



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 733**

51 Int. Cl.:

C12N 15/40 (2006.01)	A61K 39/12 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)	C07K 14/08 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)	A61P 31/12 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)	A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01980767 .6**

96 Fecha de presentación : **12.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1334197**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2003**

54 Título: **Vacuna derivada de levadura contra IPNV.**

30 Prioridad: **11.11.2000 GB 0027644**
14.12.2000 GB 0030765

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.05.2011

73 Titular/es: **The University Court of the University of
Aberdeen
Regent Walk
Aberdeen AB24 3FX, GB**

72 Inventor/es: **Melvin, William, Thomas;
Breeman, Suzanne y
Labus, Marie, Beagley**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 358 733 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna derivada de levadura contra IPNV

5 [0001] La presente invención se refiere a composiciones de vacunas para proteger los peces contra el virus de necrosis pancreática infecciosa.

Antecedentes

10 [0002] El virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es un virus de ARN de doble cadena bisegmentado icosaédrico sin envoltura y provoca una enfermedad altamente contagiosa del salmón joven criado en piscifactoría [1,2], así como otros peces criados en granjas [3]. Esta enfermedad, una vez establecida, es muy difícil de erradicar del pez infectado y es muy necesario el desarrollo de una vacuna segura, eficaz y barata contra el IPNV. La irrupción de dicha enfermedad provoca daños económicos muy serios a los criaderos de peces.

15 [0003] El IPNV presenta una proteína estructural principal, VP2 (52kD), y otras tres proteínas, VP1 (90kD), VP3 (30kD) y VP4 (28kD) [4-7]. VP1 es una polimerasa viral putativa [8], mientras que la VP2 es la proteína principal de la cápside exterior [9]. VP3 es otra proteína de la cápside y VP4 se ha considerado como una forma separada de VP3 durante la maduración viral [9,10].

20 [0004] Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para VP2 y VP3 son bien conocidas en la técnica, véase por ejemplo, Havarstein et al (1990) "Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of the infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other Birnaviridae" J Gen Virol 71: 299-308.

25 [0005] También se sabe que existen tres variaciones de cepa, véase, por ejemplo, Pryde et al, 1992 Archives of Virology 129, 287-293.

30 [0006] Entre las vacunas disponibles actualmente contra el IPNV se incluyen el virus IPNV desactivado, que se desarrolla en líneas celulares de peces y a continuación se desactiva utilizando un desactivante viral estándar. Sin embargo, la producción a gran escala de vacunas a partir de líneas celulares de peces puede ser costosa. Existe también el riesgo de inversión del virus a la forma virulenta.

35 [0007] WO94/04565 de Proteus House se refiere a un péptido sintético que tiene por lo menos una propiedad antigénica de una cepa de IPNV, donde el péptido consiste sustancialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada. Los péptidos se sintetizaron utilizando química en fase sólida.

[0008] WO 99/50419 (University of Maryland) se refiere a métodos para la preparación de un virus de necrosis pancreática infecciosa no patogénico, que comprenden etapas que conducen a IPNV deficiente en la proteína NS. Estos viriones estaban destinados al uso como vacunas vivas atenuadas.

40 [0009] Además, en diversos documentos se describen vacunas de proteínas recombinantes.

[0010] Christie (1997), Fish Vaccinology, Dev Biol Stand. Basel, Karger, vol 90, pp 191-199, eds Gudding et al) da a conocer una vacuna producida en e. coli que contiene la proteína recombinante VP2.

45 [0011] US 5165925 (University of Oregon) describe métodos para inmunizar el pez contra los serotipos VR-299 y SP de IPNV, donde la vacuna consiste esencialmente en un polipéptido del segmento viral A e incluye por lo menos VP2 expresado en un huésped bacteriano.

50 [0012] Además, la patente coreana KR100227102 también se refiere a antígenos de IPNV y ADNc relacionado y vacunas.

55 [0013] Labus et al (2001) Fish & Shellfish Immunology 11: 203-216, que se publicó después de las fechas de prioridad reivindicadas aquí, compara la antigenicidad de las proteínas estructurales de IPNV cuando se preparan en diferentes sistemas huésped que incluyen bacterias y levadura. Una de estas proteínas era VP2 truncada que se dice que comprende los residuos 147-307 de VP2. Se cree que el plegamiento más verosímil aparece en células de CHSE (Embrión de Salmón de Chinook) y CHO (Ovario de Hámster Chino).

60 [0014] Frost et al "Analysis of the antibody response in Atlantic salmon against recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)" Fish & Shellfish Immunology, Volumen 8, Fascículo 6, Agosto 1998, Páginas 447-456, describe una respuesta inmunológica humoral específica de IPNV en salmón "pre-smolt" del Atlántico y en

conejos inmunizados con VP2 recombinante purificada expresada en *E. coli*.

[0015] A pesar de los documentos anteriores, existe una necesidad actual para nuevas preparaciones de vacunas que sean eficaces contra el IPNV.

5 Descripción de la invención

10 [0016] Los presentes inventores han clonado y expresado antígenos de IPNV en la cepa de levadura *Pichia pastoris*. Estas proteínas recombinantes expresadas se utilizaron a continuación como una preparación de vacuna en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Tal como se muestra en los ejemplos, dichas preparaciones de vacunas parecen ser altamente eficaces. Sorprendentemente, tal como se muestra en los ejemplos de la presente invención, se cree que pueden ser considerablemente más eficaces que las preparaciones disponibles de bacterias.

15 [0017] En otros aspectos de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, también se dan a conocer combinaciones específicas de antígenos eficaces, particularmente vacunas bivalentes, (por ejemplo, VP3 y una proteína VP2, referida en general en la presente invención como VP2var), ya que son fusiones de éstos y métodos de producción y utilización de los mismos.

20 [0018] Las vacunas preferidas son tal como se definen en las reivindicaciones y consisten esencialmente en polipéptidos VP3 y VP2var y son capaces de inducir inmunidad en peces a la infección posterior por el IPNV, habiéndose producido dichos polipéptidos en un huésped de levadura por un vector de expresión compatible con el huésped, los vectores de expresión que incluyen una secuencia de ADN insertada de ADN viral de IPNV que codifica el polipéptido de IPNV en la vacuna.

25 [0019] En las reivindicaciones se indican varios aspectos y realizaciones de la presente invención. La invención se describirá a continuación con más detalle.

30 [0020] En un aspecto de la presente invención se da a conocer un proceso para producir una composición de vacuna bivalente tal como se define en la reivindicación 1, por ejemplo, para utilizar en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), cuyo proceso comprende expresar un polipéptido que codifica una proteína de IPNV (por ejemplo, de la cepa de IPNV Sp) en una cepa de levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*, preferiblemente *P. pastoris* GS115) y formular el polipéptido como vacuna.

35 [0021] En la presente invención se describen procesos que comprenden las etapas de:

(i) aislar una o más regiones codificantes de IPNV,

40 (ii) preparar un plásmido recombinante que contiene las regiones codificantes de IPNV (es decir, una adecuada para la expresión en líneas celulares de levadura, cuyo plásmido codifica uno o más polipéptidos de IPNV)

(iii) preparar líneas celulares de levadura que expresan los polipéptidos de IPNV (por ejemplo, mediante electroporación, opcionalmente plásmidos separados en células huésped separadas),

45 (iv) cribar la expresión de los polipéptidos de IPNV en las líneas celulares,

(v) inmunizar uno o más peces con líneas celulares que expresan los polipéptidos de IPNV (o preparaciones de los polipéptidos a partir de los mismos).

50 [0022] Las proteínas de IPNV preferidas, combinaciones de proteínas, y fusiones se describen con más detalle a continuación. Las más preferidas con VP3 y VP2var (una región más pequeña de toda la proteína VP2 que muestra el grado más elevado de variación de aminoácidos entre cadenas).

55 [0023] Preferiblemente, el método comprende dos proteínas de IPNV diferentes en *Pichia pastoris*, tal como para producir una vacuna bivalente.

