en euros: **587,78**

Adeudo en cuenta: 

NRC Asignado: **7915110319060000000001**

Modelo 791

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
(2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
(3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS		
Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad		
1. REFERENCIA DE SOLICITUD	ES3041.1	
2. TASAS	Importe (en euros)	
Concepto	Código de barras asignado	Importe
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	88113156122	63,68
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET	88113156348	587,78
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	☐	
El solicitante es una Universidad pública	☐	
Importe total		651,46
Importe abonado		651,46

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

**Anticuerpo monoclonal para la detección de IgM totales y específicas de
antígenos en pez cebra**

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal para la detección en pez cebra de IgM totales y específicas frente a antígenos, así como sus usos y aplicaciones. Por lo tanto, la presente invención se puede encuadrar en el campo de la medicina.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

El pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en una excelente herramienta para el estudio del desarrollo embrionario, de la ontogenia del sistema inmune, y del estudio de la respuesta inmune frente a patologías como infecciones y cáncer. En particular, el pez cebra es un modelo animal muy versátil para el estudio de enfermedades propias de peces que cursan en aguas calientes y frías, debido a su gran capacidad de adaptación al medio. Por otro lado, el pez cebra es la especie cuyo genoma se encuentra secuenciado en mayor proporción (80%) [1], respecto a otras especies de interés como la trucha.

20

25

Sin embargo, y al contrario que en otras especies de peces, no existe hasta la fecha la posibilidad de determinar/cuantificar los anticuerpos del tipo IgM que el pez cebra (Zf) genera frente a un antígeno nativo conformacional en el desarrollo de la respuesta inmune mediada por anticuerpos. Se han producido anticuerpos que reconocen la cadena pesada IgM de Zf (IgM-Zf), pero siempre que ésta se encuentre desnaturalizada, es decir, en conformación casi lineal, cuando pierde la conformación adecuada para reconocer el antígeno en su conformación natural. Este hecho limita la detección de gran cantidad de anticuerpos específicos frente a antígenos de estudio en modelos de enfermedades humanas y animales. Cabe destacar las enfermedades causadas por virus o bacterias que conllevan infecciones con grandes pérdidas económicas en peces de piscifactoría [2]. Una de ellas es la enfermedad causada por un rhabdovirus (novirhabdovirus) que causa infecciones en múltiples especies con grandes pérdidas económicas en peces salvajes y de piscifactoría: el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV).

35

Se hace por lo tanto necesario obtener un anticuerpo frente a IgM-Zf que reconozca anticuerpos de Zf generados frente a antígenos conformacionales. La capacidad de determinar de forma cualitativa y cuantitativa los anticuerpos IgM-Zf que produce el pez cebra en respuesta a antígenos concretos, permitirá desarrollar nuevas estrategias de vacunación basadas en este modelo de pez, frente a patógenos que afectan a humanos y a otros organismos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se demuestra el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la secuencia SEQ ID NO: 1, para la detección de la cadena pesada de la IgM de pez cebra. Además, se han caracterizado por primera vez anticuerpos frente a IgM-Zf específicos de la proteína G del virus VHSV, que confieren protección frente a la infección por VHSV, y de la proteína flagelina de *Marinobacter algicola*, como ejemplos de uso de los anticuerpos de la presente invención.

A partir del plasma de un solo pez cebra, las IgM-Zf específicas se pueden determinar por técnicas conocidas por el experto en la materia, por ejemplo serológicas (ELISA), inmunoquímicas (*Western-blot*), de inmunofluorescencia y de citometría de flujo (FACS).

El anticuerpo monoclonal de la presente invención también puede usarse “in vivo” mediante técnicas de imagen por fluorescencia.

En un primer aspecto la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la secuencia SEQ ID NO: 1. En adelante nos referiremos a él como al “anticuerpo de la invención”.

El término “anticuerpo”, tal como aquí se utiliza en la presente invención, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones (o fragmentos) inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas. Es decir, moléculas que se unen específicamente (inmunorreaccionan) con un antígeno, tal como, por ejemplo, un péptido o una proteína (un inmunógeno o epítipo). El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, en la presente invención el anticuerpo es monoclonal, y se refiere a un anticuerpo intacto o a fragmentos inmunológicamente activos de él, e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano,

recombinantes, quiméricos y sintéticos. En el contexto de esta invención el término anticuerpo se refiere a la inmunoglobulina que el animal o una célula híbrida ha sintetizado de forma específica frente a la secuencia SEQ ID NO: 1.

5 Ejemplos de porciones o fragmentos de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima, por ejemplo pepsina.

10 Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones homogéneas de anticuerpos idénticos, producidos por un hibridoma, es decir, una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral, que están dirigidos contra un único sitio o determinante antigénico. El procedimiento de obtención de los anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse según métodos convencionales, conocidos en el estado de la técnica. Opcionalmente, dichos anticuerpos pueden purificarse por medios
15 convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína A-Sepharosa, cromatografía con hidroxipatito, electroforesis en gel o diálisis.

20 Tal y como es conocido por el experto en la materia, hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

En una realización preferida del primer aspecto de la invención el anticuerpo es de tipo IgG, preferiblemente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4; más preferiblemente es IgG1.

25 Una realización más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al anticuerpo donde dicho anticuerpo está expresado a partir de la línea celular (hibridoma) depositada en la autoridad internacional *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) bajo la designación DSM ACC3243, en la presente invención también se denomina hibridoma 4F6E7 y genera el anticuerpo 4F6E7 (o también denominado 4F6E7 anti-IgM-zf). El depósito tuvo lugar el 5 de junio de 2014 en esta autoridad de depósito en Braunschweig, Alemania.

35 En una realización particular el anticuerpo puede comprender una etiqueta detectable. Una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al

anticuerpo donde dicho anticuerpo está conjugado con un fluorocromo, una enzima, una partícula de oro, una nanopartícula, un péptido u otra proteína de interés, por ejemplo una proteína o péptido ligando de un receptor.

5 El término “etiqueta detectable” o “marcaje” en la presente invención hace referencia a una etiqueta molecular que permite la detección, localización y/o identificación de la molécula a la que está unido, mediante procedimientos y equipamiento adecuados para la detección, bien mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Ejemplos de etiquetas detectables para el marcaje de
10 compuestos incluyen, aunque no se limitan a isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos, enzimas (por ejemplo peroxidasa), receptores y combinaciones de éstos. En una realización particular el anticuerpo está marcado con biotina, avidina, estreptoavidina, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano (HRP). Métodos para el marcaje y guía para la
15 elección de marcajes adecuados para diferentes propósitos son conocidos por el experto en la materia.

El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética o puede ser sintético, puede también carecer de porciones que confieran
20 ventajas.

El anticuerpo de la invención también puede reconocer específicamente variantes de la secuencia SEQ ID NO: 1. Las variantes pueden tener al menos un 70% de identidad (un 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88,
25 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad). El anticuerpo también puede reconocer fragmentos de la secuencia SEQ ID NO: 1 o de sus variantes.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos péptidos o proteínas que se comparan.
30 Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Podemos considerar, que péptidos o proteínas con porcentajes de identidad de, al menos, un 70% mantendrán las mismas propiedades de dicho péptido.

En una realización particular la presente invención también se refiere a una construcción génica que es capaz de generar el anticuerpo del primer aspecto de la presente invención.

- 5 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al antisuero que comprende el anticuerpo del primer aspecto de la invención. En adelante nos referiremos a él como al “antisuero de la invención”.

10 El término “antisuero” se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal. En el contexto de la presente invención el inmunógeno es el péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 y el antisuero comprende anticuerpos monoclonales específicos generados frente a dicha secuencia.

15 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la invención, preferiblemente, es una composición farmacéutica.

20 El término "composición farmacéutica" en esta memoria hace referencia a cualquier sustancia usada para diagnóstico, prevención, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad en el ser humano o en los animales, en la presente invención en pez cebra. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones farmacéuticas. En una realización preferida,
25 la composición farmacéutica además comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de la invención, la estabiliza o ayuda en su preparación en el sentido de darle una consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una
35 pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de

calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” (o “farmacológicamente aceptable”) se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención y cuya función es facilitar la incorporación del fármaco así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica de esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una célula que expresa el anticuerpo del primer aspecto de la invención. En una realización particular la célula es la depositada en la institución de depósito *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* de acuerdo con el tratado de Budapest bajo la designación DSM ACC3243 el día 5 de junio de 2014 y que fue depositada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). La célula DSM ACC3243 (hibridoma DSM ACC3243) también se denomina hibridoma “4F6E7 anti-IgM-zf” en la presente invención.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* o *in vivo* del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para la detección y/o cuantificación de anticuerpos IgM de *Danio rerio*. Por lo tanto sirve para detectar y/o cuantificar IgM totales y también IgM específicas de antígeno.

