



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 627**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/46** (2006.01)  
**C07K 14/61** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**A23K 1/165** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06753160 .8**  
96 Fecha de presentación : **23.06.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1911764**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **Polipéptidos estimulantes del crecimiento para uso en peces y crustáceos.**

30 Prioridad: **21.07.2005 CU 1352005**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.01.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.01.2010**

73 Titular/es: **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB)**  
**Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacan Playa**  
**Ciudad de la Habana 10600, CU**

72 Inventor/es: **Acosta Alba, Jannel;**  
**Estrada García, Mario Pablo;**  
**Carpio González, Yamila y**  
**Morales Fernández, Reynold**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 331 627 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

Polipéptidos estimulantes del crecimiento para uso en peces y crustáceos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología acuática, en particular a polipéptidos con una mayor actividad en comparación con la hormona de crecimiento de tilapia, y al uso de estos polipéptidos para aumentar la supervivencia y calidad de larvas tratadas por inmersión o como aditivo alimentario.

10

**Técnica anterior**

La búsqueda de agentes que promueven el crecimiento en organismos acuáticos ha sido un centro de atención para varios laboratorios de investigación. La hormona de crecimiento (GH) ha sido el objeto principal de esta investigación.

Se ha informado de la presencia de GH en mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. La GH o somatotropina es un polipéptido sintetizado y secretado por los somatotrofos de la hipófisis anterior en respuesta a péptidos hipotalámicos (Barinaga M., y col. (1985) Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314: 279-281). La GH está implicada en la regulación del crecimiento, el desarrollo, el metabolismo, el apetito y la osmorregulación en peces (Donaldson E. M., y col. (1979) Hormonal enhancement of growth. *Fish Physiol.* 8: 455-597). Aparte de sus efectos anabólicos sobre el crecimiento somático postnatal, en peces también tiene efecto sobre las células del sistema inmune. La GH promueve la proliferación de células T. Está bien documentada su actividad receptora de antígenos y su papel como coestimulador en la maduración de linfocitos (Harris H. y Bird D. J. (1997) The effects of  $\alpha$ -MSH and MCH on the proliferations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lymphocytes *in vitro*. En: Kawashima, S., Kikuyama, S., (Eds), *Advances in Comparative Endocrinology*. Monduzzi Editore, Bologna págs. 1023-1026a).

Es muy interesante su similitud estructural con varias citocinas tales como: IL-2, IL-4, IL-5, el factor estimulante de colonias de granulocitos, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos e interferón (Sprang S. R. y Bazan J. F. (1993) Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3: 815-827).

En mamíferos, la GH estimula la fagocitosis, la maduración y la diferenciación de timocitos (Ortega E., y col. (1996) Effects of prolactin on the *in vitro* phagocytic capacity of macrophages. *Comp. Immunol. Immunopathol.* 61: 389-393) y la apoptosis de células productoras de células T (Murphy W. J. y Longo D. L. (2000) Growth hormone as an immunomodulating therapeutic agent. *Immunol. Today* 121: 211-213). De forma similar, se ha estudiado el efecto de GH como estimuladora de la linfopoyesis y la fagocitosis en *Sparus aurata* y *Sparus sarba* junto con la mitogénesis de los leucocitos en *O. keta* (Sakai M., y col (1996) Increase in Haemolytic activity of serum from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with exogenous growth hormone. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 615-617), la fagocitosis, la activación de células NK, la producción de anticuerpos, la actividad hemolítica del complemento en *Oncorhynchus mykiss* (Yada T., y col. (1999) Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115: 46-52) y el estallido respiratorio de leucocitos en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y *Dicentrarchus labrax* (Muñoz P., y col. (1998) Modulation of the respiratory burst activity of Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by growth hormone and parasitic status. *Fish Shellfish Immunol.* 8: 25-36).

Se ha demostrado el aumento en los niveles plasmáticos de GH como resultado de la transferencia de *Salmo trutta* de agua dulce a agua salada, acompañado de niveles reducidos de hormonas tiroideas en correlación con un aumento en la actividad fagocítica de los leucocitos de pronefros y un aumento en la concentración de lisozima plasmática. Algunos estudios señalaron la expresión de receptores de GH y receptores de IGF específicos en linfocitos (Tapson V. F., y col. (1988) Structural and functional characterization of the human T lymphocyte receptor for insulin-like growth factor I *in vitro*. *Clin. C. Invest.* 82: 950-957). Se ha demostrado el efecto *in vitro* del IGF-I en la proliferación de células T. Se conoce bien el efecto inductor de IGF-I sobre células B, inmunoglobulina y células plasmáticas. Las células B muestran el mayor nivel de expresión de receptor de GH (Badolato R., y col. (1994) Differential expression of surface membrane growth hormone receptor on human peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorochrome flow cytometry. *J Clin Endocrinol Metab.* 79: 984-990).

La GH puede afectar a linfocitos B y T indirectamente a través de su efecto activador sobre macrófagos y monocitos (Edwards C. K., y col. (1988) A newly defined property of somatotropin: priming of macrophages for production of superoxide anion. *Science* 239: 769-771). En los últimos también promueve la quimiotaxis. Estas células también actúan sobre los linfocitos por secreción de citocinas. La GH revierte la deficiencia de células NK (Davila D. R., y col. (1987) Role of growth hormone in regulating T-dependent immune events in aged, nude, and transgenic rodents, *Neurosci. Res.* 18: 108-116).

El ADN complementario de varias hormonas de crecimiento de peces se ha clonado y secuenciado. Se ha demostrado el efecto potente de la GH recombinante sobre el crecimiento en peces por inyección (Tsai H. J., y col. (1993) Expression of rainbow trout growth hormone cDNA in yeast. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin.* 32: 162-170) o por inmersión

(Moriyama S. y Kawachi H. (1990) Growth stimulation of juvenile salmonids by immersion in recombinant salmon growth hormone. Nippon Suisan Gakkaishi 56: 31-34). El documento EP0387457 describe las proteínas hormonales de la hipófisis prolactina y hormonas de crecimiento de peces de agua caliente producidas por microorganismos.