60 [0024] En general, a la luz de la descripción de la presente invención, los expertos en la materia serán capaces de construir vectores apropiados y diseñar protocolos para la expresión recombinante de genes. Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras (ver a continuación), fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes

- 5 marcadores, secuencias señal y otras secuencias apropiadas. Para una mayor evidencia del conocimiento general véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2nd edition, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press (o ediciones posteriores de este trabajo). Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis (véase anteriormente la discusión con respecto a las variantes), secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen con detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Las descripciones de Sambrook et al. y Ausubel et al. se incorporan en la presente invención por referencia.
- 10 **[0025]** El polipéptido expresado se secreta de la célula huésped, de manera que el vector incluye preferiblemente una secuencia señal para dirigir la proteína, de manera que se secreta de la célula. Una secuencia señal preferida es la secuencia señal del factor de apareamiento α de levadura.
- 15 **[0026]** En un aspecto de la presente invención, se da a conocer un vector de levadura apropiado que expresa IPNV tal como se define en la reivindicación 15.
- 20 **[0027]** "Vector" se define para incluir, entre otros, cualquier plásmido, cósmido o fago en forma lineal o circular de cadena sencilla o doble que puede ser o no transmisible o movilizable, y que puede transformar un huésped procarionota o eucariota mediante integración en el genoma celular o existir de forma extracromosómica (por ejemplo, plásmido replicante autónomo con un origen de replicación).
- 25 **[0028]** El vector puede ser un vector de expresión bifuncional que funciona en múltiples huéspedes. En el caso de ADNc, éste puede estar bajo el control de un promotor adecuado u otros elementos reguladores para la expresión en la célula huésped.
- 30 **[0029]** Un vector preferido es el vector de expresión de *Pichia Pastoris*, pPICZ α B.
- 35 **[0030]** En un aspecto adicional de la presente invención, se describe una célula huésped de levadura que contiene o se transforma con un vector heterólogo según la presente invención. Tal como es conocido por los expertos en la materia, el término "heterólogo" se utiliza ampliamente en este aspecto para indicar que la secuencia de nucleótidos de IPNV en cuestión se ha introducido en la célula de levadura o una célula progenitora de la misma, utilizando ingeniería genética, es decir, mediante intervención humana. El ácido nucleico heterólogo a la célula huésped no será natural en el tipo de célula huésped.
- 40 **[0031]** El polipéptido se puede purificar parcialmente a partir del huésped antes de ser utilizado como vacuna. Cuando se secreta el polipéptido de la célula huésped, las células se pueden separar del medio mediante centrifugación, las células se agrupan y siendo el medio el sobrenadante. En dicha situación, el sobrenadante, que contiene el polipéptido secretado, se puede utilizar directamente como vacuna, o en una composición de vacuna. Alternativamente, el polipéptido se puede purificar parcialmente a partir de este sobrenadante, por ejemplo, utilizando cromatografía de afinidad.
- 45 **[0032]** El método puede comprender además mezclar el polipéptido purificado parcialmente con otro componente, tal como otro polipéptido y/o un adyuvante, diluyente o excipiente tal como se describe a continuación.
- 50 **[0033]** Las preparaciones de vacunas tal como se define en la reivindicación 17 forman un aspecto de la presente invención.
- 55 **[0034]** En un aspecto de la presente invención, la vacuna producida en la levadura, tal como *Pichia*, se basa en VP2 y VP3 o combinaciones inmunogénicas o fragmentos de las mismas.
- 60 **[0035]** En el caso de fragmentos, en cada caso, los polipéptidos de vacunas descritos en la presente invención pueden comprender, consistir en o consistir esencialmente en el fragmento en cuestión.
- [0036]** En una realización preferida basada en VP2, el fragmento es VP2var. Esta es una región más pequeña de la proteína VP2 identificada previamente como un segmento variable de VP2 que comprende aproximadamente 150 aminoácidos (aminoácidos 183-337; 678-1140 nucleótidos) (Havarstein, et al, 1990 *Journal of General Virology* 71, 299-308). La proteína se describe en el estudio de Pryde et al (1992) anterior que comparaba la secuencia de un tramo de 192 aminoácidos de VP2 aislada de una cepa de IPNC escocesa (serotipo Sp) frente a la misma región de un campo aislado de Shetland (serotipo Sh), una cepa noruega (serotipo N1) y una cepa canadiense (serotipo Ja). La cepa Sh difería de Sp en la sustitución de 1 aminoácido, la cepa N1 en 2 sustituciones y el Ja en 33

sustituciones.

[0037] Los cebadores preferidos para la utilización en los métodos de la presente invención son específicos para los polipéptidos en cuestión, y preferiblemente son aquellos que introducen sitios de restricción para la clonación y/o evitar secuencias ricas en GC. Por ejemplo:

5

559 586
 CTA ACA ACG GAA TTC ATG GAC AAA GTC VP2var Cebador directo (SEQ ID.
 NO. 1)

10

Sitio *EcoRI*

15

[0038] Un cebador preferido para la utilización con un vector de señal de secreción es el siguiente:
 5' gaagctgcagaggacaaagtcaac3' VP2var directo (SEC ID. NO. 2)

20

[0039] Un cebador preferido adicional es:

CGT TGC CGA TTG GCG GCC GCT GGT TGA TC VP2var Cebador inverso (SEQ
 ID. NO. 3)

25

Sitio *NotI*

[0040] La secuencia obtenible mediante la utilización de SEC ID No. 1 y 2 respectivamente con SEC ID No. 3 se proporcionan como Anexo A de Secuencias

30

[0041] En otra realización, los cebadores preferidos son:

5' accactgcagtcacagtcctgaatc3' VP2var directo (SEC ID. NO. 4)

35

5' gagcgcggccgcccaattccgttcctg3' VP2var inverso (SEC ID. NO. 5)

[0042] La secuencia obtenible mediante la utilización de SEC ID No. 4 y 5 se proporcionan como Anexo B de Secuencias

40

[0043] De este modo, se describe una composición de vacuna que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de VP2var obtenible utilizando cualquiera de estos cebadores, que corresponden a cualquiera de estas regiones, o que tienen cualquiera de las secuencias proporcionadas en los Anexos A o B.

45

[0044] Las realizaciones de este aspecto pueden comprender un polipéptido VP2 tal como se ha descrito anteriormente en combinación con un polipéptido VP3 o fragmento. Por ejemplo, tal como se obtienen mediante la utilización de los siguientes cebadores:

2305 2330
 CCT GGG ACT GCA GAT GGC ATC AAA TG VP3 Cebador directo (SEQ
 ID. NO. 6)

50

Sitio *PstI*

55

GTT ACA CCG CGG CCG CGT CTC CGC TGG G VP3 Cebador inverso (SEQ
 ID. NO. 7)

60

Sitio *NotI*

[0045] Las secuencia obtenible mediante la utilización de las SEC ID No. 6 y 7 se proporcionan como Anexo C de Secuencia.

[0046] Otros cebadores preferidos para la utilización con un vector de señal de secreción son los siguientes:

5' gacgctgcagtgcaacgcctcctg 3' VP3 directo (SEC ID. NO. 8)

5' gtgcagcgccgccgggggtcgtcgtttcatc 3' VP3 inverso 2936-2967 (SEC ID. NO. 9)

[0047] Las secuencia obtenible mediante la utilización de las SEC ID No. 8 y 9 se proporcionan como Anexo D de Secuencia.

[0048] De este modo, se proporciona una composición de vacuna que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de VP3 obtenible utilizando cualquiera de estos cebadores, correspondientes a cualquiera de estas regiones, o que tiene cualquiera las secuencias proporcionadas en el Anexo C o D.

[0049] Las secuencias se pueden obtener utilizando cebadores de las secuencias base según métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Un método habitual puede utilizar 1 ng de ADN plantilla purificado que contiene las regiones codificantes para VP2 y VP3, 25 pmoles de cada cebador de PCR en 45 µl de un mezcla madre de PCR que contiene MgCl₂ 2,5 mM (Advanced Biotechnologies). El ciclado se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un Termociclador Perkin Elmer utilizando los siguientes parámetros de ciclado; 94°C durante 5 min seguido de 35 ciclos de 30s a 48°C, 1min 20s a 72°C, 30s a 94°C y una incubación final de 10min a 72°C. A continuación, se separan electroforéticamente una alícuota de 10 µl de las reacciones PCR resultantes a través de un gel de agarosa al 1,5% que contiene bromuro de etidio 0,5 µg/ml.

[0050] En otra realización de la presente invención, se proporciona la producción de vacunas de IPNV tal como se define en las reivindicaciones mediante la combinación de una o más copias de cada uno de los antígenos de VP2 o VP3 (todos o parte de los mismos), fusionados juntos en la orientación correcta para la expresión como un único polipéptido. Por ejemplo, éste puede comprender una proteína de fusión derivada de por lo menos una copia de cada una de las secuencias de proteínas VP2 y VP3 unidos extremo con extremo. Para conseguir esto, se unen múltiples copias de la región codificante de los genes de IPNV relevantes para formar un único marco de lectura abierto con un único codón de inicio y terminación. Se clona en un vector de expresión adecuado y se produce de manera recombinante tal como se ha descrito previamente. El "antígeno de IPNV multivalente" resultante contiene por lo menos una copia de cada una de las secuencias de proteínas antigénicas contenidas en ambos antígenos de IPNV y, por tanto, es un estimulador más potente de una respuesta inmune del huésped.

[0051] En otra realización de la invención, la vacuna de IPNV tal como se define en las reivindicaciones, está comprendida de una combinación nueva de dos o más copias de cualquiera de los antígenos de VP2 o VP3, fusionados en la orientación correcta para la expresión como un único polipéptido. Por ejemplo, éste puede comprender una proteína de fusión derivada de 2 copias de la secuencia de proteína VP3 unidas extremo con extremo o dos copias de la proteína VP2 unidas extremo con extremo. Para conseguir esto, se unen múltiples copias de la región codificante de genes de IPNV relevante para formar un único marco de lectura abierto con un único codón de inicio y terminación. Se clona en un vector de expresión adecuado y se produce de manera recombinante tal como se ha descrito previamente. Este "antígeno de IPNV multimérico" resultante contiene múltiples copias de la secuencia de proteína antigénica contenida en el antígeno de IPNV y, por tanto, es un estimulador más potente de una respuesta inmune del huésped.