En una realización particular del quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso donde los anticuerpos IgM de *Danio rerio* que se detectan y/o cuantifican son los que reconocen la proteína G del virus de la septicemia hemorrágica vírica. Por lo tanto

el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la invención sirven también para distinguir individuos (pez cebra) infectados de individuos protegidos frente a la infección por el VHSV.

5 El virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV o *viral haemorrhagic septicaemia virus*, VHSV) es un virus de la familia *Rhabdoviridae*, género *Novirhabdovirus* que produce septicemia hemorrágica en muchas especies de peces incluyendo salmónidos y ciprínidos como el pez cebra. Preferiblemente se refiere a las cepas (cepas francesas) 23-75 y 07-71.

10

La glicoproteína G (gpG) del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV) es una proteína anclada a la membrana del virus de número de acceso en el Genbank A10182, preferiblemente la de la cepa 07-71, cuyo número de acceso al GenBank es AJ233396.1)

15

El término “in vitro” se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto. Es decir, se realiza en una muestra biológica de un sujeto.

20

El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita analizar los anticuerpos IgM del individuo del que se ha obtenido dicha muestra, en la presente invención de *Danio rerio*, e incluye, pero sin limitarnos, fluidos biológicos o tejidos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero o tejido. La IgM a detectar y/o cuantificar en la presente invención también puede estar libre en el fluido biológico o situada en la membrana celular.

25

La muestra biológica en la presente invención puede ser fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

30

El término “in vivo” se refiere a que el uso del anticuerpo de la invención se realiza dentro del cuerpo del sujeto. Por ejemplo, mediante la introducción (por inyección) del anticuerpo de la invención en el interior del pez cebra. Cuando se realiza de esta manera la detección y/o cuantificación se puede realizar por métodos de fluorescencia, de modo que el anticuerpo de la invención puede estar marcado con

35

una etiqueta fluorescente o ser detectado por otro anticuerpo a su vez marcado con una etiqueta fluorescente.

5 En la presente invención el término “sujeto” se refiere a un pez cebra (*Danio rerio*). En la presente invención los términos “sujeto” e “individuo” se usan indistintamente.

10 Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* o *in vivo* del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para el diagnóstico o pronóstico de enfermedades que cursan con variación (significativa) en el número de anticuerpos IgM de *Danio rerio*. Por ejemplo, enfermedades víricas y bacterianas en humanos que se estudien en pez cebra, enfermedades víricas o bacterianas que cursen en peces, trastornos del sistema inmune o las relativas al trasplante de órganos, entre otras.

15 Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* o *in vivo* del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para el diagnóstico o pronóstico del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV), es decir, para el diagnóstico de la septicemia hemorrágica causada por el VHSV.

20 Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* o *in vivo* del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para el cribado de fármacos que varían el número de anticuerpos IgM de *Danio rerio*. Por ejemplo, los fármacos pueden ser fármacos anti-tumorales, fármacos que aumenten o disminuyan poblaciones celulares en la respuesta inmune, y todos
25 aquellos que puedan cursar con el cambio de expresión de anticuerpos.

Un noveno aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* o *in vivo* del anticuerpo del primer aspecto de la invención o del antisuero del segundo aspecto de la invención para el cribado de antígenos reconocidos por anticuerpos IgM de *Danio rerio*. Los
30 antígenos pueden ser todos aquellos que se le administren a un pez cebra contra los que generará anticuerpos y también los inducidos por infecciones experimentales contra virus de peces, por ejemplo VHSV, SVCV (*Spring Viraemia of Carp Virus*) u otros.

35 Una realización preferida del quinto, sexto, séptimo, octavo y noveno aspecto de la invención se refiere al uso donde la detección y/o cuantificación, el diagnóstico, el

pronóstico o el cribado se realiza mediante inmunoensayo, preferiblemente mediante *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *western-blot*, inmunoquímica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o citometría de flujo.

- 5 El término “inmunoensayo” o “técnica inmunoquímica de análisis” es un método inmunoquímico de análisis en el que se emplea un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigir y/o cuantificar el antígeno. Los inmunoensayos comprenden, sin limitarse a, técnicas
- 10 inmunológicas tales como ELISA, *Western-blot*, RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo de enzima competitivo), DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich-ELISA*), cromatografía de inmunoafinidad, ensayos de tira o de flujo lateral (*lateral-flow immunoassay*), inmunoprecipitación, *dot-blot*, citometría de flujo, técnicas de inmunomarcaje, técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas,
- 15 inmunofluorescencia, técnicas basadas en el uso de *biochips* de biomarcadores, de biosensores o *microarrays* que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como los “dipsticks”. Entre los ensayos tipo ELISA son conocidos diferentes tipos de ELISA, tales como el ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA tipo sándwich, de carácter competitivo o no competitivo. Dentro de
- 20 otros inmunoensayos también se encuentran los inmunosensores cuyo principio de transducción puede ser óptico, electroquímico, másico o termométrico. Igualmente, también se incluyen los inmunosorbentes o sistemas de extracción por inmunoafinidad, que permiten la extracción selectiva del analito en el seno de una mezcla compleja. Estos sistemas, suelen ser materiales biohíbridos, resultado de la
- 25 unión estable del anticuerpo a un soporte sólido (polímero, material inorgánico, partículas metálicas, etc.), y que se utilizan para la separación o extracción del analito del resto de componentes de la matriz. Tales formatos pueden ser heterogéneos u homogéneos, secuenciales o simultáneos, competitivos o no competitivos.
- 30 Un décimo aspecto de la presente invención se refiere al método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de anticuerpos IgM de *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:
- a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la
- 35 invención; y
- b. detectar y/o cuantificar la unión específica.

Los anticuerpos IgM detectados y/o cuantificados pueden ser IgM totales o IgM específicas de determinados antígenos.

- 5 Se entiende por “unión específica” a la unión (reacción, interacción o reconocimiento específico) entre el anticuerpo de la invención y la IgM de *Danio rerio*.

10 La incubación del anticuerpo o antisuero con la muestra biológica aislada se realiza bajo condiciones que permiten la formación de complejos antígeno-anticuerpo y se mantiene durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una respuesta inmunológica.

15 Un onceavo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades que cursan con variación en el número de anticuerpos IgM de *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:

- 20 a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la invención; y
- b. cuantificar la unión específica del anticuerpo o del antisuero del paso (a), es decir, cuantificar los anticuerpos IgM totales;
- 25 c. comparar la concentración de los anticuerpos IgM de pez cebra con un control;
- d. atribuir la diferencia significativa a la enfermedad.

25 Enfermedades que se pueden detectar mediante este método pueden ser enfermedades víricas y bacterianas en humanos que se estudien en pez cebra, enfermedades víricas o bacterianas que cursen en peces, trastornos del sistema inmune o las relativas al trasplante de órganos entre otras.

30 Un doceavo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV) que comprende las siguientes etapas:

- 35 a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la invención; y

- b. detectar y/o cuantificar la unión específica a anticuerpos IgM de *Danio rerio* específicos del VHSV.

5 Un treceavo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para evaluar la protección frente al VHSV en *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:

- a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la invención; y
- 10 b. detectar y/o cuantificar la unión específica a las IgM de *Danio rerio* que reconocen la proteína G del VHSV.

15 En una realización particular del treceavo aspecto de la invención las IgM de *Danio rerio* que reconocen la proteína G del VHSV están unidas a la proteína G del VHSV.

Un catorceavo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para para el cribado de fármacos que varían el número de anticuerpos IgM de *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:

- a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la invención; y
- 20 b. detectar y/o cuantificar la unión específica.

25 El método del catorceavo aspecto de la invención además puede comprender los siguientes pasos o combinaciones de ellos: antes del paso (a), la administración de los distintos fármacos a grupos de peces en las condiciones de estudio de tiempo y concentración determinada requerida para cada fármaco y conocida por el experto en la materia; la obtención del plasma de cada pez individualmente, preferiblemente antes de la administración del fármaco y/o después de la administración de dicho fármaco; en el paso (b) medir por la técnica de ELISA indirecto el número de anticuerpos totales; y/o asociar la variación de anticuerpos tras la medición a cada fármaco administrado.

35 Un quinceavo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para para el cribado de antígenos reconocidos por anticuerpos IgM de *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:

- a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la invención; y
- b. detectar y/o cuantificar la unión específica.

5

El método del quinceavo aspecto de la invención además puede comprender los siguientes pasos o combinaciones de ellos: antes del paso (a) administrar el antígeno (proteína, péptido o virus) para inducir inmunidad; la extracción del plasma de cada pez de forma individualizada; realizar un ELISA indirecto usando en fase sólida pegado a la placa el antígeno contra el que queremos determinar los anticuerpos; y/o

10

valorar de forma cualitativa y cuantitativa la positividad de las muestras.

El método del quinceavo aspecto de la invención también permite investigar si una cohorte de peces han sido infectados con patógenos concretos.

15

Una realización preferida del décimo, onceavo, doceavo, treceavo, catorceavo y quinceavo aspecto de la invención se refiere al método donde la detección y/o cuantificación, diagnóstico o cribado se realiza mediante ELISA, *western-blot*, inmunoquímica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o citometría de flujo.