5 La GH humana existe como un grupo heterogéneo de proteínas estructuralmente relacionadas que pueden encontrarse en la glándula hipofisaria (Baumann G., y col. (1983) The molecular nature of circulating growth hormone in normal and acromegalic man: evidence for a principal and minor monomeric forms, J. Clin. Endocrinol. Metab. 56: 946-952), plasma (Bauman G., y col. (1985) Molecular forms of circulating growth hormone during spontaneous secretory episodes and in the basal state. J. Clin. Endocrinol. Metab. 60: 1216-1220) y orina (Baumann G. y Abramson E. C. (1983) Urinary growth hormone in man: evidence for multiple molecular forms. Endocrinology 56: 305-311). La variante predominante de la GH humana es un polipéptido de 22 kDa compuesto por una cadena polipeptídica única. Este polipéptido constituye el 85% de las GH humanas inmunorreactivas (Lewis U. J., y col. (1994) Variant forms and fragments of human growth hormone in serum. Acta Paediatr. Suppl. 399: 29-31). Otras variantes de GH humana comprenden un polipéptido con una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de 20 kDa (Lewis U. J., y col. (1978) A naturally occurring structural variant of human growth hormone J. Biol. Chem. 253: 2679-2687), formas de 22 kDa acetiladas y desaminadas (Lewis U. J., y col. (1981) Altered proteolytic cleavage of human growth hormone as a result of deamidation. J. Biol. Chem. 256: 11645-11650) y una variante truncada que es el resultado de la escisión proteolítica que tiene dos cadenas polipeptídicas conectadas por un enlace disulfuro (Singh R. N. y col. (1974) Modified forms of human growth hormone with increased biological activities. Endocrinology 94: 883-891).  
 20 Varios estudios demostraron que la última variante es la más activa. Esta molécula es el resultado de digestiones con proteínas entre los aminoácidos 134 y 150 de la hGH de 22 kDa (Wroblewski V. J., y col. (1991) Proteolytic cleavage of human growth hormone (hGH) by rat tissues *in vitro*: influence on the kinetics of exogenously administered hGH. Endocrinology 129: 465-474). Se ha sugerido que la actividad biológica aumentada de esta variante truncada se debe a su estabilidad aumentada y al hecho de que tiene una tasa de aclaramiento metabólico inferior que las otras (Baumann G. (1979) Metabolic clearance rates of isohormones of human growth hormone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 49: 495-499).

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante permite el uso de bacterias y levaduras como sistemas huéspedes para la producción de proteínas de interés en un procedimiento relativamente económico. La levadura *Pichia pastoris* se usa ampliamente como un huésped para producir proteínas heterólogas. Este organismo ofrece los beneficios de otros sistemas tales como *E. coli* en relación con los altos niveles de expresión, la manipulación y el cultivo sencillos, y es capaz de combinar éstos con las ventajas de un sistema eucariota que realiza las modificaciones post-traduccionales tales como procesamiento proteolítico, plegamiento, glicosilación y formación de enlaces disulfuro (Higgins D. R. y Cregg J. M. (1998) Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia* protocols. Human Press Inc., Towota 1-15).

Como sistema de expresión, este sistema requiere una manipulación genética y molecular sencilla; es menos costoso que la expresión en células de insecto o cultivos de tejidos de mamífero debido a que los medios para el cultivo y la expresión no requieren complementos especiales. Esta levadura se adapta fácilmente a fermentaciones a gran escala y tiene preferencia por el crecimiento respiratorio, una característica fisiológica que facilita su cultivo a altas densidades.

Se han publicado varios estudios de estimulación del crecimiento usando levadura recombinante que expresa hormona de crecimiento. Se ha demostrado el efecto sobre el crecimiento de pollos después de la administración de piensos enriquecidos con *Pichia pastoris* recombinante que expresa GH (Chen C. M. y col. (2000) Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. Life Sciences 67: 2103-2115). Aparte, Tsai y col., 1993 obtuvieron un crecimiento acelerado por administración dietética de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que expresaba GH (Tsai H. J., y col. (1993) Enhancement of tilapia growth by dietary administration of recombinant yeast lysates as a supplement. J. Fish. Soc. Taiwan 20: 339-345).

50 Se ha protegido en la patente US 6.239.100 un polipéptido con una actividad similar a la hormona de crecimiento de peces y su uso para promover el crecimiento y reducir la mortalidad larvaria en peces.

Acelerar el crecimiento, aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de las larvas constituyen todavía uno de los problemas principales en la acuicultura.

55

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona una solución para el problema mencionado anteriormente con polipéptidos con las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N°: 7 y 8 que muestran una mayor actividad en comparación con la GH de tilapia, y su aplicación en peces y crustáceos. Como resultado principal, se descubrió que estos polipéptidos expresados extracelularmente en *Pichia pastoris*, que comprenden las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, producen un aumento en la velocidad de crecimiento, la supervivencia y la calidad de las larvas cuando se administran mediante baños de inmersión o como un aditivo alimentario a peces y crustáceos. Además, mejoran el estado inmune. Se demostró la superioridad de los polipéptidos en comparación con la hormona de crecimiento de tilapia.

El uso de estos polipéptidos en acuicultura tiene varias ventajas: 1) son moléculas más pequeñas que la GH de peces, entonces pueden absorberse por el organismo y alcanzar el torrente sanguíneo fácilmente; 2) como son frag-

## ES 2 331 627 T3

mentos de la GH de peces, no tienen actividad biológica en seres humanos; 3) tienen un efecto más fuerte sobre el crecimiento que la GH de peces; 4) tienen efectos perceptibles sobre el crecimiento, la supervivencia y la calidad de las larvas en una amplia variedad de especies de peces.

5 La patente US 6.239.100 protege el uso de un polipéptido con una actividad similar respecto a la GH de peces para estimular el crecimiento y reducir la mortalidad de larvas de peces. La secuencia descrita para este polipéptido tiene una homología del 73% en comparación con la GH de tilapia y carece de 51 nucleótidos del N-terminal. Los polipéptidos de la invención se obtuvieron a partir de la hormona de crecimiento de tilapia. El polipéptido de la SEC ID N°: 7 carece de un fragmento de 46 aminoácidos que se corresponde con el C-terminal. El polipéptido de la SEC ID N°: 8 carece del mismo fragmento en el C-terminal y de 17 aminoácidos en el N-terminal.

10 Distintos al polipéptido presentado en la patente US 6.239.100 que tiene una actividad similar a GH, los polipéptidos de la invención tienen una mayor actividad en comparación con GH. Esta actividad no es específica de especie. Aparte, el polipéptido de la SEC ID N°: 7 que carece de un fragmento en el C-terminal tiene una actividad promotora del crecimiento superior al polipéptido de la SEC ID N°: 8.

15 En la materialización de la invención, la composición que comprende cualquiera de los polipéptidos definidos en las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 7 y 8 estimula el crecimiento en peces y crustáceos.

20 La presente invención implicaba la clonación de la secuencia codificante de los polipéptidos mencionados anteriormente en un vector de expresión en *Pichia pastoris* pPS10.

25 La secuencia codificante para estos polipéptidos se obtuvo por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando el ADNc de tiGH previamente clonado en pR17 como molde (Guillén I. I., y col. (1998) Physiological changes in the juvenile euryhaline teleost, the tilapia *Oreochromis hornorum*, injected with *E. coli*-derived homologous growth hormone. *J Mar. Biotechnol.* 6: 142-51). La hormona de crecimiento de tilapia también se amplificó por PCR a partir del mismo vector (pR17).