[0052] Los cebadores preferidos para la utilización con un vector de señal secreción son los siguientes:

5' gacgctgcagtgcaacgcctcctg 3' VP3 directo (SEC ID. NO. 10)

5' ctctctagagtctccgctggg 3' VP3 inverso (SEC ID. NO. 11)

5' ccctcagagtcacagtcctg 3' VP2var directo (SEC ID. NO. 12)

5' gagcgcggccgccgaattccggttcctg3' VP2var inverso (SEC ID. NO. 13)

[0053] Las secuencias de nucleótidos amplificadas, cuando se unen, codifican una proteína híbrida que consiste en aminoácidos de VP3 fusionados a los aminoácidos de VP2. Esto se muestra como el Anexo E.

[0054] Las vacunas producidas en levadura pueden incluir por tanto (comprender, consistir en, o consistir

esencialmente en) alguno o más de los polipéptidos de IPNV descritos anteriormente y se describen en los Anexos de Secuencias en la presente invención. Los polipéptidos no necesitan estar en forma pura, siempre que sean capaces de conferir una respuesta protectora en un pez en el que se introducen.

5 [0055] La vacuna es una vacuna bivalente que comprende polipéptidos derivados del virus IPNV, preferiblemente tal como se muestra en cualquiera de los Anexos de Secuencias A-E.

10 [0056] De este modo, las vacunas comprenden dos polipéptidos derivados del virus IPNV basado en VP2var y VP3. Estos dos polipéptidos se pueden expresar como una fusión. De hecho, se cree que dichas vacunas bivalentes son particularmente eficaces y dichas vacunas de combinación preferidas (comoquiera se produce, aunque preferiblemente producido en una levadura, tal como *Pichia*) forman un aspecto particular de la invención.

[0057] Se pueden utilizar variantes menores de las secuencias anteriores en realizaciones particulares tal como se describen a continuación en la presente invención.

15 [0058] Las vacunas pueden contener otros antígenos bacterianos utilizados para controlar otras enfermedades, es decir, se pueden incluir composiciones de vacunas en una vacuna multivalente que incluye antígenos contra otras enfermedades de peces.

20 [0059] De este modo, una vacuna de inyección multivalente preferida puede contener las dos proteínas de IPNV descritas anteriormente, más antígenos para otras enfermedades de peces, tales como *Aeromonas salmonicida* (Cepa MT004) y/o *Aeromonas salmonicida* (Cepa MT423) [véase EP 0587636 de la Secretaria de Estado para Escocia]. También uno o más antígenos Vibrio (incluyendo *V. anguillarum*, *V. salmonicida* y *V. viscosus*), antígenos por ejemplo *Vibrio anguillarum* inactivado (Cepa 78-SKID); *Vibrio anguillarum* Inactivado (Cepa MSC 275); *Vibrio salmonicida* Inactivado (Cepa VS 855); *Vibrio viscosus* Inactivado (Cepa HW/98/7/2)

25 [0060] Las proteínas de IPNV cuando se utilizan en la presente invención se pueden fusionar a otras secuencias.

30 [0061] Por ejemplo, el polipéptido puede estar en forma de una proteína de fusión, por ejemplo, se puede unir a una secuencia líder o señal tal como se ha descrito anteriormente. Dicha secuencia puede causar, por ejemplo, la proteína expresada a secretar de la célula huésped. Dicha secuencia se puede separar del resto del polipéptido antes de que el polipéptido se formule en la composición, o se puede mantener en el polipéptido en la composición. Preferiblemente, la secuencia señal es la secuencia señal del factor de apareamiento α de levadura. Preferiblemente, la secuencia señal no se separa del polipéptido expresado, sino que se mantiene en el polipéptido y, de este modo, forma parte de la vacuna.

35 [0062] Los polipéptidos descritos en la presente invención se pueden unir a un portador adecuado, por ejemplo, para aumentar la inmunogenicidad. Entre los portadores adecuados se incluyen albúmina de suero bovino, hemocianina de lapa californiana, etc.

40 [0063] El polipéptido se puede unir a un polipéptido enlazador, cuyo péptido enlazador une el polipéptido a partículas, tales como látex o bentonita. Esto puede facilitar su administración como vacuna de inmersión (ver a continuación). Los polipéptidos enlazadores pueden comprender dominios funcionales, tales como dominios "blob" ácidos de factores de transcripción eucariotas o dominios polibásicos de proteínas histona.

45 [0064] Además de los polipéptidos, la composición de vacuna puede comprender un diluyente, tampón, adyuvante o excipiente farmacológicamente aceptable o una combinación de éstos. Dichos materiales deberían ser no tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del principio activo. La natura exacta del portador u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por ejemplo, intravenosa.

50 [0065] Las formulaciones de micropartículas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen microesferas biodegradables compuestas de materiales poliméricos, tales como poliéster poli(láctido-co-glicólido) (PLG) (Eldridge et al, Molec Immunol 28: 287-294 (1991), y atelocolágeno (Fujioka et al, J. Control. Release 33: 307-315 (1995). Se ha observado que la inyección de "minipélets" de atelocolágeno que contienen un plásmido que codifica HST I/FGF-4 humano da lugar a una liberación lenta de ADN y la posterior expresión prolongada de proteína funcional en ratones (Ochiya et al, Nature Medicine 5: 707-710 (1999)). Las microesferas de PLG son suficientemente robustas para sobrevivir a la ingestión y llegar intactas al tejido linfoide asociado a los intestinos (Eldridge et al, Adv Exp Med Biol 251: 191-202 (1989)), y se han utilizado para introducir antígenos recombinantes y virus atenuados en mamíferos mediante rutas sistémicas y orales (O'Hagan et al, Immunology 73: 239-242 (1991); O'Hagan et al, Vaccine 11: 149-154 (1993); Marx et al, Science 260: 1323-1328 (1993); Jones et al, Vaccine 15: 814-817 (1997)).

55

60 En peces incubados oralmente con gamma globulina humana incorporada en micropartículas de PLG, era

demostrable la captación de la proteína extraña en tejidos intestinales y los riñones (O'Donnell et al, Fish & Shellfish Immunol. 6: 507-520 (1996)).

5 [0066] De este modo, la presente invención también se refiere a métodos para la formulación de dichas proteínas para hacerlas adecuadas para la administración mediante inmersión o por vía oral a través de la incorporación en el alimento de los peces. En una realización de la presente invención que se refiere a la formulación de la vacuna para la vacunación por inmersión de peces, las proteínas recombinantes se empaquetan en un sistema de liberación de micropartículas, que puede incluir, pero sin limitación, partículas de látex, microesferas de poli(láctido-co-glicólido), "minipélets" de atelocolágeno, bentonita, o cerámicas de apatita porosas, que incluyen hidroxapatita (HA) y beta fosfato tricálcico (TCP).

15 [0067] Los materiales adecuados son conocidos para el experto en la material. Entre los ejemplos se incluyen agua, solución salina (por ejemplo, cloruro sódico al 0,85%; véase Ph.Eur. monograph 2001:0062), solución salina tamponada, aceite de pescado con un emulsionante (por ejemplo, una lecitina, Bolec MT), desactivante (por ejemplo, formaldehído; véase Ph.Eur. monograph 1997:0193), aceites minerales, tales como aceites minerales ligeros, alhidrogel, hidróxido de aluminio. Cuando se utiliza en la presente invención, el término "adyuvante de aceite" abarca tanto aceites minerales como aceites sintéticos. Un adyuvante preferido es Montanide ISA 711 (SeppicQuai D'OrsaY, 75321 Paris, Francia) que es manido oleato en una suspensión de aceite.

20 [0068] Por ejemplo, para una vacuna de inmersión, se prefiere una suspensión acuosa. Para una vacuna oral, se prefiere un sistema de aceite de pescado y portador lecitina. Para una vacuna de inyección se prefiere Montanide ISA711®, Sepic a una proporción de 30:70.

25 [0069] Las dosis preferidas varían de 50 a 150 µg de antígeno por pez, más preferiblemente 70 a 125 µg por pez. Una dosis preferida es aproximadamente 100 µg por pez.

[0070] Para la inyección, lo más preferido es una unidad de dosificación que comprende 105 µg de cada uno de los antígenos de VP2 y VP3 en 100 µl, es decir 1,05 g/l de cada proteína.

30 [0071] Para el uso oral, se añade una emulsión a los pélets de comida de los peces y se alimentan durante un periodo de alimentación de 10 días para liberar un equivalente a 100 µl de vacuna.

[0072] Los expertos en la material son conocedores de modos típicos de administración. Por ejemplo:

35 [0073] Una composición de vacuna se puede administrar por vía oral o mediante inyección.

[0074] Tal como se conoce en la técnica, un modo preferido de administración comprende la utilización de tecnologías de vacunación oral mediante las cuales la vacuna se administra en alimento para los peces, o mediante adición directa de la vacuna al agua en que el pez nada ("vacunación por inmersión"). Opcionalmente, esto se puede utilizar en la revacunación con el fin de reforzar la inmunidad establecida por otros medios (Dunn et al, Aquacultural Engineering 9: 23-32 (1990); Ellis, Fish Pathology 30:293-300 (1995)). De este modo, ciertas realizaciones, las micropartículas, tales como las descritas anteriormente, se administran mediante inmersión de las especies de acuicultura en un fluido en suspensión que contiene las micropartículas en una concentración apropiada o mediante la incorporación en alimento para peces.

45 [0075] Una composición de vacuna se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o secuencialmente.

50 [0076] Una composición de vacuna se puede administrar como un tratamiento de una serie de dosis discretas durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, se puede administrar durante un periodo de aproximadamente catorce días.