20

En otra realización particular del décimo, onceavo, doceavo, treceavo, catorceavo y quinceavo aspecto de la presente invención el anticuerpo de la presente invención puede estar marcado con una etiqueta detectable.

25

En otra realización particular del décimo, onceavo, doceavo, treceavo, catorceavo y quinceavo aspecto de la presente invención además puede comprender otro anticuerpo secundario que reconozca al anticuerpo de la presente invención y donde dicho anticuerpo secundario puede estar marcado con una etiqueta detectable.

30

En otra realización particular del décimo, onceavo, doceavo, treceavo, catorceavo y quinceavo aspecto de la presente invención el método también puede comprender un paso de comparación con una muestra de referencia (control).

35

El término “muestra de referencia” entendida en la presente invención se refiere, por ejemplo, pero no se limita a, las muestras tomadas de individuos que presentan una

concentración conocida de anticuerpos IgM-Zf (“control positivo”) o que no presenta la dichos anticuerpos (“control negativo”).

5 El método del décimo, onceavo, doceavo, treceavo, catorceavo y quinceavo aspecto de la invención también puede realizarse *in vivo* si en vez de la muestra biológica se utiliza el pez cebra vivo. En dicho caso el anticuerpo del primer aspecto de la invención o el antisuero del segundo aspecto de la invención se introduce en el interior del pez cebra vivo mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, por ejemplo mediante administración oral, intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

10 Preferiblemente en este caso el anticuerpo de la invención está marcado mediante una técnica conocida por el experto en la materia que permita detectarlo en un organismo vivo, por ejemplo fluorocromos o péptidos o proteínas de interés detectables.

15 Un dieciseisavo aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de un anticuerpo monoclonal que reconoce la cadena pesada del anticuerpo IgM de *Danio rerio* que comprende:

- 20 a. obtener el suero o plasma previamente extraído de un animal no-humano inmunizado con una proteína recombinante que comprende, preferiblemente consiste en, el péptido de secuencia SEQ ID NO: 1,
- b. obtener un hibridoma a partir del suero o plasma que genere anticuerpos monoclonales frente a la cadena pesada de los anticuerpos IgM de *Danio rerio*.

25 Preferiblemente, además comprende una etapa (c) de aislamiento o purificación del anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma generado en la etapa (b). Más preferiblemente el animal no-humano es un mamífero que se selecciona de la lista que consiste en cerdo, chimpancé, ratón, rata, conejo y cobaya.

30 El término “purificar” tal y como se emplea en la descripción, se refiere al aislamiento y concentración del anticuerpo de la invención respecto del resto de anticuerpos presentes en el medio de cultivo y/o en la célula de la invención. El aislamiento del anticuerpo de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque.

35

La extracción del suero o plasma del animal inmunizado se lleva a cabo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo mediante extracción sanguínea, posterior coagulación de ésta, eliminación del coágulo y aislamiento del suero. Se entiende por “suero” el componente de la sangre resultante de permitir la coagulación de ésta u eliminar el coágulo de fibrina y otros componentes.

Un diecisieteavo aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal obtenido mediante el método del dieciseisavo aspecto de la presente invención. Preferiblemente de isotipo es IgG, más preferiblemente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en una realización particular es IgG1. La presente invención también se refiere al uso del anticuerpo del diecisiete aspecto de la invención para los usos descritos en el quinto, sexto, séptimo, octavo y noveno aspecto de la invención.

Un dieciochoavo aspecto de la presente invención se refiere a un kit o un dispositivo que comprende el anticuerpo del primer aspecto de la invención, el antisuero del segundo aspecto de la invención, la composición del tercer aspecto de la invención o la célula del cuarto aspecto de la invención. El dispositivo puede ser un dispositivo electrónico.

En una realización particular el anticuerpo de la invención está unido a un soporte sólido comprendido en el kit o en el dispositivo, por ejemplo, pero no limitado a: vidrio, plástico, tubos, placa, placas de múltiples pocillos, membranas, soportes de silicio, soportes de plástico, discos compactos, filtros, capas de gel, soportes metálicos, un dispositivo, cualquier otro soporte conocido, o una mezcla de ellos.

El kit de la invención comprende los elementos necesarios para llevar a cabo los métodos descritos en el décimo, onceavo, doceavo, treceavo, catorceavo y quinceavo aspectos de la invención. Este kit puede comprender, sin ningún tipo de limitación, tampón, enzimas, agentes para prevenir contaminación, otros anticuerpos que reconozcan al anticuerpo de la invención, etc. También puede incluir los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. También puede contener además controles positivos o negativos. También puede comprender las instrucciones para llevar a cabo su utilización.

Un diecinueveavo aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit o del dispositivo del dieciochoavo aspecto de la invención para llevar a cabo el método descrito en el décimo, onceavo, doceavo, treceavo, catorceavo y quinceavo aspectos de la invención.

5

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

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

FIG. 1 El monoclonal 4F6E7 detecta las IgM totales semipurificadas de un *pool* de suero de Zf en *western-blot* (WB) de forma similar al anticuerpo policlonal resultante de la inmunización de los ratones.

20

FIG. 2 Se utilizó una cantidad fija por pocillo en fase sólida de IgM-Zf semipurificada. Después se estudió la capacidad de reconocimiento del suero policlonal de ratón anti-IgM-Zf (dilución 1/100) y el anticuerpo monoclonal 4F6E7 purificado y a concentración de 1mg/ml usado en diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200. También se comparó el sobrenadante del cultivo del hibridoma 4F6E7 sin purificar y un suero de ratón no relacionado a dilución 1/100.

25

FIG. 3 El monoclonal 4F6E7 detecta IgM de Zf específicas de antígeno. La inmunización Zf con la proteína flagelina (*M. algicola*) induce la producción de IgM específicas contra esta proteína. Mediante un ELISA de captura y usando el monoclonal 4F6E7 podemos diferenciar los peces inmunizados de los controles.

30

FIG. 4 Estudio de los niveles de IgM específicas contra la proteína G de VHSV. En el eje Y se representa la absorbancia medida, y en el eje X los grupos de peces estudiados. El monoclonal 4F6E7 detecta IgM de Zf específicas contra la proteína G de VHSV tras la vacunación oral con distintas combinaciones de adyuvantes/G. Cada círculo representa el plasma de un pez. Los grupos de peces vacunados oralmente fueron +il17 (pMCV1.4-il17 + pT2MCV1.4-G), +il22 (pMCV1.4-il22 + pT2MCV1.4-G),

35

+il12 (pMCV1.4-il12 + pT2MCV1.4-G), +def12 (pMCV1.4-def12 + pT2MCV1.4-G) (donde G es proteína G, il es interleucina y def12 es beta defensina), grupo vacunado con plásmido control negativo/vacío (pT2MCV1.4) y grupo vacunado con la proteína G sin adyuvantes (pT2MCV1.4-G). En la figura se observa que el monoclonal 4F6E7 detecta más anticuerpos específicos contra la proteína G (usando el fragmento 11 [3]) en los grupos que se administra la il17 y la il22 como adyuvantes.

FIG. 5 Representación del espectro de poblaciones del bazo y riñón cefálico de pez cebra separadas mediante citometría de flujo (FACS). Las poblaciones celulares obtenidas pueden diferenciarse en linfocitos (región P3), progenitores mieloides (región P10) y eritrocitos (región P5), encontrando positividad para IgM en las dos primeras (Tabla1). FSC-A, *forward scatter* (lineal); SSC-A, *side scatter* (logarítmico).

EJEMPLOS

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

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño de péptidos de la IgM de pez cebra como inmunógenos

Se estudió la secuencia de proteína de la cadena pesada de la IgM de pez cebra (nº acceso GenBank AY643753) en relación a la predicción de hidrofiliidad, antigenicidad y epítomos lineales [4-6].

Se eligió la secuencia del péptido “LNFKWKDPAGKDLSDFVQYP”, que se localiza en la región CH1 de la cadena pesada de la IgM-Zf, es específica de la inmunoglobulina M y no tiene reactividad cruzada con otras especies. Esta secuencia se sintetizó químicamente (GL Biochem, China) y se conjugaron a 8 unidades de este péptido a una estructura denominada MAP (*Multiple Antigenic Peptide*) para que el péptido tuviera una naturaleza más inmunogénica, por métodos conocidos por el experto en la materia, además, también se obtuvo de forma comercial (Chinapeptides, China) el péptido conjugado a la proteína KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*) [7].

Se comparó con otro péptido (SEQ ID NO: 2; CDEPAYGYKNSTSEP) siendo sorprendentemente el péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 el que generó mejores resultados. Los anticuerpos generados frente a la secuencia SEQ ID NO: 2 no funcionaron en ELISA para detectar los anticuerpos IgM de Zf, mientras que los anticuerpos generados frente a la secuencia SEQ ID NO: 1 sorprendentemente sí funcionaron.