30 El vector usado en la construcción genética para la expresión de proteínas diana en *Pichia pastoris* contiene el promotor de *AOX1* de *Pichia pastoris* (pAOX1), el péptido señal de la sacarosa invertasa 2 de *S. cerevisiae* (spSUC 2) y la señal de terminación de la enzima gliceraldehído-3P-deshidrogenasa (GAPt) de *S. cerevisiae*. También contiene un fragmento de ADN cromosómico correspondiente a la región de *AOX 3'* necesaria para la recombinación homóloga entre la levadura y el gen de *HIS3* de *S. cerevisiae* que es el marcador de selección de levaduras. El vector tiene un origen de replicación funcional en *E. coli* y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias. Los vectores usados para generar cepas de *Pichia pastoris* recombinantes generalmente son vectores de integración. Antes de la transformación los plásmidos deberían linealizarse para facilitar la recombinación homóloga por el gen *AOX1*.

35 La cepa MP36 de *Pichia pastoris* se usó para la producción extracelular de las proteínas recombinantes. Esta cepa es un mutante auxótrofo de *his3* obtenido de la cepa BKM-90 de *Pichia pastoris* (documento EP 00438200) que adquirió el fenotipo His+ después de la transformación con el vector de expresión (Yong V., y col. (1992) HIS-3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* complement his mutation in yeast *Pichia pastoris*. *Biotecnología aplicada* 9: 55-61).

45 Varios estudios han demostrado un efecto estimulante del crecimiento por administración por inmersión de GH recombinante en diferentes especies de peces. No obstante, esta invención es la primera descripción de la estimulación del crecimiento en peces por inmersión en sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen polipéptidos con una mayor actividad en comparación con GH sin una purificación previa de las proteínas diana.

50 El efecto de los polipéptidos descritos en la presente invención sobre el crecimiento, la resistencia a patógenos y los parámetros del sistema inmune se ensayó en larvas de tilapia y se comparó con la hormona de crecimiento de tilapia.

55 Los tratamientos se administraron por inmersión. Los grupos experimentales eran:

- Sobrenadantes de cultivo de cepa MP36 de *Pichia pastoris* recombinante que contienen los polipéptidos.
- Sobrenadantes de cultivo de cepa MP36 de *Pichia pastoris* recombinante que contienen la GH de tilapia.
- 60 ➤ Un control negativo que contiene sobrenadantes de cultivo de MP36 de *Pichia pastoris* no transformada.
- Grupo no tratado.

65 Los resultados mostraban que el grupo tratado con los polipéptidos aumenta significativamente su peso en comparación con grupos con tiGH, control negativo y no tratados.

## ES 2 331 627 T3

Para analizar el efecto sobre el sistema inmune, se homogeneizaron 20 animales. Se midió la presencia de diferentes factores humorales inespecíficos tales como lisozima y lectinas y los siguientes parámetros de estrés oxidativo.

5 > Glutatión reducido: La GSH es un cofactor de la enzima glutatión peroxidasa. Es uno de los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. No se encontró ninguna diferencia estadística entre grupos. No obstante, existe una tendencia a aumentar en los grupos tratados con polipéptidos 1 y 2.

10 > Superóxido dismutasa: La SOD es una enzima que pertenece a las defensas antioxidantes. Captura los radicales superóxido libres. No se encontró ninguna diferencia estadística entre grupos. Existe una tendencia a aumentar en los grupos tratados con polipéptidos 1 y 2.

15 > Organoperóxidos totales: Es uno de los elementos del sistema prooxidante y uno de los precursores de radicales hidroxilo. También podía ser un inductor de la expresión génica, la activación del mecanismo celular y regulador de fosfatasa y quinasas. También es un cofactor para la Glutatión-S-transferasa que está implicada en la detoxificación de xenobióticos. No existen diferencias estadísticas significativas entre grupos.

20 > Catalasa: Es un indicador de estrés oxidativo que produce oxidación de biomoléculas. Cuando los niveles de catalasa están aumentados indican la presencia de radicales libres que no pueden metabolizarse mediante la glutatión peroxidasa. A los 21 días desde el comienzo del experimento no había diferencias estadísticas entre grupos. A los 45 días, los niveles de catalasa disminuían en los grupos tratados con los polipéptidos respecto a los controles.

25 > Potencial de peroxidación. Es un indicativo de oxidación de lípidos. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en grupos tratados en comparación con no tratados, con una mayor tendencia en los grupos tratados con polipéptidos 1 y 2.

> Oxidación de proteínas. Es un indicativo de oxidación de proteínas. No se encontraron diferencias estadísticas entre grupos.

30 Puesto que el potencial de peroxidación es un indicativo de estrés oxidativo en los organismos, se puede deducir que los polipéptidos ensayados producían cierto estrés oxidativo en comparación con el grupo no tratado. El estrés oxidativo es un acontecimiento regulador importante. A los 45 días desde el comienzo del experimento, aún cuando existe estrés oxidativo con un efecto sobre la oxidación de lípidos, los niveles de catalasa disminuyen significativamente entre grupos tratados en comparación con no tratados. Este acontecimiento indica niveles disminuidos de radicales  
35 libres y estrés oxidativo.

Los lípidos proporcionan la mayor relación de energía/masa en comparación con otras biomoléculas que almacenan energía. Se ha demostrado que la GH inhibe la lipogénesis y activa la lipólisis y los ácidos grasos producidos son sustratos oxidativos ideales. Como consecuencia, los aminoácidos pasan del procedimiento oxidativo al crecimiento.  
40 La oxidación de lípidos observada en el experimento podía estar relacionada con este procedimiento.

Otros parámetros relacionados con el sistema inmune son lisozimas y lectinas. La lisozima es uno de los componentes de las funciones inmunes inespecíficas contra infecciones víricas y bacterianas. Se ha observado una correlación entre los niveles de lisozima y la GH en peces (Yada T., y col. (2002) Immunomodulatory effects of prolactin and  
45 growth hormone in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. J. Endocrinol. 173: 483-492).

Las lectinas reaccionan con una serie diversa de patógenos y confieren inmunidad innata a los organismos (Alexander J. B. e Ingram G. A., (1992) Noncellular nonspecific defence mechanism of fish. Annu. Rev. Fish. Dis. 2: 249-  
50 279).

Los inventores observaron diferencias estadísticas significativas en ambos parámetros en los grupos tratados con polipéptidos 1 y 2 en comparación con el grupo no tratado.

El efecto de estos polipéptidos también se ensayó en larvas de peces ornamentales. Eran capaces de estimular el crecimiento y la supervivencia en grupos tratados con polipéptidos en comparación con controles. También mejoran la pigmentación de los peces. Este parámetro es crucial para la comercialización de peces ornamentales. Se demostró que el efecto producido por estos polipéptidos era visible 15 días después de que se interrumpieran los tratamientos.

### 60 Breve descripción de la figuras

Figura 1. Estrategia de clonación en el vector de expresión en *Pichia pastoris*.

65 Figura 2. Análisis de la expresión de transformantes que muestran un fenotipo Mut<sup>s</sup>. La transferencia de Western de las proteínas diana expresada en sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris*. Carril 1: MP36 sin transformar; Carril 2: Polipéptido 1; Carril 3: Polipéptido 2; Carril 4: hormona de crecimiento de tilapia.