55 [0077] La vacunación se puede repetir diariamente, dos veces por semana, semanalmente o mensualmente. Por ejemplo, después de la dosis inicial se puede administrar una vacunación de refuerzo. Por ejemplo, se puede administrar un refuerzo aproximadamente a las catorce semanas después de la vacunación. La vacunación inicial y cualquier refuerzo se puede llevar a cabo utilizando los modos de administración o diferentes. Una pauta preferida incluye una primera vacunación por inyección, seguido de (14 semanas después de la estimulación) un tratamiento de dos semanas de administración oral de la vacuna de refuerzo o un reforzador antes de un brote de IPN inesperado (por ejemplo, justo después de transferirse al agua del mar).

60

- 5 [0078] En la práctica, se diluyen las micropartículas que contienen proteína recombinante hasta una concentración adecuada en un tanque cerrado que contiene agua tal como se utiliza para el cultivo normal de las especies de peces pertinentes y se sumergen los peces alevines en esta solución durante un periodo de varias horas. A continuación, los peces se devuelven a sus condiciones de cultivo normales. Con esta práctica, las proteínas recombinantes pueden entrar en las branquias o el tracto digestivo del pez y ser engullidas por las células presentadoras de antígenos y posteriormente inducir una respuesta inmunológica.
- 10 [0079] Alternativamente, las micropartículas que contienen las proteínas recombinantes se incorporan a una preparación alimenticia habitual para peces y se alimentan los peces en lugar de con la alimentación ordinaria. En este método, las proteínas recombinantes entrarán en el tracto digestivo estimulando una respuesta inmunológica en tejidos linfoides sistémicos o asociados a los intestinos. Este método presenta la ventaja de que es adecuado para la utilización en recintos con redes cuando los tanques sellados no están disponibles.
- 15 [0080] Se pueden encontrar otros adyuvantes, portadores, etc. y modos de administración por referencia a Gudding et al (1999) Veterinary immunology and Immunopathology 72, 203-212.
- 20 [0081] Los polipéptidos (incluyendo variantes, derivados, fusiones y conjugados) descritos en la presente invención también se pueden utilizar en métodos de diagnóstico para el IPNV y dicha utilización de los péptidos y métodos de diagnóstico constituyen aspectos adicionales de la invención. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden utilizar como sustrato para cribar anticuerpos en un pez y, de este modo, determinar si el pez ha sido infectado o no con IPNV. Dicho ensayo podría ser por ELISA u otra técnica tal como entendería un experto en la materia.
- 25 [0082] Los polipéptidos que incluyen variantes, derivados, fusiones y conjugados, descritos en la presente invención también se pueden utilizar en la fabricación de una vacuna u otro medicamento para el tratamiento de IPNV o presentan un efecto profiláctico contra el mismo.
- 30 [0083] También se describen en la presente invención un método de tratamiento terapéutico o profilaxis de IPNV, que comprende administrar una composición de vacuna tal como se ha descrito aquí a un pez.
- 35 [0084] También se describe en la presente invención una población de peces que han sido tratados o inmunizados con una vacuna o composición descrita en cualquier punto de la invención.
- 40 [0085] Las preparaciones de IPNV descritas en la presente invención, por ejemplo producidas recombinantemente en levadura mediante la expresión del ácido nucleico codificante para el mismo, se pueden utilizar para desarrollar anticuerpos que utilizan técnicas que son habituales en la técnica. Dichos anticuerpos pueden actuar in vivo como anticuerpos protectores (neutralizantes) o se pueden aislar, por ejemplo, para utilizar en ELISA.
- 45 [0086] Tal como se ha descrito anteriormente, las realizaciones de la presente invención también comprenden procesos, métodos y vacunas (composiciones) basados en los polipéptidos que son variantes (fragmento, derivado u homólogo, etc.) de las secuencias VP2var o VP3 proporcionadas en la presente invención. La variante puede ser capaz de estimular la producción de anticuerpos que se unen al IPNV donde estos anticuerpos pueden ser anticuerpos neutralizantes.
- 50 [0087] La producción de anticuerpos que se unen al IPNV o que neutralizan el IPNV se puede evaluar mediante ELISA o mediante ensayos de neutralización, respectivamente. Los ensayos apropiados se describen en otros puntos de la presente invención.
- 55 [0088] Las variantes artificiales (derivados) se pueden preparar por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida de sitio o aleatoria de un ácido nucleico que codifica el polipéptido mostrado en un Anexo de secuencias, el polipéptido variante se puede producir a continuación mediante la expresión de un huésped adecuado, por ejemplo, *Pichia pastoris* tal como se ha descrito en otros puntos de la presente invención. Alternativamente, la variante se puede producir mediante síntesis directa.
- 60 [0089] Preferiblemente, el polipéptido variante se genera directa o indirectamente (por ejemplo, mediante una o más etapas de amplificación o replicación) de un ácido nucleico original que codifica toda o parte de las secuencias mostradas en un Anexo de secuencias.
- [0090] La homología (es decir, similitud o identidad) puede ser tal como se define utilizando comparaciones de secuencias y se realizan mediante FASTA y FASTP (véase Pearson & Lipman, 1988. Methods in Enzymology 183: 63-98). Los parámetros se fijan preferiblemente, utilizando la matriz por defecto, de la manera siguiente: Gapopen

(penalización por el primer residuo en el espacio): -12 para proteínas; Gapext (penalización por residuos adicionales en un espacio): -2 para proteínas; longitud de palabra KTUP: 2 para proteínas. La secuencia de aminoácidos comparte por lo menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad con las secuencias mostradas en la presente invención.

5

[0091] Además de uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos mostrada, un polipéptido variante puede incluir aminoácidos adicionales en los extremos C-terminal y/o N-terminal

10

[0092] Los cambios pueden ser deseables por una serie de razones, incluyendo la introducción o eliminación de las siguientes características: sitios que son necesarios para la modificación después de la traducción; sitios de separación en el polipéptido codificado; motivos en el polipéptido codificado (por ejemplo, epítotos). Se pueden añadir o eliminar secuencias líder u otras secuencias de reconocimiento (por ejemplo, regiones de anclamiento hidrofóbico) de la proteína expresada para determinar su localización después de la expresión.

15

[0093] Otras mutaciones deseables se pueden realizar mediante mutagénesis aleatoria o dirigida de sitio del ácido nucleico que codifica el polipéptido a efectos de alterar la actividad (por ejemplo, especificidad) o estabilidad del polipéptido codificado.

20

[0094] Los cambios pueden ser a modo de variación conservativa, es decir sustitución de un residuo hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. Tal como se conocido por los expertos en la materia, alterar la estructura primaria de un polipéptido mediante una sustitución conservativa puede no alterar significativamente la actividad de ese péptido, ya que la cadena lateral del aminoácido que se inserta en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces y contactos similares que la cadena lateral del aminoácido que se ha sustituido. Esto es así incluso cuando la sustitución es en una región que es crítica en la determinación de la conformación de péptidos.

25

30

[0095] También se incluyen variantes que tienen sustituciones no conservativas. Tal como es conocido por los expertos en la materia, las sustituciones en regiones de un péptido que no son críticas en la determinación de su conformación pueden no afectar de manera importante en su capacidad de desarrollar anticuerpos, ya que no alteran de manera significativa la estructura tridimensional del péptido.

35

[0096] En regiones que son críticas en la determinación de la conformación o actividad de péptidos, dichos cambios pueden conferir propiedades ventajosas en el polipéptido. De hecho, cambios tales como los descritos anteriormente pueden conferir propiedades ligeramente ventajosas sobre el péptido, por ejemplo una estabilidad o inmunogenicidad alterada.

[0097] La presente invención se describirá a continuación en referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes y anexos. Otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia a la luz de éstos.

40

Figuras, tablas

[0098]

La figura 1 muestra geles de SDS-PAGE al 10% teñidos con azul Coomassie.

45

(a) Muestra muestras de sobrenadante de cultivo de *Pichia pastoris* que expresan VP2var tomadas a las 4, 12, 24, 36 y 48h después de la inducción..

(B) Muestra muestras de sobrenadante de cultivo que expresan VP3 tomadas a las 4, 12, 24, 36 y 48h después de la inducción.

50

La figura 2 muestra el porcentaje de peces estimulados cuyos anticuerpos están unidos al virus de IPNV inmovilizado en tests ELISA.

55

La figura 3 muestra el porcentaje de peces reforzados cuyos anticuerpos están unidos al virus de IPNV inmovilizado en tests ELISA.