2. Inmunización de ratones

Mediante un procedimiento estándar, se inoculó un grupo de 5 ratones con 10 microgramos del péptido- MAP junto con adyuvante completo de Freund (1:1) por vía intraperitoneal. Se repitió con adyuvante incompleto de Freund (1:1) repetidas ocasiones separadas 15 días. El grupo control se inoculó por la misma vía con suero fosfato salino (PBS) y adyuvante de Freund. La inmunidad generada se estudió mediante ELISA con los sueros pre-inmune de los ratones y los recogidos tras 15 días de cada inoculación.

3. Obtención de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se generaron mediante la técnica descrita por Köhler y Milstein en 1975 [8]. Se procedió a la extracción del bazo del ratón mejor inmunizado, y se fusionaron esas células del bazo con la línea plasmacitoma SP2/0. La fusión celular se realizó mediante procedimientos estándar y se sometió a selección con medio suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Tras doce días de selección, en aquellos pocillos que presentan un crecimiento adecuado se recogieron muestras del sobrenadante y se analizaron por ELISA frente al antígeno con el que se inmunizó (péptido-MAP). Para el inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA), se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (MaxiSorp, NUNC) con una solución de 100 µl/pocillo de tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6) y 2 µg/pocillo de la proteína KLH fusionada al péptido, y las placas se mantuvieron en humedad a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron dos veces con 100 µl/pocillo de tampón de lavado (130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 0,1 % Tween ®20, pH 6,8) y se bloquearon durante una hora con 100 µl/pocillo de tampón de dilución (130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 0,1 % Tween ®20, 4 % de leche desnatada en polvo, pH 6,8). A continuación, se incubaron a temperatura ambiente y durante una hora con

100 µl/pocillo de los sobrenadantes de los pocillos de los híbridos en crecimiento. Después se lavaron las placas dos veces con tampón de lavado y se incubaron una hora con 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario anti-IgM conjugado con peroxidasa (NA931V, GE Healthcare Life Sciences) a una dilución 1/3000 en tampón de dilución.

5 Después se lavaron las placas tres veces y se revelaron añadiendo 50 µl/pocillo de orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD, Dako, Dinamarca) disuelta en tampón sustrato (150 mM citrato sódico, 3 mM H₂O₂, 0,24 mM mertiolato, pH 4,8) esperando el desarrollo de color durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se frenó la reacción con 50 µl/pocillo de 2 M H₂SO₄ y se leyó la
10 absorbancia de las placas en un lector ELISA Multiskan RC a 492 y 620 nm. La A_{620nm} se utilizó para corregir diferencias individuales de absorbancia entre pocillos. Los resultados se expresaron como A₄₉₂ - A₆₂₀.

15 Las células de los pocillos positivos se recuperaron y se realizó un proceso clonación por dilución límite. Para ello, las células de fusión se plaquearon a una densidad de 1 célula por pocillo. Aquellos pocillos en los que cayó una sola célula produjeron un único clon viable y posteriormente se analizó la producción de anticuerpos específicos mediante el ELISA descrito anteriormente. Se realizaron 4 rondas de clonación para asegurarnos la especificidad del clon y su estabilidad. Finalmente, se realizó un ELISA
20 frente a 3 antígenos para valorar su especificidad: 1) el péptido MAP, 2) el péptido conjugado a KLH y 3) frente a suero de Zf que contenía IgM-Zf totales.

Se obtuvieron los anticuerpos monoclonales: 4F6E7, 1D11, 18C5B5, 18C5C10, 18C6C8 y 18C6B10.

25

4. Isotipado del anticuerpo monoclonal de ratón.

Los sobrenadantes de los clones finales obtenidos se estudiaron para determinar el isotipo mediante el uso de un kit comercial (*Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit*,
30 Invitrogen) por la técnica de ELISA.

5. Purificación de IgM totales de Zf.

35 Se obtuvo plasma de 200 peces cebras que fueron sedados con tricaina metano sulfonato (MS-222, Sigma, a una concentración final de 100 mg/ml) y posterior corte de la cola para el sangrado [9]. La sangre de 100 Zf se recogió en 200 µl/pez de una

solución anticoagulante con 6,4 g/l de citrato sódico y 1,5 g/l de EDTA en suero salino isotónico (Grifols, Barcelona, España). Posteriormente, el plasma se sometió a cromatografía de afinidad de tipo tiofílica siguiendo las instrucciones del fabricante para su uso (Pierce Thiophilic Adsorbent, Thermo Scientific, EEUU). Las IgM totales
5 obtenidas se titularon mediante ELISA para conocer la concentración relativa para su uso posterior en *Western-blot* y ELISA.

6. Inmunización de peces cebras con flagelina

10 Se inmunizó mediante inyección intraperitoneal un grupo de veinte Zf con 1 µg de flagelina FR de *Marinobacter algicola* [10] cada tres semanas, hasta un total de 5 inmunizaciones. Los sueros de peces cebras se obtuvieron previa anestesia por inmersión en agua con MS-222 y mediante sangrado por cola hasta su muerte como se ha detallado anteriormente. Con el fin de obtener el mayor volumen posible de
15 sangre evitando la coagulación, las muestras de sangre se recogieron en 200 µl /pez de una solución anticoagulante descrita anteriormente, y se centrifugaron a 14.000 revoluciones/minuto (rpm) durante dos minutos para separar el sobrenadante diluido del *pellet* celular. Así, se estima que el suero recogido se encuentra diluido alrededor de 1/20 o 1/30. Para el estudio disponíamos de los siguientes tipos de suero: 1)
20 Sueros de peces inmunizados con flagelina; 2) sueros de peces no inmunizados (16 Zf en 440 µl de anticoagulante) y 3) sueros de peces no inmunizados con distinto grado de hemólisis.

7. Inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-flagelina y anti-IgM-Zf

25

Se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (MaxiSorp, NUNC) con 2 µg/pocillo del correspondiente antígeno (flagelina, IgM-Zf semipurificada), en función del ensayo, disuelto en 100 µl/pocillo de tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6) y se mantuvieron
30 en humedad a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron dos veces con 100 µl/pocillo de tampón de lavado (130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 0,1 % Tween ®20, pH 6,8) y se bloquearon durante una hora con 100 µl/pocillo de tampón de dilución (130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 0,1 % Tween ®20, 4 % de leche desnatada en polvo, pH
35 6,8). A continuación, se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con 100 µl/pocillo de los sueros de peces cebras diluidos 1/10 en tampón de dilución. Se

lavarón las placas dos veces con tampón de lavado y se incubaron una hora con el anticuerpo monoclonal anti-IgM de pez cebra obtenido en ratón, diluido a la mitad en tampón de dilución (100 µl/pocillo). Después de lavar las placas, se incubaron durante una hora con 100 µl/pocillo de un anticuerpo policlonal anti-IgGs de ratón obtenido en oveja y conjugado con peroxidasa (NA931V, GE Healthcare Life Sciences) diluido 1/3000 en tampón de dilución. Se lavaron las placas tres veces y se revelaron añadiendo 50 µl/pocillo de orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD, Dako, Dinamarca) disuelta en tampón sustrato (150 mM citrato sódico, 3 mM H₂O₂, 0,24 mM mertiolato, pH 4,8) esperando el desarrollo de color durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se frenó la reacción con 50 µl/pocillo de 2 M H₂SO₄ y se leyó la absorbancia de las placas en un lector Elisa Multiskan RC a 492 y 620 nm. La A_{620nm} se utilizó para corregir diferencias individuales de absorbancia entre pocillos. Los resultados se expresaron como A₄₉₂ - A₆₂₀.

8. Detección de IgM en la membrana de distintas poblaciones celulares de Zf mediante citometría de flujo

De un pez cebra sacrificado, previa sedación ya descrita, se aisló y homogenizó el bazo y riñón cefálico mediante el uso de una malla de 70 micras (BD Falcon, Madrid, España) y un buffer compuesto de PBS 1x + 2% de BSA (albúmina bovina) y 0,02% de azida sódica. Este buffer se usó para favorecer el paso por la malla de las células y su conservación. Las células se separaron en distintas alícuotas para incubarlas con el monoclonal 4F6E7-FITC (1000 mg/ml) a diluciones 1/50, 1/100, 1/3000 y una alícuota sin marcar como control. Después de la incubación con el monoclonal, las células se lavaron 3 veces con el *buffer* descrito. Finalmente, las células se fijaron con formaldehído al 0,1% y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, Madrid, España). El grupo control sirvió para establecer las diferentes regiones poblacionales y la fluorescencia basal dentro de cada región.