## ES 2 331 627 T3

Figura 3. Experimento de crecimiento en larvas de tilapia por inmersión en sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen las proteínas de interés a la dosis de 0,1 mg/litro de agua. La gráfica representa el peso corporal medio de grupos tratados en comparación con controles negativos.

5 Figura 4. Experimento de crecimiento en larvas de carpa dorada por inmersión en sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen las proteínas de interés a la dosis de 0,1 mg/litro de agua. La gráfica representa el peso corporal medio de grupos tratados en comparación con controles negativos.

10 Figura 5. Experimento de crecimiento en larvas de carpa dorada por inmersión en sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen las proteína de interés a la dosis de 0,1 mg/litro de agua. La gráfica representa el porcentaje de supervivencia de los grupos experimentales a los 45 días desde el comienzo del experimento.

15 Figura 6. Experimento de crecimiento en larvas de carpa dorada por inmersión en sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen las proteínas de interés a la dosis de 0,1 mg/litro de agua. Los peces tratados muestran colores más brillantes que los controles negativos.

20 Figura 7. Experimento de crecimiento en larvas de carpa por inmersión en sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen polipéptido 1 a tres dosis diferentes (0,02; 0,1 y 0,5 mg por litro de agua). La gráfica representa el peso corporal medio del grupo tratado en comparación con un control negativo.

25 Figura 8. Experimento de crecimiento en tilapia por administración en pienso de los sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen polipéptido 1 a dos dosis diferentes (4,8 mg del polipéptido/kg de pienso y 38,4 mg del polipéptido/kg de pienso). La gráfica representa el peso corporal medio de los grupos tratados en comparación con el control negativo.

### Descripción detallada de realizaciones particulares/Ejemplos

#### Ejemplo 1

30 *Construcción de los vectores de expresión de Pichia pastoris que contienen las secuencias codificantes para los polipéptidos que son los objetos de la presente invención y hormona de crecimiento de tilapia, transformación en la cepa MP36 y expresión de la proteínas de interés*

35 Las secuencias codificantes para los polipéptidos mencionados anteriormente se obtuvieron por PCR con oligonucleótidos específicos usando ADNc de tilapia como molde previamente clonado en el vector pR17. Para amplificar la secuencia codificante para el polipéptido de la SEC ID N°: 7, se usaron los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2. Para amplificar la secuencia codificante para el polipéptido de la SEC ID N°: 8, se usaron los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de la SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4.

40 La secuencia codificante para tiGH se amplificó por PCR a partir del vector pR17 usando los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de la SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6. Los productos de PCR se trataron con la enzima polinucleótido quinasa para fosforilar los extremos del gen y facilitar su clonación en un vector de expresión. El vector de expresión en *Pichia pastoris* pPS10 se digirió enzimáticamente con la endonucleasa de restricción Nae I y se trató con fosfatasa alcalina para desfosforilar los extremos. Los genes que codifican los polipéptidos de interés y tiGH se ligaron en el vector de expresión usando ADN ligasa de T4 (Figura 1).

45 Antes de la transformación, los plásmidos se linealizaron con la enzima *Sph* I. La cepa MP36 de *Pichia pastoris* se transformó por electroporación con el vector de expresión recombinante. Esta cepa es un mutante auxótrofo de his3 que adquirió un fenotipo His<sup>+</sup> después de la transformación.

50 Los transformantes, identificados por transferencia puntual, también se analizaron mediante transferencia de Southern para determinar en cuales se producía la integración por sustitución del gen *AOX1* de *P. pastoris* por el casete de expresión del plásmido recombinante.

55 Este acontecimiento de integración produce un fenotipo Mut<sup>s</sup> (bajos niveles de utilización de metanol) e His<sup>+</sup>. La sustitución genética de *AOX1* se produce por recombinación entre las regiones promotoras de *AOX1* y 3' *AOX1* en el vector y genoma. Como resultado de la recombinación, se produce una delección en la región codificante de *AOX1*. Las cepas recombinantes con un fenotipo Mut<sup>s</sup> sostienen la producción de alcohol oxidasa en el gen *AOX2* y tienen una velocidad de crecimiento reducida en metanol.

60 Los genes que codifican los polipéptidos de interés y la hormona de crecimiento de tilapia están bajo la regulación del promotor de *AOX1*, inducible por metanol, y tienen un péptido señal. *Pichia pastoris* secreta bajos niveles de proteínas propias y su medio de cultivo no necesita proteínas como complementos. Por lo tanto, puede esperarse que una proteína heteróloga secretada constituirá un alto porcentaje de las proteínas totales en el medio (más del 80%) (Tschopp y col.; Bio/Technology 1987, 5: 1305-1308; Barr y col.; Pharm. Eng. 1992, 12: 48-51). La producción de las proteínas recombinantes explicada en esta invención se realizó en biorreactores de 5 l con la adición de metanol al cultivo. Como se muestra en la figura 2, se usó una transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal específico para GH de tilapia para comprobar la expresión de la proteína en sobrenadantes de cultivo.

## ES 2 331 627 T3

### Ejemplo 2

*Experimento de crecimiento en tilapia por inmersión con sobrenadantes de cultivo de P. pastoris que contienen polipéptidos de interés. Efectos sobre el sistema inmune*

El experimento se realizó por inmersión, tres veces por semana durante 90 min. La dosis era de 0,1 mg de proteína diana/litro de agua. Los grupos experimentales eran:

1. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contiene polipéptido 1 (tratamiento 1).
2. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contiene polipéptido 2 (tratamiento 2).
3. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contiene GH de tilapia (tratamiento 3).
4. Grupo de control negativo tratado con sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* sin transformar (control negativo).
5. Grupo no tratado.

A los 45 días desde el comienzo del experimento las larvas tratadas con el polipéptido de la SEC ID N°: 7 tenían un aumento de peso 3,6, 2,1 y 1,6 veces superior en comparación con el grupo no tratado, el control negativo y el grupo tratado con tiGH, respectivamente. Por otro lado, las larvas tratadas con el polipéptido de la SEC ID 8 tenían un aumento de peso 3,2 veces superior en comparación con el grupo no tratado, 1,9 veces en comparación con el control negativo y 1,4 veces en comparación con el grupo tratado con tiGH (Tabla 1, Tabla 1.1, Figura 3).

TABLA 1

*Promedio del peso corporal de los grupos (g)*

	<b>Control negativo</b>	<b>Hormona de crecimiento</b>	<b>Grupo no tratado</b>	<b>Polipéptido de la SEC ID N°: 7</b>	<b>Polipéptido de la SEC ID N°: 8</b>
<b>Semana 3</b>	0,055 ± 0,037	0,084 ± 0,042	0,033 ± 0,020	0,099 ± 0,058	0,092 ± 0,055
<b>Semana 6</b>	0,120 ± 0,046	0,159 ± 0,067	0,071 ± 0,026	0,254 ± 0,093	0,227 ± 0,082
La masa se muestra como media ± D. T.					