La figura 4 muestra el porcentaje de peces no tratados cuyos anticuerpos están unidos al virus de IPNV inmovilizado en tests ELISA.

purificaba utilizando el kit de limpieza para PCR Promega bajo las instrucciones del fabricante.

b) *Preparación de plásmidos pPICZαB recombinantes que contienen regiones codificantes de IPNV.*

5 [0104] Los productos PCR de IPNV purificados experimentaron una digestión con enzimas de restricción para facilitar la clonación en el vector de expresión de *Pichia pastoris*, pPICZαB. Los productos de PCR VP2var se digirieron utilizando las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *NotI* o *PstI* y *NotI* dependiendo del cebador utilizado, mientras que los productos de PCR VP3 se digirieron utilizando *PstI* y *NotI*. Las digestiones de restricción se establecieron combinando los siguientes componentes; 30 μl de producto PCR purificado, 4 μl de tampón de enzimas de restricción, 4 μl BSA acetilado (1mg/ml) y 1 μl de cada enzima de restricción. Las digestiones se incubaron a 37°C durante 90min. Además, el plásmido pPICZαB también se digirió utilizando las mismas enzimas para permitir la clonación de cada producto PCR de IPNV. Las digestiones de restricción de plásmidos se establecieron combinando los siguientes componentes; 1μg de ADN plasmídico, 1μl de tampón de enzimas de restricción, 1 μl BSA acetilado (1mg/ml), 1 μl de cada enzima de restricción y 5 μl de agua destilado. Las digestiones se incubaron a 37°C durante 90 min. Después del periodo de incubación, el ADN digerido se purificó de cada muestra mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol a -80°C durante 20 min. El ADN se agrupó mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 15 min, las agrupaciones de ADN se secaron al aire y se resuspendieron en 10 μl de agua destilada. Las uniones se prepararon combinando los siguientes componentes: 5 μl de producto PCR de IPNV digerido, 1 μl de plásmido pPICZαB digerido, 1 μl de 10x tampón ligasa, 2 μl de agua destilada y 1μl de T4 ADN ligasa. Las uniones se incubaron durante la noche a 4°C.

20 [0105] El siguiente día, se utilizó una alícuota de 3 μl de cada mezcla de unión para transformar células TOP10F' electrocompetentes de *E. coli* (Invitrogen) bajo las instrucciones del fabricante. Después de la recuperación celular, se emplacaron las alícuotas de las células transformadas sobre placas de LB agar que contenían zeocina 25 μg/ml y las placas se incubaron e invirtieron durante la noche a 37°C. Se utilizó cada colonia resultante para inocular 5 ml de medio LB que contenía zeocina 25 μg/ml que se incubó posteriormente durante la noche a 37°C con aireación vigorosa. Se preparó el plásmido pPICZαB recombinante a partir de 1 ml de cada cultivo de la noche utilizando el kit de preparación de plásmido 3'-5'. El cultivo restante se utilizó para preparar reservas de glicerol que se almacenaron a -80°C. Los plásmidos recombinantes se cribaron por la presencia de un inserto mediante digestión por restricción con *EcoRI* y *NotI* (VP2var) o *PstI* y *NotI* (VP3) utilizando el protocolo indicado previamente. Las digestiones se separaron electroforéticamente mediante un gel de agarosa al 1,5% que contenía bromuro de etidio 0,5 μg/ml. Los plásmidos que contenían los insertos de tamaño correcto se analizaron posteriormente mediante secuenciación de ADN automatizada.

35 c) *Preparación de líneas celulares de Pichia pastoris que expresan VP2var y VP3*

40 [0106] Los plásmidos pPICZαB recombinantes que se había observado que contenían la región codificante para VP2var o VP3 mediante en análisis de digestión por restricción y el análisis de secuencia de ADN se prepararon para la transformación en la cepa de *Pichia pastoris* GS115 tal como se indica a continuación. Las preparaciones de plásmido a gran escala de cada plásmido pPICZαB recombinante se realizaron utilizando el kit de preparación de plásmidos 3'-5' bajo las instrucciones del fabricante. Se prepararon aproximadamente 10 μg de cada plásmido. Los plásmidos recombinantes se linealizaron antes de su transformación en GS115 de *P. Pastoris* utilizando la enzima de restricción *SacI* mediante la combinación de los siguientes componentes: 5 μg de plásmido recombinante (40 μl aproximadamente), 6 μl 10x tampón de enzimas de restricción, 6 μl de BSA acetilada (1mg/ml), 6 μg de agua destilada y 2 μl de *SacI*. Las digestiones se incubaron a 37°C durante 90 min. Después de la incubación, el plásmido digerido se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol a -80°C durante 20 min. Los plásmidos linealizados se resuspendieron en 10 μl de agua destilada.

50 [0107] Las células de GS115 de *Pichia Pastoris* electrocompetentes se prepararon tal como se indica a continuación. Se utilizó una colonia individual de GS115 para inocular 5 ml de medio YPD que a continuación se incubó durante toda la noche a 30°C con aireación vigorosa. El día siguiente se utilizaron 0,5 ml de este cultivo de la noche para inocular 500 ml de medio YPD fresco que se desarrolló durante la noche al igual que antes. Las células se agruparon 1500 g durante 5 min a 4°C y el residuo celular se resuspendió en 500 ml de agua destilada estéril enfriada en hielo. Las células se agruparon al igual que antes y se resuspendieron en 250 ml de agua destilada estéril enfriada en hielo. Las células se agruparon de nuevo y se resuspendieron en 20 ml de sorbitol 1 M estéril enfriado en hielo, se agruparon por última vez y se resuspendieron en 1 ml de sorbitol 1 M enfriado en hielo. Las células se utilizaron inmediatamente. Se mezclaron 80 μl de las células electrocompetentes con 10 μl de plásmido linealizado descrito anteriormente y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm enfriada en hielo. La cubeta se incubó en hielo durante 5 min. La mezcla de células y ADN se sometió a pulsos en un Pulsador de Genes Bio-Rad con un voltaje de carga de 1500V, una capacitancia de 25PF y una resistencia de 200Ω. Se añadió 1ml de

sorbitol 1 M enfriado en hielo y el contenido se transfirió a un tubo estéril de 15 ml. Las células se dejaron recuperar mediante la incubación a 30°C durante 1-2h sin agitación. Se emplacaron alícuotas de las células sobre placas de YPDS que contenían zeocina 100 µg/ml. Las placas se incubaron durante 2-3 días a 30°C hasta formar colonias. Las colonias resultantes se cribaron por el fenotipo Mut tal como se indica a continuación.

5

[0108] Las colonias resultantes de la transformación de GS115 de *Pichia pastoris* se emplacaron en réplicas sobre placas de MMH y MDH. Las placas se incubaron a 30°C durante 2-3 días hasta la formación de colonias. Las colonias que era Mut^s muestran un crecimiento normal en ambas placas, mientras que las colonias que eran Mut^s muestran un crecimiento normal en placas MDH, pero poco crecimiento en placas MMH. Este método reveló todas las líneas celulares que contenían la región codificante de VP2var eran Mut^s, mientras que todas las líneas celulares que contenían la región codificante de VP3 eran Mut^s.

10

[0109] Se llevaron a cabo expresiones a pequeña escala utilizando las colonias de GS115 de *Pichia Pastoris* recombinante con el fin de cribar la expresión de VP2var y VP3 en estas líneas celulares.

15

[0110] *Pichia* que contenía VP2var (Mut^s): Cada colonia se utilizó para inocular 25 ml de medio BMGY en un matraz de 250 ml. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30°C con aireación vigorosa. El día siguiente, las células se recogieron a 1500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el residuo celular se resuspendió en 100 ml de BMMY para inducir la expresión de proteína. El cultivo se incubó en un matraz de 1 l a 30°C con aireación vigorosa añadiendo metanol al 100% hasta una concentración final de 0,5% cada 24 horas. Se extrajeron alícuotas de 1 ml en los siguientes puntos de tiempo: 0, 6, 8, 24, 32, 48, 56, 72 y 80 horas, las células se agruparon y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, Tanto el residuo celular como el sobrenadante se guardaron a -80°C hasta que se recogieron muestras en todos los puntos de tiempo.

20

25

[0111] *Pichia* que contiene VP3 (Mut^s): Se utilizó cada colonia para inocular 100 ml de medio BMGY en un matraz de 1 l. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30°C con aireación vigorosa. El día siguiente las células se recogieron a 1500g durante 5 min a temperatura ambiente y el residuo celular se resuspendió en 20 ml de BMMY para inducir la expresión de proteínas. El cultivo se incubó en un matraz de 250 ml a 30°C con aireación vigorosa añadiendo metanol al 100% hasta una concentración final de 0,5% cada 24 horas. Se extrajeron alícuotas de 1 ml en los siguientes puntos de tiempo: 0, 24, 48, 72 y 96 horas, las células se agruparon y el sobrenadante se transfirió a un tubo fresco. Tanto el residuo celular como el sobrenadante se almacenaron a -80°C hasta que se recogieron muestras en todos los puntos de tiempo.

30

35

[0112] Las muestras recogidas durante la expresión a pequeña escala se analizaron mediante SDS-PAGE a través de un gel de acrilamida al 15%. Se desarrollaron dos geles idénticos para cada muestra, uno de los cuales se tiñó con Azul de Coomassie para visualizar las proteínas y el otro se sometió a transferencia western sobre nitrocelulosa y se inmunotransfirió con anticuerpos monoclonales específicos anti-CP2 y anti-VP3. Esto permitió determinar el periodo de expresión óptima para cada línea celular.