9. Preparación de los plásmidos para la inmunización oral.

En la presente invención se usaron pMCV1.4 [11] y pT2MCV1.4 [12] como vectores plasmídicos donde poder clonar diferentes transgenes de interleucinas de pez cebra (il17, il12, il22, beta defensina (def12)) y la glicoproteína G del virus de la septicemia hemorrágica (VHSV, cepa 0771) [13], respectivamente. Se eligió pT2MCV1.4-G (que contiene la glicoproteína G del virus VHSV) porque era el de mayor expresión en

células epiteliales de pez, y por tanto el mejor candidato para la inmunización oral [12]. El plásmido pMCV1.4 se encuentra bajo el promotor de expresión de citomegalovirus y se ha comprobado un buen nivel de expresión [11].

5 **10. Formulación de las microesferas de DNA-alginato para la vacunación oral**

El procedimiento de preparación de estas microesferas de DNA-alginato fue adaptado del descrito en [14]. Brevemente, 166 µl de una solución 3% de alginato sódico se mezcló con 100 microgramos de cada DNA plasmídico en 500 µl de H₂O en un tubo de cristal de 4 ml y mezclando lentamente mediante agitación con un agitador magnético durante 10 minutos. Después se añadieron 3 ml de aceite de parafina y Span 80 (70 ml + 350 µl, respectivamente) y la mezcla se emulsionó durante 30 minutos con agitación máxima. Para remover el exceso de parafina, las microesferas de alginato formadas se centrifugaron y lavaron con etanol al 70% y finalmente se resuspendieron en 100 µl of H₂O.

11. Inmunización oral de los peces cebra.

Peces adultos de tamaño extra-grande de 600-800 mg (~ 4 cm de longitud) fueron y mantenidos a 24-26°C en acuarios de 30 litros con agua tamponada (1 g de CaCl₂, 1 g de NaHCO₃ and 0,5 g de sales marinas “Instant Ocean”, dando lugar a un agua de 200-300 µS y pH 7,8-8,2), filtros biológicos correspondientes y una dieta comercial. Dos grupos de 5 peces fueron estudiados por métodos estándar para confirmar la ausencia de virus de salmónidos (VHSV e IPNV, virus de la necrosis pancreática) mediante el cultivo en monocapas de células EPC/ZF4. Para la inmunización oral, a grupos de 10 peces se les co-administró 10 µl de los complejos plásmido-alginato conteniendo 10 µg de pT2MCV1.4-G y 5 µg de cada plásmido adyuvante pMCV1.4-II17, pMCV1.4-II22, pMCV1.4-II12, pMCV1.4-def12), mientras que los grupos control solo recibieron un plásmido: pT2MCV1.4-G y pMCV1.4. La administración se realizó con una punta de 20 µl que se introdujo en la boca llegando hasta el esófago de cada pez, proceso descrito previamente [14, 15]. Los peces se anestesiaron previamente por inmersión en 50 mg/ml de tricaina-etanosulfonato (MS-222, Sigma, Madrid, España) tamponado en PBS.

35 **12. ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos anti-G de VHSV**

Para evaluar si las inmunizaciones fueron eficaces en inducir anticuerpos contra la proteína G del virus VHSV, se realizó un ELISA indirecto usando como fase sólida una parte de la proteína G, denominada fragmento 11 [3].

5 Se obtuvo el plasma de los peces inmunizados como se ha descrito previamente. Para el ensayo se usaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorb®, Nunc) con 2 µg por pocillo del fragmento 11 adherido en fase sólida. Esto se consigue mediante la incubación a 37°C toda la noche de los 2 µg del fragmento 11 en 100 µl de agua bidestilada por pocillo [3]. Al día siguiente y para reducir la unión inespecífica, los
10 pocillos se bloquearon durante 60 minutos con 100 µl del *buffer* de dilución (0,5 % BSA, 0,1 % Tween® 20, 0,01 % mertiolato, 0,005 % rojo fenol, en PBS a pH 6,7) conteniendo 50 µg de extracto de *E. coli* BL21 y 25 µg de leche por ml. Tras los lavados, los pocillos se incubaron durante 60 min con 100 µl/pocillo de plasma de pez cebra diluido 5x en buffer de dilución. Tras lavar de nuevo, los pocillos se incubaron
15 durante 30 minutos con el anticuerpo monoclonal 4F6E7 diluido 50 veces. Posteriormente se lava, y se añade el sustrato 1/1000 del anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma Chem. Co, St. Louis, EEUU, Ref. A9044). La reacción de color se desarrolló añadiendo 50 µl/pocillo de orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD, Dako, Dinamarca) disuelta en tampón sustrato (150 mM
20 citrato sódico, 3 mM H₂O₂, 0,24 mM mertiolato, pH 4,8) esperando el desarrollo de color durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se frenó la reacción con 50 µl/pocillo de 2 M H₂SO₄ y se leyó la absorbancia de las placas en un lector ELISA Multiskan RC a 492 y 620 nm. La A_{620nm} se utilizó para corregir diferencias individuales de absorbancia entre pocillos. Los resultados se expresaron
25 como A₄₉₂ - A₆₂₀. El punto de corte se estableció en la media de la absorbancia + 2 veces la desviación estándar de 10 peces inmunizados con pT2MCV1.4.

RESULTADOS

30 1. Caracterización del monoclonal 4F6E7 obtenido.

El sobrenadante del cultivo se estudió para caracterizar el isotipo del monoclonal 4F6E7 mediante un kit comercial, determinándose que es de isotipo IgG1.

35 2. El anticuerpo monoclonal 4F6E7 reconoce mediante WB y ELISA la IgM semipurificada del suero de Zf.

Se realizaron ensayos de reconocimiento de la IgM de Zf semipurificada del suero por cromatografía de afinidad con una resina tiofílica (IgM totales). Esta IgM de Zf se detectó de forma específica mediante las técnicas de Western-blot (WB) (Figura 1) y ELISA con el monoclonal 4F6E7 (Figura 2). En ELISA, se utilizaron distintos sueros o anticuerpos: el sobrenadante del cultivo del monoclonal 4F6E7 sin purificar, el anticuerpo monoclonal 4F6E7 purificado por cromatografía de afinidad, ajustado a 1mg/ml y usado a distintas diluciones (1/25, 1/50, 1/100, 1/200), el policlonal de ratón obtenido en las inmunizaciones iniciales (1/100) y un antisuero de ratón no relacionado (control no inmunizado) (1/100). Se observó que la mayor señal correspondía al suero policlonal capaz de reconocer la IgM-Zf. Además, el monoclonal 4F6E7 reconocía la IgM-Zf semipurificada de manera similar en el rango de concentraciones estudiadas (de 1/25 a 1/200), coincidiendo la señal de 4F6E7 purificado a 1/100 (de 1 mg/mg) con la señal del sobrenadante del cultivo del monoclonal sin purificar. En cualquier caso, el monoclonal 4F6E7 purificado o sin purificar tenía una señal específica y estadísticamente mayor que $\pm$ el doble de la desviación estándar (2SD) de la señal obtenida con el suero de ratón no relacionado. En el proceso de fusión se obtuvieron otros anticuerpos monoclonales (1D11, 18C5B5, 18C5C10, 18C6C8 y 18C6B10) capaces de reconocer en diversa medida la IgM-Zf semipurificada en ELISA (no mostrado) pero no así por la técnica de WB. Mientras que el monoclonal 4F6E7 era el más completo ya que reconocía tanto por ELISA como por WB la IgM-Zf semipurificada.

3. El anticuerpo monoclonal 4F6E7 determina las IgMs de Zf específicas del antígeno flagelina en los peces inmunizados.

Estos estudios se realizaron para determinar la capacidad del anticuerpo monoclonal 4F6E7 en reconocer IgM de zf específicas del antígeno flagelina, tras la inmunización repetida de Zf con esta proteína (ver “Material y Métodos”). Para ello se realizaron ELISAs indirectos con sueros de Zf inmunizados con la flagelina FR de *Marinobacter algicola* [10]. El resultado mostró que los sueros de los Zf inmunizados con la flagelina presentaban IgMs específicas de flagelina que pudieron ser detectadas con el monoclonal 4F6E7 (Figura 3), y aunque la señal es relativamente baja, esta es muy específica.