## ES 2 331 627 T3

TABLA 1.1

*Análisis estadístico a los 45 días desde el comienzo del experimento*

<b>Ensayo de comparaciones múltiples de Tukey</b>	<b>Valor P</b>
Control negativo frente a hormona de crecimiento	P > 0,05
Control negativo frente a polipéptido de la SEC ID N°: 8	P < 0,001
Control negativo frente a polipéptido de la SEC ID N°: 7	P < 0,001
Control negativo frente a grupo no tratado	P < 0,05
Hormona de crecimiento frente a polipéptido de la SEC ID N°: 8	P < 0,01
Hormona de crecimiento frente a polipéptido de la SEC ID N°: 7	P < 0,001
Hormona de crecimiento frente a grupo no tratado	P < 0,001
Polipéptido de la SEC ID N°: 8 frente a polipéptido de la SEC ID N°: 7	P > 0,05
Polipéptido de la SEC ID N°: 8 frente a grupo no tratado	P < 0,001
Polipéptido de la SEC ID N°: 7 frente a grupo no tratado	P < 0,001

Estos son resultados muy importantes puesto que la aceleración del crecimiento en fases tempranas del desarrollo de peces económicamente importantes produce un aumento de supervivencia que es crucial para aumentar las productividades de cultivos.

Para analizar el efecto sobre el sistema inmune, se tomaron 20 animales por grupo a los días 21 y 45 desde el comienzo del experimento. Las larvas se homogeneizaron y se midieron diferentes parámetros del estrés oxidativo: GSH, SOD, organoperóxidos totales, catalasa, peroxidación potencial y oxidación de proteínas.

Los inventores observaron diferencias en el potencial de peroxidación entre grupos tratados en comparación con control negativo a los 21 días desde el comienzo del experimento.

Los inventores midieron la actividad de lisozima en extractos de larvas de 45 días desde el comienzo del experimento. La actividad de lisozima de muestras (homogeneizados larvarios) se midió usando un procedimiento basado en la capacidad de la lisozima para lisar la bacteria *Micrococcus lysodeikticus*. En una microbandeja de 96 pocillos, se mezclaron 100  $\mu$ l de muestras en cuatro diluciones seriadas de dos veces en tampón fosfato (0,05 M, pH 6,2) con 100  $\mu$ l de una suspensión 3 mg/ml de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma). La microbandeja se incubó a 22°C y la D. O. se leyó a 450 nm a los 0, 15, 30 y 60 min. Para un control positivo, los homogeneizados larvarios se sustituyeron por lisozima de clara de huevo de gallina (comenzando las diluciones seriadas a 8  $\mu$ g/ml) y para un control negativo, el tampón sustituyó a los homogeneizados larvarios. Una unidad de actividad lisozima se definió como la cantidad de homogeneizados larvarios que causaban una disminución en la lectura de D. O. de 0,001  $\text{min}^{-1}$ . Se observaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos tratados con los polipéptidos de la SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 en comparación con el grupo no tratado (Tabla 2).

También los inventores realizaron un ensayo de hemaglutinación para medir lectinas en homogeneizados larvarios. Se realizaron diluciones seriadas de dos veces de extractos de larvas usando PBS a pH 7,2 en pocillos de microtitulación con fondo en forma de U (96 pocillos, Greiner, Microlon) a los que se añadió un volumen equivalente de suspensión de eritrocitos al 2% recién preparada (de conejo en PBS). Los pocillos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y el título se leyó a simple vista y era igual a la dilución en el último pocillo que mostraba aglutinación (según se manifestaba por una capa de células distribuida uniformemente sobre el fondo del pocillo entero). Se examinó la actividad de hemaglutinina de muestras y se obtuvo para cada valor de título. La actividad se expresó como título, es decir, el recíproco de la mayor dilución que muestra aglutinación completa.

## ES 2 331 627 T3

Los inventores observaron diferencias estadísticas significativas entre grupos tratados con los polipéptidos de la SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 en comparación con el grupo no tratado (Tabla 3).

5

TABLA 2

*Concentración de lisozima ( $\mu\text{g/ml}$ ) en los extractos de larvas a los 45 días desde el comienzo del experimento*

10

Polipéptido de la SEC ID N°: 7	Polipéptido de la SEC ID N°: 8	Hormona de crecimiento	Control negativo	Grupo no tratado
2,596 $\pm$ 0,425*	2,598 $\pm$ 0,430*	2,250 $\pm$ 0,162	2,246 $\pm$ 0,160	1,404 $\pm$ 0,700
La concentración se muestra como medias $\pm$ D. T.				

15

20

ANOVA, ensayo de Turkey; \* indica una diferencia significativa  $P < 0,05$ .

25

TABLA 3

*Título de actividad de hemaglutinina (el recíproco de la mayor dilución que muestra aglutinación completa) en los extractos de larvas a los 45 días desde el comienzo del experimento*

30

	Polipéptido de la SEC ID N°: 7	Polipéptido de la SEC ID N°: 8	Hormona de crecimiento	Control negativo	Grupo no tratado
Título	4*	4*	2	2	1
ANOVA, ensayo de Turkey; * indica una diferencia significativa $P < 0,05$					

35

40

45

### Ejemplo 3

*Experimento de estimulación del crecimiento y mejora en la calidad de las larvas en carpa dorada mediante baños de inmersión con sobrenadantes de cultivo de *P. pastoris* que contienen los polipéptidos de interés*

50

Se diseñaron cuatro grupos experimentales. Los tratamientos consistían en baños de inmersión, tres veces por semana durante 90 min. La dosis era de 0,1 mg de proteína diana/litro de agua. Los grupos experimentales eran:

55

1. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contiene polipéptido 1 (tratamiento 1).
2. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contiene polipéptido 2 (tratamiento 2).
3. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contiene GH de tilapia (tratamiento 3).
4. Grupo de control negativo tratado con sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* sin transformar (control negativo).

60

A los 45 días desde el comienzo del experimento, los tratamientos 1 y 2 mostraban un aumento de peso significativo en comparación con los tratamientos 3 y 4.

65

A los 75 días, las larvas tratadas con los polipéptidos de la SEC ID N°: 7 y de la SEC ID N°: 8 tenían un aumento de peso 2 veces superior en comparación con el control negativo y 1,5 veces en comparación con el grupo tratado con tiGH (Tabla 4; Tabla 4.1; Figura 4). Aparte, los tratamientos 1, 2 y 3 mostraban un aumento en la supervivencia en comparación con el control negativo (Figura 5).

## ES 2 331 627 T3

El color del pez ornamental es un parámetro muy importante para su comercialización. En este experimento, se observó que las larvas bajo los tratamientos 1 y 2 mostraban color en una fase temprana del desarrollo en comparación con el control negativo. A los 75 días después desde el comienzo del experimento tenían colores más brillantes (Figura 6).

Se obtuvieron resultados similares con otras especies de peces ornamentales.