40

[0113] Las reservas de glicerol se prepararon para cada línea celular que mostraba una buena expresión de VP2var o VP3. Éstas se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 2 – Producción alternativa de vp2var \ vp3

45

a) *Construcción de plásmidos recombinantes*

[0114] Se utilizó PCR para amplificar las regiones codificantes de VP3 o VP2var utilizando los cebadores de PCR: VP3 directo 2342-2367

50

5' gacgctgcagtgcaacgcctctg 3'

VP3inverso 2936-2967

55

5' gtgcagcgccgccgggggctgctgtttcatc 3'

VP2var directo 602-630

5' accactgcagtcacagtcctgaatc3'

60

VP2var inverso 1143-1172

5' gagcgcggccgcccaattccgttcctg3'

5 [0115] Los productos de PCR se digirieron utilizando las enzimas de restricción *Pst*I y *Not*I para producir extremos cohesivos. Las secuencias se unieron en el plásmido de expresión pPICZαB que se había digerido utilizando las enzimas de restricción *Pst*I y *Not*I y se desfosforilaron utilizando fosfatasa alcalina de intestino de ternera. Los plásmidos recombinantes se transformaron en la cepa de *E. coli* TOP10F' utilizando electroporación estándar. La mezcla transformante se emplaceó sobre placas de LB agar que contenían zeocina 25 µg/ml. Se utilizaron transformantes para inocular 2 ml de medio LB que contenía zeocina 25 µg/ml y se desarrollaron durante la noche a 37°C con agitación. El plásmido se aisló de cada cultivo de la noche utilizando una metodología estándar y se secuenciaron los ADN plasmídicos para confirmar la secuencia de los insertos.

b) *Generación de clones de recombinantes de Pichia Pastoris*

15 [0116] Se digirieron 5-10 µg de ADN plasmídico recombinante con *Pme*I utilizando metodología estándar. Se utilizaron 20 µl de la mezcla del digesto para transformar 100 µl de células competentes de la cepa GS115 de *Pichia pastoris* utilizando el kit Easycomp Transformation (Invitrogen) bajo las instrucciones del fabricante. La mezcla de transformación se emplaceó en placas de agar YPD que contenían zeocina 100 µg/ml y se incubaron a 30°C durante 2-4 días.

20

c) *Expresión de proteína VP3 o VP2var recombinante*

[0117] Se utilizó una colonia individual de *Pichia* recombinante que contenía pPICZαB/VP3 o pPICZαB/VP2var para inocular 25 ml de medio BMW en un matraz cónico deflectado de 250 ml. El cultivo se desarrolló a 30°C en un incubador con agitación (250-300 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una DO600 de 3,0. Las células se recogieron mediante centrifugación a 2000rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el residuo celular se resuspendió en medio BM hasta una DO600 de 1,0. El cultivo se colocó en un matraz cónico deflectado de un litro y se continuó la incubación a 30°C en un incubador con agitación (250-300rpm) durante un periodo de 72-108h. Se añadió metanol al 100% a cada cultivo, cada 24 horas, hasta una concentración final de 0,5%. Después de la expresión, se recogió la proteína recombinante mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó, se esterilizó por filtración y se puso en alícuotas de 1 ml de muestra. Las muestras de sobrenadante se almacenaron a -20°C. Se analizó una muestra de cada cultivo de expresión para la expresión de proteínas utilizando SDS-PAGE y transferencia western utilizando antisuero específico. Las secuencias se proporcionan en el Anexo C y D.

35

Ejemplo 3 – Producción de un clon híbrido de vp2var\vp3

a) *Construcción de plásmidos recombinantes*

40 [0118] Se utilizó la PCR para amplificar las regiones codificantes de VP3 y VP2var utilizando los cebadores de PCR: VP3 directo 2342-2367

5' gacgctgcagtgcaacgcctctg 3'

45 VP3 inverso 3023-3044

5' ctctctagagtctccgctggg 3'

50 VP2var directo 603-622

5' ccctcagagtcacagtcctg 3'

VP2var inverso 1143-1172

55 5' gagcgcggccgcccaattccgttcctg3'

[0119] Las secuencias de nucleótidos amplificadas, cuando se unen, codifican una proteína híbrida que consiste en los aminoácidos 9-244 de VP3 fusionados a los aminoácidos 163-357 de VP2.

60 [0120] Los productos de PCR se mezclaron y se digirieron utilizando las enzimas de restricción *Pst*I, *Xba*I y *Not*I para

producir extremos cohesivos. Los productos de PCR VP3 y VP2var se unieron para producir una secuencia híbrida. La secuencia híbrida se unió posteriormente en el plásmido de expresión pPICZαB que se había digerido utilizando las enzimas de restricción *Pst*I y *Not*I y se desfosforiló utilizando fosfatasa alcalina intestinal de ternera. Los plásmidos recombinantes se transformaron en la cepa TOP10F' de *E. coli* utilizando la electroporación estándar. La mezcla transformantes se emplacó en placas LB agar que contenían zeocina 25 µg/ml. Los transformantes se utilizaron para inocular 2 ml de medio LB que contenía zeocina 25 µg/ml y se desarrollaron durante la noche a 37°C con agitación. El plásmido se aisló de cada cultivo de la noche utilizando metodología estándar y los ADN plasmídicos se secuenciaron para confirmar la secuencia de los insertos.

10 b) Generación de clones recombinantes de *Pichia pastoris*

[0121] Se digirieron 5-10 µg de ADN plasmídico recombinante con *Pme*I utilizando metodología estándar. Se utilizaron 20 µl de la mezcla de digesto para transformar 100 µl de células competentes de la cepa GS115 de *Pichia Pastoris* utilizando el kit de Easycomp (Invitrogen) bajo las instrucciones del fabricante. La mezcla de transformación se emplacó sobre placas de agar YPD que contenían zeocina 100 µg/ml y se incubaron a 30°C durante 2-4 días.

15 c) Expresión de proteína recombinante VP3 o VP2var

[0122] Se utilizó una colonia individual de *Pichia* recombinante que contenía el híbrido pPICZαB/VP3VP2var para inocular 25 ml de medio BMGH en un matraz cónico deflectado de 250 ml. El cultivo se desarrolló a 30°C en un incubador con agitación (250-300 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una DO600 de 3,0. Las células se recogieron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el residuo celular se resuspendió en medio BM hasta una DO600 de 1,0. El cultivo se colocó en un matraz cónico deflectado de un litro y se continuó la incubación a 30°C en un incubador con agitación (250-300 rpm) durante un periodo de 72-108h. Se añadió metanol al 100% a cada cultivo, cada 24 horas, hasta una concentración final de 0,5%. Después de la expresión, se recogió la proteína recombinante mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó, se esterilizó por filtración y se puso en alícuotas de 1 ml de muestra. Las muestras de sobrenadante se almacenaron a -20°C. Se analizó una muestra de cada cultivo de expresión para la expresión de proteínas utilizando SDS-PAGE y transferencia western utilizando antisuero específico.

30 Ejemplo 4 – Expresión a gran escala de VP2var y VP3 para inmunización

[0123] Los antígenos tal como se han descrito anteriormente para la utilización en las vacunas de la presente invención se pueden preparar de manera opcional de la siguiente manera.

35 i) Para la expresión secretada de Mut⁺ (GS115/ pPICZαB/VP2var/Mut⁺): Se utilizó una colonia individual para inocular 25 ml de medio BMGY en un matraz reflectado de 250 ml. El cultivo se incubó a 28-30°C (250-300 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una DO600 = 2-6 (aproximadamente 16-18 h). El cultivo de la noche se utilizó para inocular 1 l de BMGY en un matraz reflectado de 3 ó 4 l y se desarrolló a 28-30°C con agitación vigorosa (250-300rpm) hasta que el cultivo alcanza una DO600 = 2-6. Las células se recogieron mediante centrifugación a 1500-3000 xg durante 5 min a temperatura ambiente. La expresión se indujo mediante la resuspensión del residuo celular hasta una DO600 = 1,0 (2-6 litros) en medio BMMY para iniciar la inducción. Los cultivos se desarrollaron a 28-30°C con agitación. Se añadió metanol al 100% a 0,5% cada 24h hasta que se alcanzó el tiempo óptimo de inducción. Para GS115/ pPICZαB/VP2var/Mut⁺ 1 el tiempo óptimo es de 56 h; para GS115/pPICZαB /VP2var/Mut⁺ 40 el tiempo óptimo es de 32h; para GS115/ pPICZαB /VP2var/Mut⁺ 34 el tiempo óptimo es de 24h. Las células se recogieron mediante centrifugación a 1500x g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se guardó, se enfrió hasta +4 °C y se esterilizó por filtración. La proteína expresada se guardó en alícuotas de 1 ml a -80 °C.

50 ii) Para la expresión secretada de Mut^s (GS115/ pPICZαB/VP3/Mut^s): Se utilizó una colonia individual para inocular 10 ml de medio BMGY en un matraz deflectado de 100 ml. Ésta se desarrolló a 28-30°C (250-300 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una DO600 = 2-6 (aproximadamente 16-18h). Este cultivo de la noche se utilizó para inocular 1 l de BMGY en un matraz reflectado de 3 ó 4 l y se desarrolló a 28-30°C con agitación vigorosa (250-300rpm) hasta que el cultivo alcanza una DO600 = 2-6. Las células se recogieron mediante centrifugación a 1500-3000 xg durante 5 min a temperatura ambiente. La expresión se indujo mediante la resuspensión del residuo celular en 1/5 a 1/10 del volumen original de cultivo en medio BMMY (aproximadamente 100-200 ml). El cultivo se colocó en un matraz reflectado de 1 l y se devolvió al incubador a 28-30°C con agitación. Se añadió metanol al 100% a 0,5% cada 24 h hasta alcanzar el tiempo óptimo de inducción. Para GS115/ pPICZαB/VP3/Mut^s 30.16 el tiempo óptimo es de 72 h; para GS115/ pPICZαB/VP3/Mut^s 30.17 el tiempo óptimo es de 48 h; para GS115/ pPICZαB/VP3/Mut^s 30.18 el tiempo óptimo es de 48 h; para GS115/ pPICZαB/VP3/Mut^s 28 el tiempo óptimo es de 72 h. Las células se recogieron mediante centrifugación a 1500-3000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se guardó, se

enfrió hasta +4 °C y se esterilizó por filtración. La proteína expresada se guardó en alícuotas de 1 ml a -80 °C.