4. El anticuerpo monoclonal 4F6E7 reconoce las IgMs específicas anti-G VHSV en los peces vacunados.

Se realizó el estudio del plasma obtenido de los grupos de peces vacunados oralmente con los diferentes plásmidos que expresan adyuvantes (pMCV1.4-il17, pMCV1.4-il12, pMCV1.4-il22, pMCV1.4-def12 (beta defensina)) además del plásmido que expresa para la glicoproteína pT2MCV1.4-G, y/o los controles (Figura 4). La línea discontinua en la gráfica establece el punto de corte de positividad (arriba)/negatividad (abajo) para cada plasma (pez) en cada grupo. Mediante un ELISA indirecto y utilizando el anticuerpo 4F6E7 se puede determinar de forma individual aquellos peces que han desarrollado anticuerpos anti-G en función del adyuvante utilizado en el ensayo de vacunación oral. El grupo de peces co-vacunados oralmente con los plásmidos de pMCV1.4-IL17 + pT2MCV1.4-G desarrollaron más anticuerpos (6/9, 66,6%), seguido del grupo co-vacunado con pMCV1.4-IL22 + pT2MCV1.4-G (3/10, 33,3%) y del grupo vacunado solo con el plásmido de la pT2MCV1.4-G (1/8, 12,5%). Por otro lado, en los grupos co-vacunados oralmente con los plásmidos de pMCV1.4-IL12 + pT2MCV1.4-G y los plásmidos de pMCV1.4-def12 + pT2MCV1.4-G no desarrollaron anticuerpos anti-G, puesto que no se detectaron en el estudio mediante ELISA. El grupo de vacunación oral con pT2MCV1.4-G resultó en la producción de anticuerpos IgM anti-G VHSV en sólo un pez. El método de vacunación oral con el plásmido de la proteína G (pT2MCV1.4-G) y el plásmido de expresión de la IL17 produce en el pez cebra más anticuerpos anti-G que los otros adyuvantes de interleucinas ensayados. El anticuerpo monoclonal 4F6E7 es capaz de determinar IgMs específicas de antígeno, en este caso de la glicoproteína G de VHSV.

5. El anticuerpo monoclonal reconoce la IgM de membrana en distintas poblaciones celulares de Zf.

El monoclonal 4F6E7 conjugado con el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) se usó para la detección de la IgM de membrana del conjunto de poblaciones celulares presentes en el homogenizado de un bazo y riñón cefálico de un pez cebra. El estudio por citometría de flujo (FACS) mostró que el anticuerpo monoclonal 4F6E7-FITC detectaba la IgM en la superficie celular de algunas poblaciones celulares (Figura 5, Tabla 1). Los valores de fluorescencia detectados disminuyen en función de la dilución del anticuerpo 4F6E7-FITC, respecto a un control (Tabla 1). Así, teniendo en cuenta todas las poblaciones, a una dilución 1/50 de

4F6E7-FITC se detectaron un 7,6% de células IgM+ de un total de 10000 células analizadas, mientras que a una dilución 1/100 de 4F6E7-FITC baja a 4,2%, a dilución 1/200 del anticuerpo hay un 3% de células y a una dilución de 1/3000 de 4F6E7-FITC se observó un 1,8% de células IgM+ cuyo valor era muy similar al control establecido (2,1%). Además, mediante esta técnica de citometría de flujo, se pudo determinar que la presencia de IgM se daba en poblaciones celulares que corresponden con los linfocitos B y otros precursores mieloides (Tabla 1 y Figura 5). Así, en linfocitos se detectó que un 12,8% de ellos eran IgM+ a una dilución 1/50, mientras que a una dilución 1/3000 no se detectaban IgM+ (0,5%). Respecto a los precursores mieloides se observó un 19% de ellos IgM+ a una dilución 1/50 de 4F6E7-FITC, mientras que a una dilución 1/3000 el monoclonal 4F6E7 detectaba niveles de IgM+ (5,8%) similares al control (5,4%) (Tabla 1). De estos resultados se puede concluir que el monoclonal 4F6E7 se puede utilizar, por tanto, para aislar/separar aquellas poblaciones celulares que expresen en superficie la IgM.

Tabla 1. Porcentajes de células IgM+ de un homogenizado de bazo y riñón cefálico de Zf. Las células se detectaron con el monoclonal 4F6E7-FITC tras analizar por citometría de flujo 10000 células totales.

Células IgM+	Dilución del monoclonal 4F6E7-FITC				Control sin marcaje
	1/50	1/100	1/200	1/3000	
Células Totales	7,6	4,2	3,0	1,8	2,1
Linfocitos	12,8	1,7	0,6	0,5	0,2
Precursores	19	14	10,3	5,8	5,4

CONCLUSIÓN

El anticuerpo monoclonal 4F6E7 es capaz de reconocer las IgM totales en plasma o en la membrana celular, así como las IgMs específicas desarrolladas frente a un antígeno concreto.

Bibliografía

1. Howe, K., *et al.*, Nature, 2013. 496(7446): p. 498-503.

2. Chinchilla, B., *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol, 2015. 99(4): p. 1827-43.
3. Rocha, A., *et al.*, Veterinary Immunology Immunopathology, 2002. 86: p. 89-99.
- 5 4. Haste Andersen, P., *et al.* Protein Sci, 2006. 15(11): p. 2558-67.
5. Larsen, J.E., *et al.* Immunome Res, 2006. 2: p. 2.
6. Kolaskar, A.S. y P.C. Tongaonkar, FEBS Lett, 1990. 276(1-2): p. 172-4.
- 10 7. Lateef, S.S., *et al.*, J Biomol Tech, 2007. 18(3): p. 173-6.
8. Kohler, G. y C. Milstein, Nature, 1975. 256(5517): p. 495-7.
- 15 9. Babaei, F., *et al.*, J Proteome Res, 2013. 12(4): p. 1580-90.
10. Terron-Exposito, R., *et al.*, Plos One, 2012. 7(11): p. e48466.
11. Rocha, A., *et al.* Marine Biotechnology, 2005. 6: p. 401-410.
- 20 12. Ruiz, S., *et al.*, Vaccine, 2008. 26: p. 6620-6629.
13. LeBerre, M., P. *et al.* Bulletin Office International Epizooties, 1977. 87: p. 391-393.
- 25 14. de las Heras, A.I., *et al.* 2010. 28: p. 562-570.
15. de las Heras, A.I., *et al.* Fish & Shellfish Immunology, 2009. 27: p. 120-129.

30

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Anticuerpo según la reivindicación 1 donde el anticuerpo es de tipo IgG1.
3. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde dicho anticuerpo está expresado a partir de la línea celular de designación DSM ACC3243.
- 10 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho anticuerpo está conjugado con un fluorocromo, una enzima, un péptido o una proteína.
5. Antisero que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 6. Composición que comprende el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Célula que expresa el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 8. Célula según la reivindicación 7 donde dicha célula es la denominada DSM ACC3243.
9. Uso *in vitro* del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para la detección y/o cuantificación de anticuerpos IgM de *Danio rerio*.
- 25 10. Uso según la reivindicación 9 donde los anticuerpos IgM de *Danio rerio* reconocen la proteína G del VHSV.
- 30 11. Uso *in vitro* del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para el diagnóstico de enfermedades que cursan con variación en el número de anticuerpos IgM de *Danio rerio*.

12. *Uso in vitro* del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para el diagnóstico del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV).

5

13. *Uso in vitro* del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para el cribado de fármacos que varían el número de anticuerpos IgM de *Danio rerio*.

10

14. *Uso in vitro* del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o del antisuero según la reivindicación 5 para el cribado de antígenos reconocidos por anticuerpos IgM de *Danio rerio*.

15

15. *Uso* según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14 donde la detección y/o cuantificación, el diagnóstico o el cribado se realiza mediante ELISA, *western blot*, inmunoquímica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o citometría de flujo.

16. Método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de anticuerpos IgM de *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:

20

- a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el antisuero según la reivindicación 5; y
- b. detectar y/o cuantificar la unión específica.

25

17. Método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades que cursan con variación en el número de anticuerpos IgM de *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:

30

- a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el antisuero según la reivindicación 5; y
- b. detectar y/o cuantificar la unión específica del anticuerpo o del antisuero del paso (a);
- c. comparar la concentración de los anticuerpos IgM de pez cebra con un control;

35

- d. atribuir una diferencia significativa a la enfermedad.

18. Método *in vitro* para el diagnóstico del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV) que comprende las siguientes etapas:
- 5 a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el antisuero según la reivindicación 5; y
- b. detectar y/o cuantificar la unión específica a anticuerpos IgM específicos del VHSV.
19. Método *in vitro* para evaluar la protección frente al VHSV en *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:
- 10 a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el antisuero según la reivindicación 5; y
- b. detectar y/o cuantificar la unión específica a las IgM de *Danio rerio* que reconocen la proteína G del VHSV.
- 15 20. Método *in vitro* para para el cribado de fármacos que varían el número de anticuerpos IgM de *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:
- a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el antisuero según la reivindicación 5; y
- 20 b. detectar y/o cuantificar la unión específica.
21. Método *in vitro* para para el cribado de antígenos reconocidos por anticuerpos IgM de *Danio rerio* que comprende las siguientes etapas:
- 25 a. poner en contacto una muestra biológica de *Danio rerio* con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el antisuero según la reivindicación 5; y
- b. detectar y/o cuantificar la unión específica.
- 30 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 donde la detección y/o cuantificación se realiza mediante ELISA, *western blot*, inmunoquímica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o citometría de flujo.
- 35 23. Método de obtención de un anticuerpo monoclonal que reconoce la cadena pesada del anticuerpo IgM de *Danio rerio* que comprende:

- 5 a. obtener el suero previamente extraído de un animal no-humano
 inmunizado con una proteína recombinante que comprende el péptido de
 secuencia SEQ ID NO: 1,
- b. obtener un hibridoma a partir del suero que genere anticuerpos
10 monoclonales frente a la cadena pesada de los anticuerpos IgM de *Danio*
 rerio.
24. Método según la reivindicación 23, que comprende además una etapa (c) de
10 aislamiento del anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma generado en la etapa
 (b).
25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, donde el animal no-
 humano es un mamífero que se selecciona de la lista que consiste en cerdo,
 chimpancé, ratón, rata, conejo y cobaya.
15
26. Kit o dispositivo que comprende el anticuerpo según cualquiera de las
 reivindicaciones 1 a 4, el antisuero según la reivindicación 5, la composición según
 la reivindicación 6 o la célula según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
- 20 27. Uso del kit o dispositivo según la reivindicación 26 para llevar a cabo el método
 descrito en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22.