TABLA 4

*Promedio del peso corporal de los grupos (g)*

	<b>Polipéptido de la SEC ID N°: 7</b>	<b>Polipéptido de la SEC ID N°: 8</b>	<b>Hormona de crecimiento</b>	<b>Control negativo</b>
<b>45 días</b>	0,132 ± 0,083	0,137 ± 0,088	0,087 ± 0,099	0,042 ± 0,024
<b>75 días</b>	0,613 ± 0,198	0,625 ± 0,184	0,405 ± 0,156	0,307 ± 0,169

La masa se muestra como media ± D. T.

TABLA 4.1

*Análisis estadístico a los 75 días desde el comienzo del experimento*

<b>Ensayo de comparaciones múltiples de Tukey</b>	<b>Valor P</b>
Control negativo frente a hormona de crecimiento	P > 0,05
Control negativo frente a polipéptido de la SEC ID N°: 8	P < 0,001
Control negativo frente a polipéptido de la SEC ID N°: 7	P < 0,001
Hormona de crecimiento frente a polipéptido de la SEC ID N°: 8	P < 0,001
Hormona de crecimiento frente a polipéptido de la SEC ID N°: 7	P < 0,001
Polipéptido de la SEC ID N°: 8 frente a polipéptido de la SEC ID N°: 7	P > 0,05

### Ejemplo 4

#### *Experimento de crecimiento en carpas mediante baños de inmersión con diferentes dosis de polipéptido 1*

Los inventores examinaron el efecto de diferentes dosis del polipéptido 1 sobre el crecimiento en larvas de carpa. Se diseñaron cuatro grupos experimentales:

1. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contenía el polipéptido de la SEC ID 7 a la dosis de 0,02 mg de polipéptido/litro de agua (tratamiento 1).

2. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contenía el polipéptido de la SEC ID 7 a la dosis de 0,1 mg de polipéptido/litro de agua (tratamiento 2).

3. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contenía el polipéptido de la SEC ID 7 a la dosis de 0,5 mg de polipéptido/litro de agua (tratamiento 3).

4. Grupo no tratado.

## ES 2 331 627 T3

A los 30 días desde el comienzo del experimento las larvas tratadas con la dosis de 0,5 mg de polipéptido de la SEC ID 7/litro de agua tenían un aumento de peso 2,75 veces superior en comparación con el grupo no tratado. Por otro lado, las larvas tratadas con 0,1 mg de polipéptido de la SEC ID 7/litro de agua tenían un aumento de peso 1,8 veces superior en comparación con el grupo no tratado. No existen diferencias estadísticas entre el grupo no tratado y el grupo tratado con la dosis mínima (Tabla 5; Tabla 5.1; Figura 7).

TABLA 5

*Promedio del peso corporal de los grupos (g)*

	<b>Grupo no tratado</b>	<b>Dosis de 0,5 mg/l</b>	<b>Dosis de 0,1 mg/l</b>	<b>Dosis de 0,02 mg/l</b>
<b>30 días</b>	0,094 ± 0,055	0,258 ± 0,127	0,169 ± 0,080	0,108 ± 0,059

La masa se muestra como media ± D. T.

TABLA 5.1

*Análisis estadístico a los 30 días desde el comienzo del experimento*

<b>Ensayo de comparaciones múltiples de Tukey</b>	<b>Valor P</b>
0,5 mg/l frente a 0,1 mg/l	P < 0,01
0,5 mg/l frente a 0,02 mg/l	P < 0,001
0,5 mg/l frente a control	P < 0,001
0,1 mg/l frente a 0,02 mg/l	P < 0,05
0,1 mg/l frente a control	P < 0,01
0,02 mg/l frente a control	P > 0,05

### Ejemplo 5

*Experimento de crecimiento en larvas de camarón Litopenaeus schmitti mediante inmersión en sobrenadantes de cultivo de P. pastoris que contienen los polipéptidos de interés*

Se diseñaron tres grupos experimentales. Los tratamientos consistían en baños de inmersión tres veces por semana durante 1:30 h. La dosis era de 0,1 mg de proteína de interés/litro de agua. Los grupos experimentales eran:

1. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contiene polipéptido de la SEC ID 7 (tratamiento 1).
2. Grupo tratado con el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* que contiene polipéptido de la SEC ID 8 (tratamiento 2).
3. Grupo de control negativo tratado con sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* sin transformar (control negativo).

Como resultado del experimento, los inventores obtuvieron una mejora en la calidad de las larvas en los camarones tratados con los polipéptidos de interés. Las larvas tratadas con los polipéptidos de la SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 tenían un aumento en el peso corporal 2,3 veces superior respecto al control negativo, más ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales. El ensayo estadístico correspondiente se realizó para cada parámetro y se encontraron diferencias estadísticas significativas en todos los casos.

## ES 2 331 627 T3

### Ejemplo 6

#### *Experimento de crecimiento en tilapia por administración en pienso de polipéptido de la SEC ID 7 a diferentes dosis*

5 Los inventores midieron el efecto de dos dosis del polipéptido de la SEC ID N°: 7 sobre el crecimiento en tilapias juveniles con un peso inicial de  $72,99 \pm 3,25$  g. Las dosis ensayadas eran de 4,8 mg del polipéptido de la SEC ID N°: 7/kg de pienso y 38,4 mg del polipéptido de la SEC ID N°: 7/kg de pienso. Se preparó una formulación oral por incorporación del sobrenadante de cultivo de *Pichia pastoris* que contenía el polipéptido de interés en la dieta basal. El control negativo eran tilapias alimentadas con dieta basal enriquecida con sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* sin transformar. Durante el experimento los animales se alimentaron dos veces al día con el pienso equivalente al 5% del peso corporal durante 6 semanas.

15 El polipéptido de la SEC ID N°: 7 incluido en la dieta a la dosis de 4,8 mg del polipéptido de la SEC ID N°: 7/kg de pienso aumentaba el crecimiento en el 22% en comparación con el grupo de control con diferencias muy estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). La dosis de 38,4 mg del polipéptido de la SEC ID N°: 7/kg de pienso no mostraba diferencias en relación con el control negativo. (Tabla 6; Tabla 6.1; Figura 8).

20 TABLA 6

*Peso medio de los peces (g)*

	Control negativo	Dosis de 4,8 mg/kg	Dosis de 38,4 mg/kg
<b>45 días</b>	$99,06 \pm 2,27$	$121,82 \pm 2,35$	$101,54 \pm 2,39$

30 La masa se muestra como media  $\pm$  D. T.

35 TABLA 6.1

*Análisis estadístico a los 45 días desde el comienzo del experimento*

Ensayo de comparaciones múltiples de Tukey	Valor P
4,8 mg/kg frente a 38,4 mg/kg	$P < 0,001$
4,8 mg/kg frente a control	$P < 0,001$
38,4 mg/l frente a control	$P > 0,05$

50 Actualmente, los organismos acuáticos son una fuente importante de proteínas, pero la captura a partir de su entorno natural está totalmente explotada. Por esta razón, para aumentar la producción es necesario el cultivo de estas especies acuáticas. Se ha demostrado que en la mayoría de los organismos existe un amplio intervalo en el que es posible manipular el crecimiento por administración de hormonas, modificación genética, etc. (Pullin y col.; Conference Proceeding 7, 432 p. International Center for living Aquatic Resources Monagement. Manila, Philippines. 1982, ISSN 0115-4389). Los polipéptidos que se presentan en este documento tienen la ventaja de que no son específicos de especie y, por lo tanto, son aplicables para diferentes organismos acuáticos para múltiples funciones como aumento del crecimiento, la supervivencia y la calidad de las larvas y mejora de diferentes parámetros implicados en la respuesta inmune. Además, se demostró que tienen un efecto sobre el crecimiento significativamente superior en comparación con la hormona de crecimiento. Por otro lado, estos polipéptidos no tienen actividad biológica en seres humanos, disminuyendo los inconvenientes que tienen los productos aplicables a animales para consumo humano. Además, el uso de estos polipéptidos en peces ornamentales es muy atractivo no sólo porque reducen el tiempo de cultivo como consecuencia de la aceleración del crecimiento sino porque también tienen un efecto sobre los colores de los peces.