[0124] Se pasó una muestra de cada proteína recombinantes esterilizada por filtro a través de SDS-PAGE al 10% y se tiñó con Coomassie para comprobar la inducción.

5

Ejemplo 5- Respuesta a la dosis para IPN en salmón

[0125] El salmon del atlántico, *Salmo salar*, utilizado en estos experimentos se criaron en la Fish Cultivation Unit of the Marine Laboratory, Aultbea, Wester Ross, Escocia. Antes de todos los procedimientos experimentales, los peces se anestesiaron utilizando 4-amino benzoato de etilo (Benzocaine, BDH Chemicals, Poole, Dorset, Reino Unido).

10

[0126] Todos los experimentos se realizaron en tanques de un metro que contenían 350 litros de agua nueva, suministrada a aproximadamente 10 litros por minuto por tanque. Los peces se alimentaron diariamente (Mainstream diets, BP Nutrition) hasta la saciedad.

15

Inmunización

[0127] Se utilizaron cinco dosis: 10, 35, 70, 100 y 150 µg de cada una de VP2var y VP3 combinadas. La vacuna bivalente se diluyó en PBS y se mezcló con el adyuvante (Montanide ISA 711®, Sepic) en una proporción 30:70, respectivamente. Los peces se inyectaron i.p. con 0,1 ml de una vacuna que contenía 20, 70, 140, 200 y 300 µg de vacuna bivalente. Los peces inyectados i.p. con PBS más adyuvante (proporción 30:70) se utilizaron como control. Durante el periodo experimental, los peces se mantuvieron a 7°C durante 4 semanas y a continuación se transfirieron a 14°C.

20

[0128] Los grupos se muestran en la Tabla 1:

25

Tabla 1

Dosis por pez	No. pez
Control	60
20 µg	59
70 µg	59
140 µg	45
200 µg	55
300 µg	50

Estimulación

[0129] Antes de la estimulación, se hicieron sangrar 10 peces de cada grupo (excepto una dosis de 140 µg/peces donde sangraron 5 peces). Once semanas después de la vacunación, los peces se separaron en tres grupos:

30

1. Un grupo de peces se estimuló intraperitonealmente con IPNV desarrollado en células CHSE-214 a una dosis de $1,7 \times 10^7$ TCID₅₀ por pez. Se extrajeron muestras de sangre 4 y 10 semanas después de la estimulación.

35

2. Al segundo grupo se administró un tratamiento de dos semanas de vacuna de refuerzo oral. Se extrajeron muestras de sangre 4 y 10 semanas después de acabar el refuerzo oral

3. El tercer de peces permaneció sin tratar. Las muestras se tomaron 18 y 24 semanas después de la vacunación.

40

Ejemplo 6 – Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) de IPNV

[0130] Los peces se inmunizaron con una vacuna bivalente (VP2var y VP3) tal como se describe en el ejemplo 5.

45

[0131] El virus IPNV precipitado con PEG se diluyó con tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 para producir 5×10^7 TCID₅₀/ml y se utilizó (100 µl) para recubrir los pocillos individuales (Immulon 4 HBX, Dynex Technologies Inc, USA). Las placas recubiertas se incubaron a 4°C durante 48 h, se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween-20 (PBS-Tween) al 0,05%, se bloquearon con leche descremada en polvo al 5% en PBS-Tween durante 1 h a 37°C, se lavaron con PBS-Tween y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

50

[0132] Todas las posteriores diluciones y lavados ente incubaciones se realizaron en PBS-Tween. Se diluyó en serie de dos veces (1:60 a 1:1920) antisuero de salmón y se incubó por duplicado a 4°C durante la noche. Se utilizó un

grupo de suero de los peces de control como control negativo. Se utilizó un control positivo en todas las placas. La incubación con PBS-Tween se utilizó como blanco. Después del lavado, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente Ig anti-salmón de ratón (4C10) diluida 1:8. Se incubó 1h Ig (Sigma) anti-ratón de cabra conjugada con peroxidada de rábano picante diluida 1:1000.

5

[0133] Se añadió tetrametilbencidina (TMB, Sigma), 100 µl/pocillo como sustrato y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se leyeron espectrofotométricamente a 630 nm utilizando un lector ELISA (DIAS, Dynatech Laboratories).

10 **Ejemplo 7 – Ensayo de neutralización de suero de IPNV**

[0134] El efecto protector de la vacunación con la vacuna de subunidades de IPNV se verificó utilizando un ensayo de anticuerpos neutralizantes de la siguiente manera.

15 [0135] Los peces se inmunizaron con una vacuna bivalente (VP2var y VP3) tal como se describe en el ejemplo 5.

[0136] Las muestras de suero inactivadas por el calor de peces vacunados se prepararon mediante dilución en serie en E-MEM + suero de bovino fetal al 2% (FBS) y se mezclaron con virus de IPN vivos en microplacas de 96 pocillos hasta una concentración final de 500 TCID50 por 100 µl pocillo. Después de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se aplicaron alícuotas de 50 µl de estas muestras que contenían virus y plasma en las concentraciones apropiadas a pocillos que contenían células de embriones de salmón chinook confluentes (CHSE-214) en 75 µl de E-MEM +10 % FBS. Los controles se prepararon mediante sustitución de suero de salmón normal agrupado o la omisión de virus según sea apropiado. Todos los cultivos se incubaron durante 7 días 15 °C, y a continuación, se determinó la lisis celular inducida por el virus mediante la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro en formato de microplacas.

20

[0137] La eficacia de la vacuna se demostró mediante el número de peces que muestran mayores titulaciones de anticuerpo y anticuerpos neutralizantes (Figs 2-4, Tablas 2-3). La Tabla 2 se muestra a continuación.

30

Tabla 3a

Grupo	No. en el grupo	Tratamiento
1	60 peces	Control a 100µl/peces
2	59 peces	20 µg a 100µl/peces
3	59 peces	70 µg a 100µl/peces
4	45 peces	140 µg a 100µl/peces

Tabla 3b

Grupo	No. de peces analizados	No. con Abs neutralizantes
2	3	2/3
3	4	3/4
4	5	3/3

35

[0138] La tabla 3 muestra el número de peces, cuyos anticuerpos neutralizaron IPNV en un ensayo de neutralización. (3a) muestra los detalles de los grupos de peces. Los peces utilizados fueron aquellos que dieron resultados positivos en las pruebas ELISA. (3b) muestra los resultados de los ensayos de neutralización. Se tomó suero de os peces no estimulados 18 semanas después de la vacunación.

40 **Ejemplo 8 – Pruebas de vacunación adicionales**

[0139] Los datos anteriores se confirmaron en pruebas adicionales. Estas pruebas utilizaron lo siguiente:

45

(1) Una vacuna de inyección que contiene dos proteínas de IPN descritas anteriormente, un desactivante, un diluyente y el adyuvante de aceite sintético Montanide ISA711 (AquaVac™ IPN – para inyección)

(2) Un (refuerzo) oral que contiene las dos proteínas de IPN, un diluyente, y un sistema de portadores adyuvantes que incluye un aceite y un emulsionante (AquaVac™ IPN Vacuna Oral).

50

(3) Una vacuna de inyección multivalente que contiene las dos proteínas de IPN, antígenos de *Aeromonas salmonicida*, un desactivante, un diluyente, y el adyuvante de aceite sintético Montanide ISA711 (AquaVac™ FNM

PLUS IPN Vacuna para inyección).

(4) Una vacuna multivalente que contiene las proteínas de IPN, *Aeromonas salmonicida* y uno o más antígenos de *Vibrio* (incluyendo *V. anguillarum*, *V. salmonicida* y *V. viscosus*), un desactivante, un diluyente, más el adyuvante de aceite sintético Montanide ISA711. (AquaVac™ FV4-IPN para inyección).

[0140] Los resultados en la Tabla 4 se muestran a continuación.

[0141] Tal como se puede observar a partir de la Tabla, las vacunas según la presente invención, producidas en *Pichia Pastoris*, fueron sorprendentemente eficaces. Considerando Ref10, la vacuna mostró una eficacia considerablemente superior que Norvax(R)Compact 6 VAT (Intervet Norbio) que se basa en rVP2 producida en *E. coli*.

[0142] En estudios comparativos relacionados, una vacuna de VP2/VP3 producida en *Pichia* daba lugar a una mayor proporción de peces que producían anticuerpos específicos para IPNV que una vacuna de *E. coli* comparable. Adicionalmente, los peces inmunizados con la vacuna producida por *Pichia* y a continuación estimulados con el virus de IPN fueron capaces de eliminar el virus de sus sistemas. Este no fue el caso para la vacuna producida por *E. coli*.

Referencias

[0143]

Wolf, K., Snieszko, S.F., Dunbar, C.E. & Pyle, E. (1960). Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*, 104; 105-108.

Pilcher, K.S. & Fryer, J.L. (1980). The viral disease of fish: a review through 1978. *Critical Reviews in Microbiology*, 7: 287-364.