DIBUJOS

Fig. 1

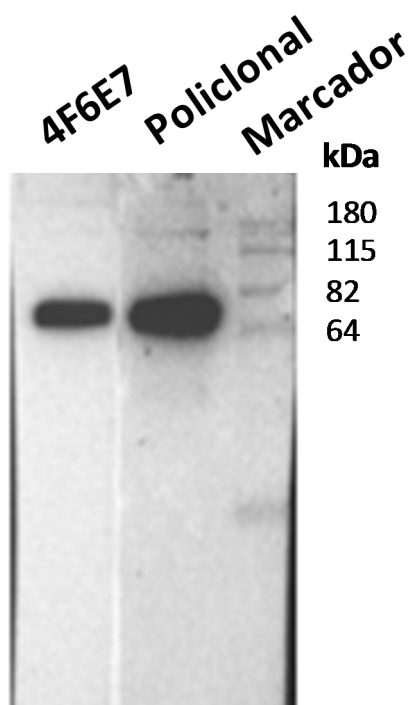


Fig. 2

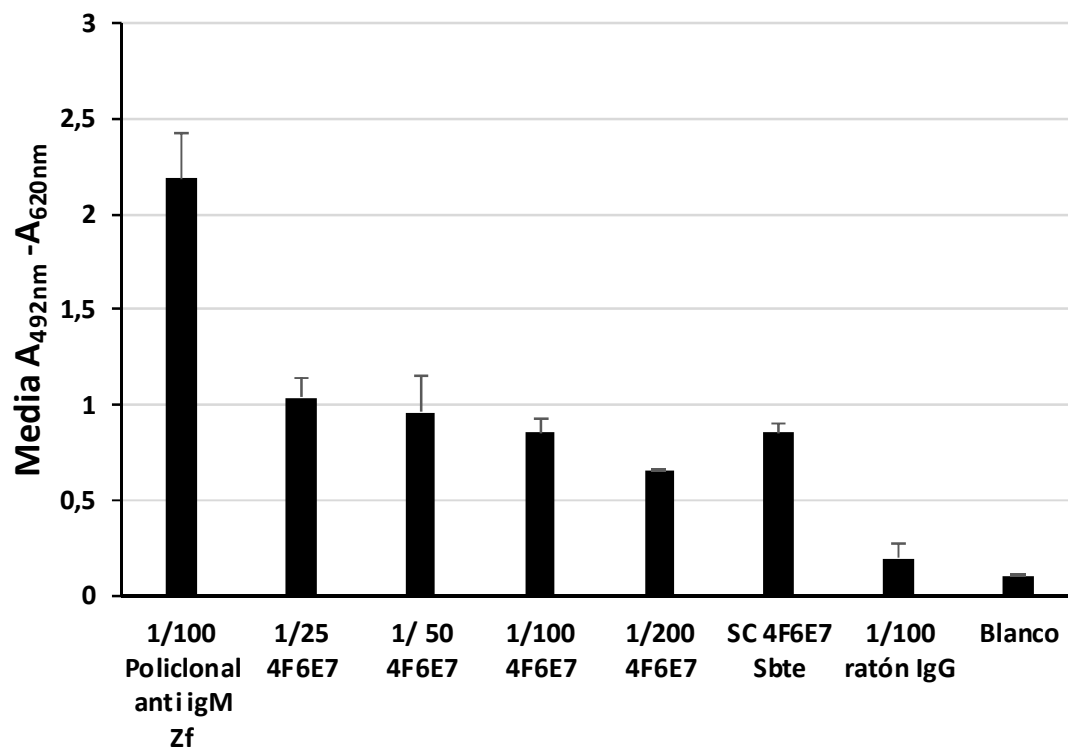


Fig. 3

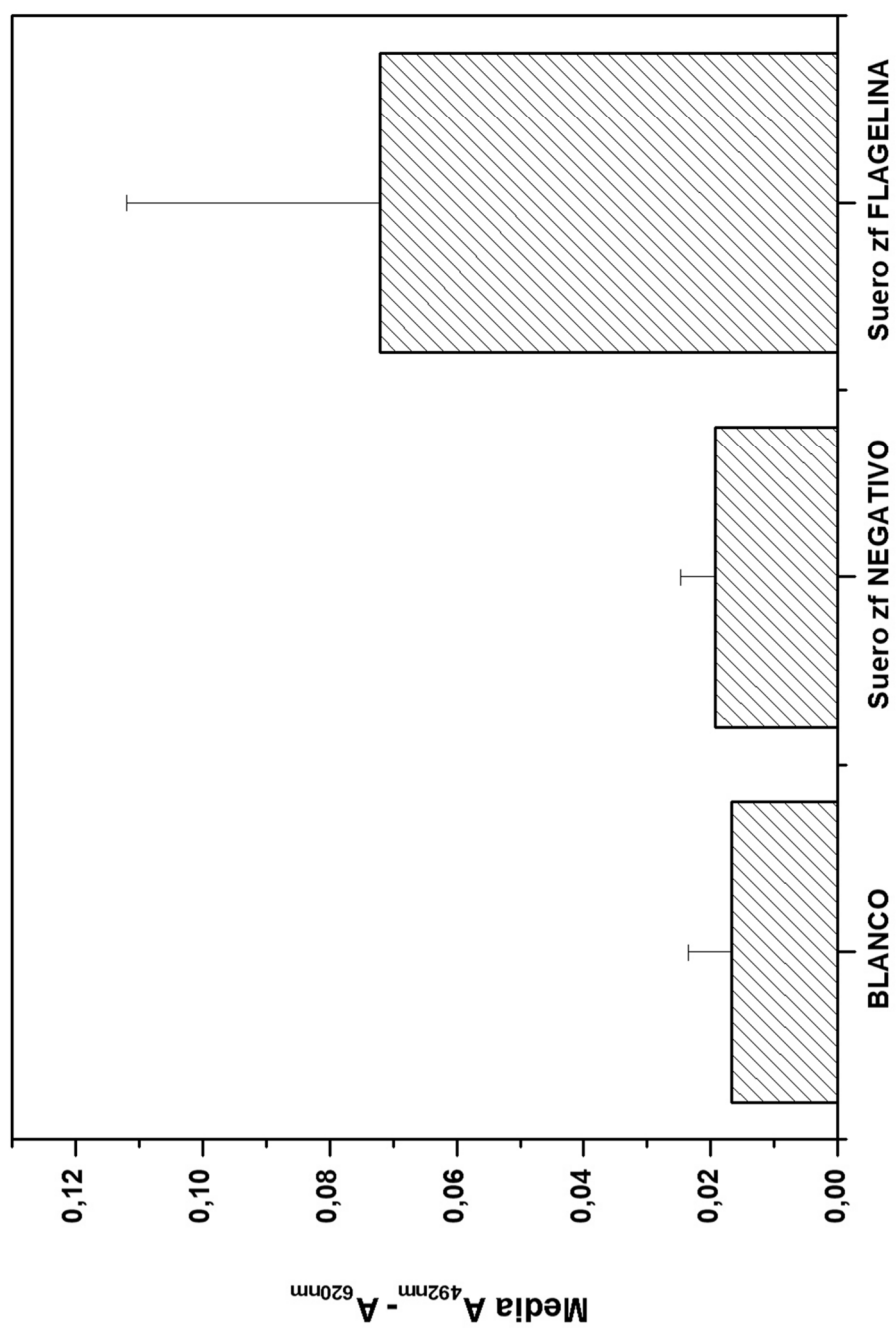


Fig. 4

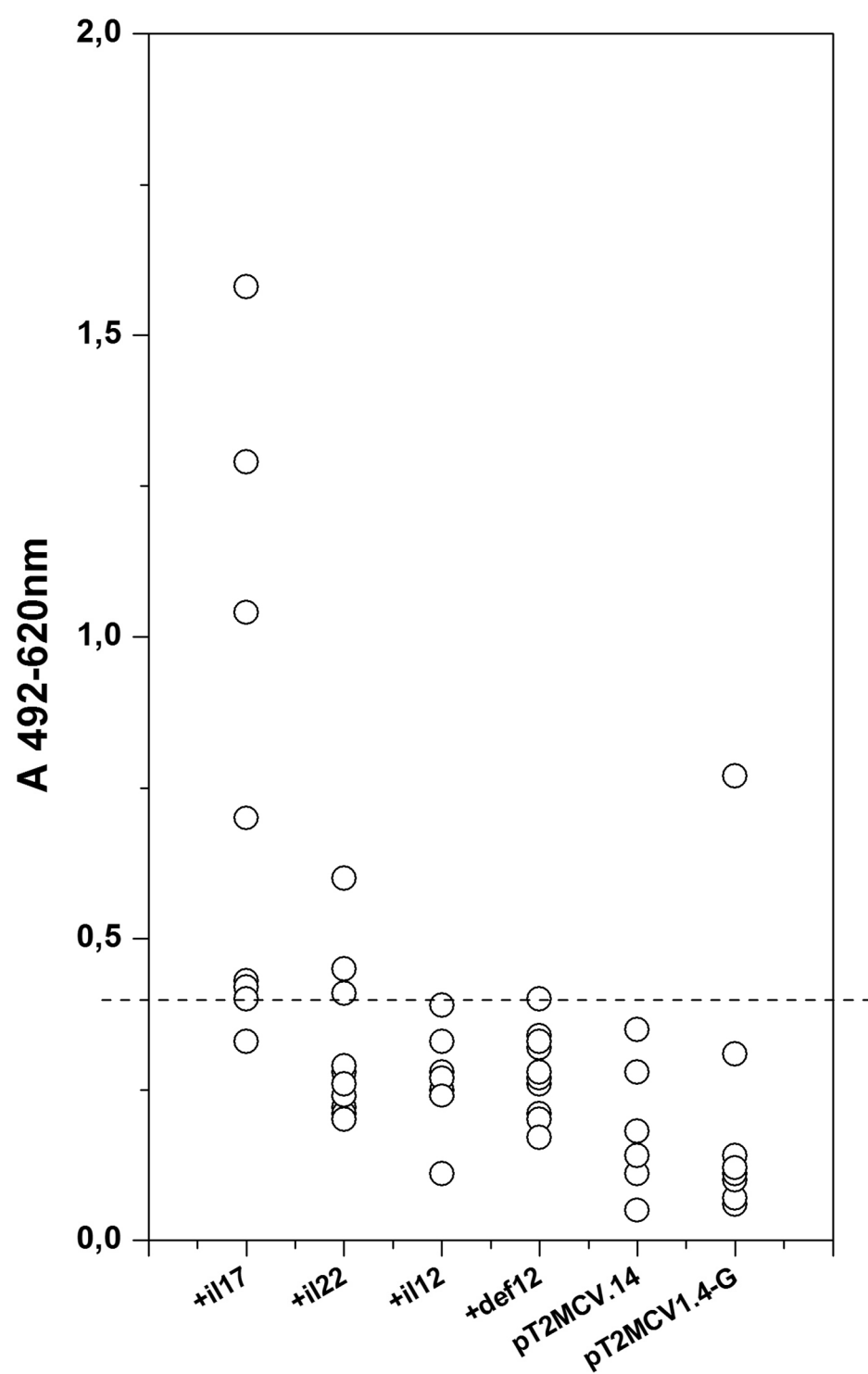
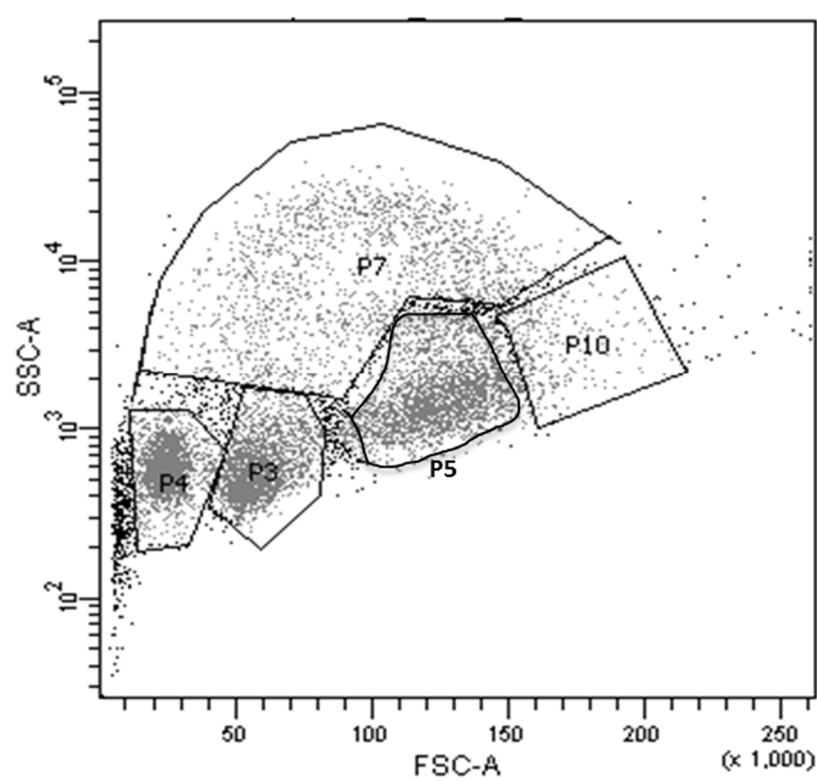


Fig 5



RESUMEN

Anticuerpo monoclonal para la detección de IgM totales y específicas de antígenos en pez cebra

5

En la presente invención se describe un anticuerpo monoclonal para la detección de IgM totales e IgM específicas en *Danio rerio*, así como sus usos y métodos que los utilizan para detección y/o cuantificación de dichas IgM, diagnóstico o cribado en pez cebra. También se refiere al antisuero, composición y kit que lo comprende así como a sus usos.

10

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)

<120> Anticuerpo monoclonal para la detección de IgM totales y específicas de antígenos en pez cebra

<130> ES3041.1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fragmento de la cadena pesada de la IgM-Zf

<400> 1

Leu Asn Phe Lys Trp Lys Asp Pro Ala Gly Lys Asp Leu Ser Asp Phe
1 5 10 15

Val Gln Tyr Pro
20

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fragmento de la cadena pesada de la IgM-Zf

<400> 2

Cys Asp Glu Pro Ala Tyr Gly Tyr Lys Asn Ser Thr Ser Glu Pro
1 5 10 15



Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Carretera de la Coruna Km 7.5
28040 Madrid
SPAIN

Inhoffenstraße 7 B
38124 Braunschweig
GERMANY
Tel.: +49(0)531 26 16-0
Fax: +49(0)531 26 16-418
E-mail: contact@dsMZ.de
Internet: www.dsmz.de

Ihr Zeichen/Your ref.

Unser Zeichen/Our ref.

+49 (0)531-2616-

Datum/Date

P154 14/B

254
vew@dsMZ.de

2014-07-04

Deposit of microorganisms according to the Budapest Treaty

Dear Sir or Madam,

enclosed please find our Statements of Receipt and Viability for the cell culture

4F6E7 anti-IgM-zf = DSM ACC3243

Sincerely yours,

Dr. Vera Bussas

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung
von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

P.S.: Please guard against loss of the cultures at your institution to be prepared to submit replacement cultures to the DSMZ if necessary.

Geschäftsführer/
Managing Director:
Prof. Dr. Jörg Overmann
Aufsichtsratsvorsitzender/Head of
Supervisory Board: MR Dr. Axel Kollatschny

Braunschweigische Landessparkasse
Kto.-Nr./Account: 2 039 220
BLZ/Bank Code: 250 500 00
IBAN DE22 2505 0000 0002 0392 20
SWIFT (BIC) NOLADE 2 H

Handelsregister/
Commercial Register:
Amtsgericht Braunschweig
HRB 2570
Steuer-Nr. 13/200/24030



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Carretera de la Coruna Km 7.5
28040 Madrid
SPAIN

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 4F6E7 anti-IgM-zf	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC3243
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: (x) a scientific description () a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2014-06-05 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Address: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2014-07-04

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Carretera de la Coruna Km 7.5
28040 Madrid
SPAIN

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Anschrift: Carretera de la Coruna Km 7.5 28040 Madrid SPAIN		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeeilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC3243 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2014-06-05	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2014-06-05 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (x) ³ lebensfähig () ³ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Anschrift: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2014-07-04	

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Carretera de la Coruna Km 7.5
28040 Madrid
SPAIN

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Address: Carretera de la Coruna Km 7.5 28040 Madrid SPAIN	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC3243 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2014-06-05
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2014-06-05 ² . On that date, the said microorganism was (X) ³ viable () ³ no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Address: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2014-07-04

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN



INTERNATIONALES FORMBLATT

Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Carretera de la Coruna Km 7.5
28040 Madrid
SPAIN

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: 4F6E7 anti-IgM-zf	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC3243
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde ☒ (X) eine wissenschaftliche Beschreibung ☐ () eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2014-06-05 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am _____ eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Anschrift: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2014-07-04

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.