REIVINDICACIONES

5 1. Un polipéptido **caracterizado** porque su cadena polipeptídica consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia con la SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 8.

2. Un procedimiento para producir el polipéptido de la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polipéptido se expresa extracelularmente en *Pichia pastoris*.

10 3. Una composición que comprende cualquiera de los polipéptidos definidos en la reivindicación 1 para estimular el crecimiento en peces y crustáceos.

15 4. El uso de sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen los polipéptidos descritos en la reivindicación 1, en formulaciones de pienso para estimular el crecimiento y/o la resistencia a enfermedades en peces y crustáceos a una dosis tan eficaz como de 4,8 mg del polipéptido/kg de pienso.

20 5. El uso de sobrenadantes de cultivo de *Pichia pastoris* que contienen los polipéptidos descritos en la reivindicación 1 para los tratamientos de inmersión en peces y crustáceos para estimular el crecimiento, la supervivencia y la calidad de las larvas en una concentración entre 0,05 y 0,5 mg del polipéptido/litro de agua.

25 6. Una composición que comprende cualquiera de los polipéptidos de la reivindicación 1 para estimular el sistema inmune humoral innato de los peces y crustáceos.

30 7. Una composición que comprende cualquiera de los polipéptidos definidos en la reivindicación 1 para el tratamiento de peces ornamentales.

35

40

45

50

55

60

65

70

Figura 1

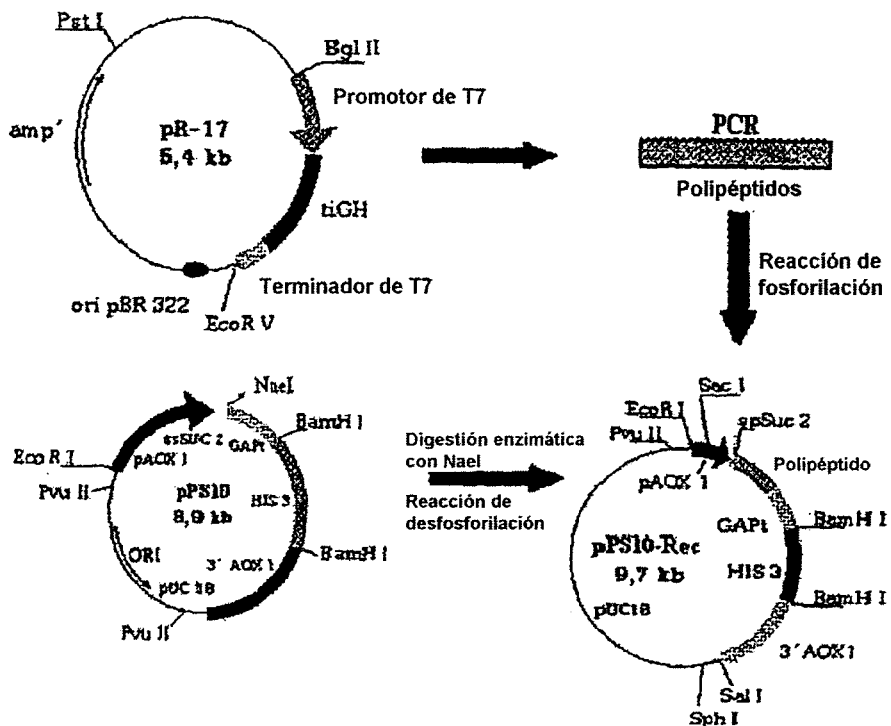


Figura 2

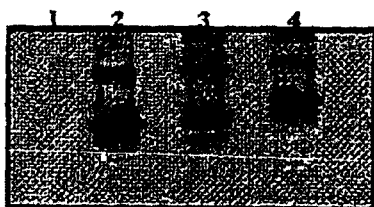


Figura 3

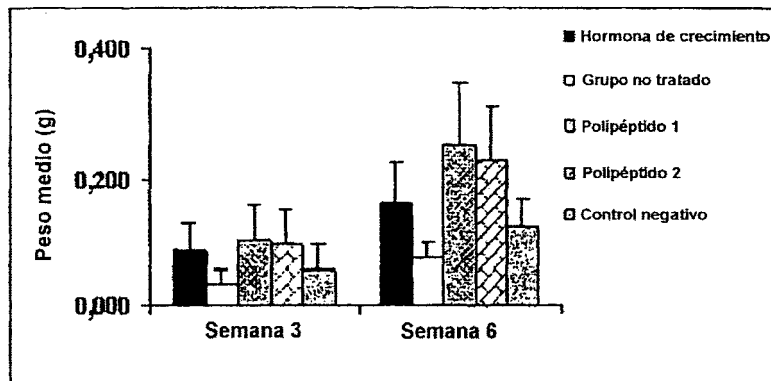


Figura 4

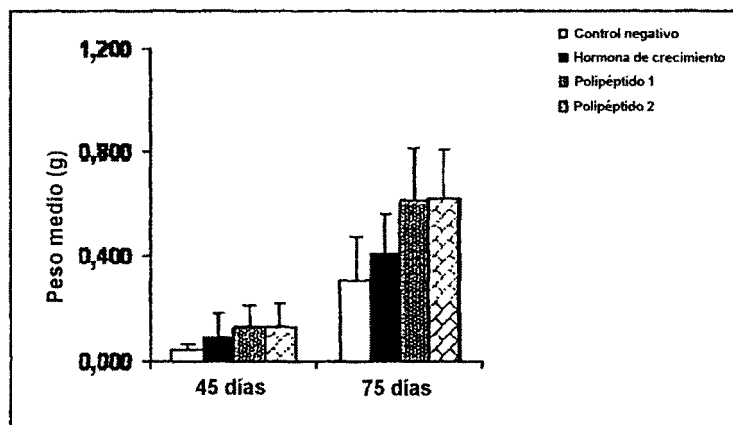


Figura 5

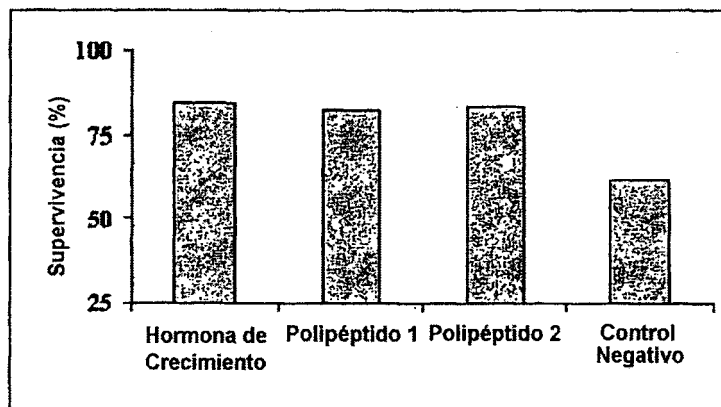


Figura 6

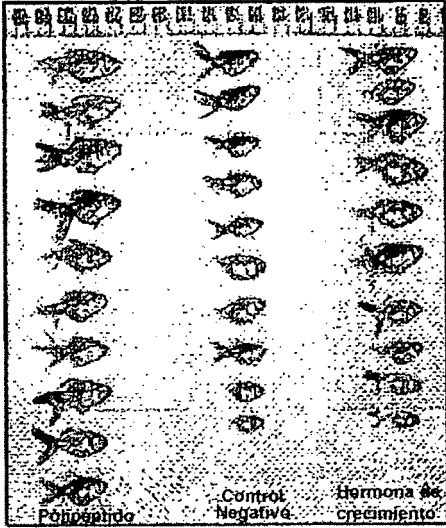


Figura 7

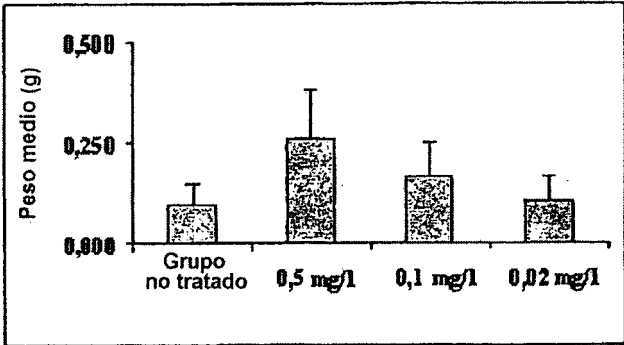
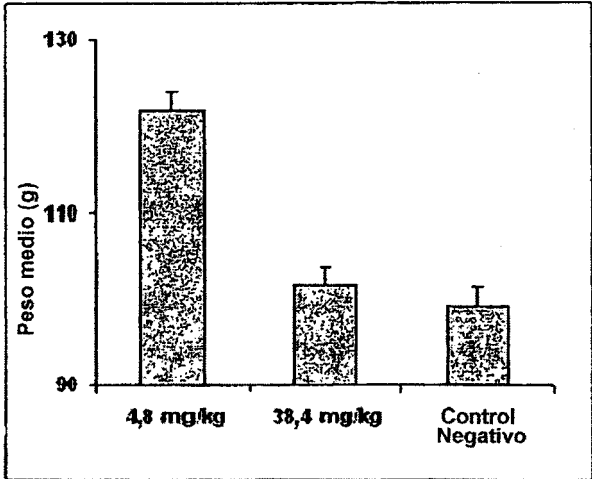


Figura 8



# ES 2 331 627 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

5 <120> "POLIPÉPTIDOS ESTIMULANTES DEL CRECIMIENTO PARA USO EN PECES Y CRUSTÁCEOS"

<130> JANNEL

10 <140>

<141>

15 <160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido que hibrida con el extremo 5' del gen codificante para el polipéptido 1

30 <400> 1

atgaactcag tcgtcctcct gc 22

35 <210> 2

<211> 22

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido que hibrida con el extremo 3' del gen codificante para el polipéptido 1

<400> 2

50 tcaatagttt ccgtaaggag cg 22

<210> 3

55 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido que hibrida con el extremo 5' del gen codificante para el polipéptido 2

65 <400> 3

atgcagcaga tcacagacag cc 22

## ES 2 331 627 T3

<210> 4  
<211> 22  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido que hibrida con el extremo 3' del gen codificante para el polipéptido 2  
10

<400> 4  
15 tcaatagttt ccgtaaggag cg 22

<210> 5  
<211> 28  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido que hibrida con el extremo 5' del gen codificante para la hormona de crecimiento de tilapia  
25

<400> 5  
30 atgaactcag tcgtcctcct gctgtcgg 28

<210> 6  
35 <211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido que hibrida con el extremo 3' del gen codificante para la hormona de crecimiento de tilapia  
45

<400> 6  
50 ccggaattcc aatgcaacac attatttc 29

<210> 7  
<211> 158  
55 <212> PRT  
<213> tilapia

<220>  
60 <221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(158)  
<223> Fragmento de hormona de crecimiento de tilapia  
65

# ES 2 331 627 T3

<400> 7

```

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

```

```

20     Gly Leu Val Glu Ser Trp Glu Phe Pro Ser Arg Ser Leu Ser Gly Gly
      100      105      110
      Ser Ser Leu Arg Asn Gln Ile Ser Pro Arg Leu Ser Glu Leu Lys Thr
      115      120      125
25     Gly Ile Leu Leu Leu Ile Arg Ala Asn Gln Asp Glu Ala Glu Asn Tyr
      130      135      140
      Pro Asp Thr Asp Thr Leu Gln His Ala Pro Tyr Gly Asn Tyr
      145      150      155

```

30

<210> 8

<211> 142

<212> PRT

35 <213> tilapia

<220>

40 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(142)

<223> Fragmento de hormona de crecimiento de tilapia

45 <400> 8

```

50     Met Gln Gln Ile Thr Asp Ser Gln Arg Leu Phe Ser Ile Ala Val Asn
      1      5      10
      Arg Val Thr His Leu His Leu Leu Ala Gln Arg Leu Phe Ser Asp Phe
      20      25      30
      Glu Ser Ser Leu Gln Thr Glu Glu Gln Arg Gln Leu Asn Lys Ile Phe
      35      40      45
55     Leu Gln Asp Phe Cys Asn Pro Asp Tyr Ile Ile Ser Pro Ile Asp Lys
      50      55      60
      His Glu Thr Gln Arg Ser Ser Val Leu Lys Leu Leu Ser Ile Ser Tyr
      65      70      75      80
      Gly Leu Val Glu Ser Trp Glu Phe Pro Ser Arg Ser Leu Ser Gly Gly
      85      90      95
60     Ser Ser Leu Arg Asn Gln Ile Ser Pro Arg Leu Ser Glu Leu Lys Thr
      100      105      110
      Gly Ile Leu Leu Leu Ile Arg Ala Asn Gln Asp Glu Ala Glu Asn Tyr
      115      120      125
65     Pro Asp Thr Asp Thr Leu Gln His Ala Pro Tyr Gly Asn Tyr
      130      135      140

```