Park, J.W. (1991). Characteristics of Infectious Pancreatic Necrosis Virus isolated from rainbow trout in Korea, Ph.D. Thesis, Seoul National University.

Cohen, J., Poinard, A. & Scherrer, R. (1973). Physiochemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology*, 21: 485-98.

Dobos, P. (1977). Virus specific protein synthesis in cells infected with infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology*, 21: 242-258.

Chang, N., MacDonald, R.D. & Yamamoto, T. (1978). Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 19-27.

MacDonald, R.D. & Dobos, P. (1981). Identification of proteins encoded by each genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 114: 414-422.

Persson, R.H. & MacDonald, R.D. (1982). Evidence that infectious pancreatic necrosis virus has a genome linked protein. *Journal of Virology*, 44: 437-443.

Dobos, P., Hill, B.J., Hallett, R., Kells, D.T.C., Becht, H. & Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *Journal of Virology*, 32: 593-605.

Dobos, P. & Rowe, D. (1977). Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus- specific polypeptides. *Journal of Virology*, 24: 805-820.

Anexo de secuencias

[0144]

Anexo A – aminoácidos 154-326 de VP2 var

QDKVNNQ LVTKGVTVLN LPTGFDKPYV RLEDETPQGL QSMNGAKMRC
 TAAIAPRRYE IDLPSQRLPP VPATGTLTTL YEGNADIVNS TTVTGDINFS
 LAEQPANETK FDFQLDFMGL DNDVPVVTVV SSVLATNDNY RGVSAKMTQS
 IPTENITKPI TRVKLSYKIN Q

10 Anexo B – Aminoácidos 1-238 de VP3

MASNASGMDE ELQRLNATM ARAKEVQDAE IYKLLKLMW TRKNDLTDHM
 YEWSKEDPDA LKFGKLISTP PKHPEKPKGP DQHHAQEARA TRISLDAVRA
 GADFATPEWV ALNNYRGPSP GQFKYYLITG REPEPGDEYE DYIKQPIVKP
 TDMNKIRRLA NSVYGLPHQE PAPEEFYDAV AAVFAQNGGR GPDQDQMQL
 RELARQMKRR PRNADAPRRT RAPAEPAPPG RSRFTPSG

Anexo C – aminoácidos 167-352 de VP2var

QRLNA TMARAKEVQD AEIYKLLKLM AWTRKNDLTD HMYEWSKEDP
 DALKFGKLIS TPPKHPEKPK GPDQHHAQEA RATRISLDAV RAGADFATPE
 WVALNNYRGP SPGQFKYYLI TGREPEPGDE YEDYIKQPIV KPTDMNKIRR
 LANSVYGLPH QEPAPEEFYD AVAAVFAQNG GRGPDQDQMQ DLRELARQMK
 RRP

Anexo D – Aminoácidos 12-199 de VP3

TVLNLP TGFDKPYVRL EDETPQGLQS MNGAKMRCTA AIAPRRYEID
 LPSQRLPPVP ATGTLTTLYE GNADIVNSTT VTGDINFSLA EQPANETKFD
 FQLDFMGLDN DVPVVTVVSS VLATNDNYRG VSAKMTQSIP TENITKPITR
 VKLSYKINQQ TAIGNVATLG TMGPASVSFS SGNGN

Anexo E - Aminoácidos 12-238(VP30 +163-352(VP2var))

QRLNA TMARAKEVQD AEIYKLLKLM AWTRKNDLTD HMYEWSKEDP

5 DALKFGKLIS TPPKHPEKPK GPDQHHQEA RATRISLDAV RAGADFATPE
 WVALNNYRGP SPGQFKYYLI TGREPEPGDE YEDYIKQPIV KPTDMNKIRR
 LANSVYGLPH QEPAPEEFYD AVAAVFAQNG GRGPDQDQMQ DLRELARQMK
 10 RRPRNADAPR RTRAPAE PAP PGRSRFTPSG DSTVTVLNLP TGFDKPYVRL
 EDETPOGLQS MNGAKMRCTA AIAPRRYEID LPSQRLPPVP ATGTLTTLYE
 GNADIVNSTT VTGDINFSLA EQPANETKFD FQLDFMGLDN DVPVVTVVSS
 15 VLATNDNYRG VSAKMTQSIP TENITKPITR VKLSYKINQQ TAIGNVATLG
 TMGPASVSFS SGNGN

20

La Tabla 2 muestra el número de peces estimulados, reforzados y no tratados cuyos anticuerpos se unieron a IPNV inmovilizados en pruebas ELISA.

	Preestimulación semanas después de la vacunación	ESTIMULACIÓN CON IPNV		TRATAMIENTO DE REFUERZO		PECES NO TRATADOS	
		semanas después de la vacunación (después de la estimulación)		semanas después de la vacunación (después del refuerzo)		semanas después de la vacunación	
	11	15(4)	21(10)	18(4)	24(10)	18	24
DOSIS	ELISA+ve*	ELISA+ve	ELISA+ve	ELISA+ve	ELISA+ve	ELISA+ve	ELISA+ve
Control	(1:300)	(1:160)	(1:45)	(1:192)	(1:192)	(1:120)	(1:120)
20 µg	1/10	0/10	3/9	0/6	0/9	4/6	1/9
70 µg	(1:240)	0/10	(1:120)	1/6	0/8	(1:150)	(1:120)
140 µg	0/10	6/10	5/10	(1:240)	0/4	4/6	0/9
200 µg	(1:720)	(1:167)	(1:156)	0/6	0/5	(1:180)	0/3
300 µg	0/5	6/10	6/9-	1/6	2/6	3/6	3/5
	2/10	(1:160)	(1:200)	(1:240)	(1:600)	(1:100)	(1:120)
	(1:720)	6/10	8/10	3/6		5/6	1/7
	4/10	(1:260)	(1:231)	(1:320)		(1:168)	(1:120)
	(1:900)		8/10			1/4	
			(1:203)			(1:960)	

*No. pez ELISA+ve/No. pez de muestra (título en ELISA promedio para peces positivos)

25

TABLA 4 – DATOS DE EFICACIA PARA VACUNAS PARA IPN

Ref	Números de peces	Localización de estudio	Vacuna utilizada (ref)/Vía de administración	Resultados de la eficacia
1	2000	Shetlands	AquaVac FNM Plus IPN/mediante inyección (3)	Los peces se vacunaron en la piscifactoría 10 semanas antes de la transferencia al agua del mar. Una infección natural de IPN apareció aproximadamente 11 semanas después de la transferencia al agua del mar. · 5% de peces no

				<p>vacunados muertos.</p> <ul style="list-style-type: none"> · 3,2% de peces vacunados muertos · RPS = 35%
2	?	Marine Harvest Lab Prueba de estimulación	AquaVac FNM Plus IPN/mediante inyección (3)	<p>Los peces se administraron con 0,1 ml de inyección de vacuna, a continuación se transfirieron al agua del mar después de 5 meses, a continuación se estimularon mediante cohabitación con peces infectados con IPN 4 semanas después de la transferencia. A los 14 días después de la estimulación,</p> <ul style="list-style-type: none"> · 40% de controles no vacunados muertos. · 15% de vacunados habían muerto · RPS (porcentaje relativo de supervivencia) = 63%
3	126.000 vacunaciones 27.500 controles	Chile (Marine Harvest)	<ul style="list-style-type: none"> · IPN/mediante inyección (1) · IPN oral (2) dosis de refuerzo 	<p>Vacunación por inyección de peces en febrero. Transferencia al agua del mar en junio. Vacuna oral de refuerzo administrada 2 semanas después. Apareció una infección natural de IPN aproximadamente 8 semanas después de la transferencia al agua del mar. En las primeras 4 semanas después del inicio de la infección,</p> <ul style="list-style-type: none"> · 6% de los controles no vacunados murieron No hubo muertes por IPN en peces vacunados
4	100.000 vacunaciones	Chile (Robinson Crusoe)	<ul style="list-style-type: none"> · IPN/mediante inyección (1) · IPN oral (2) dosis de 	<p>Vacunación por inyección de peces en febrero.</p>

			refuerzo	<p>Transferencia al agua del mar 15 semanas después. Refuerzo oral administrado 11-13 semanas después. Apareció una infección natural de IPN 14 semanas después de la transferencia al agua del mar (2-4 semanas después la vacunación oral de refuerzo contra IPN). El brote duró 3 semanas. ·2% de controles no vacunados murieron en la primera semana · Mortalidad acumulada en controles durante un periodo de 4 semanas fue de 4,6%. No hubo muertes por IPN en peces vacunados</p>
5	82.000 vacunaciones 122.000 controles (FNM Plus)	Reino Unido (Papil)	<ul style="list-style-type: none"> · AquaVac FNM Plus IPN/mediante inyección (3) ·IPN oral (2) dosis de refuerzo . 	<p>Vacunación por inyección de peces en febrero-marzo. Transferencia al agua del mar. Refuerzo oral administrado 3 meses después de la dosis de inyección. Apareció una infección natural de IPN aproximadamente 4 semanas después de la administración de la dosis oral de refuerzo. · Muertes promedio por IPN en controles = 5% · Muertes promedio por IPN en vacunados = 2,95% RPS = 42%</p>
6		Chile (Clase Aqua) 2 sitios	<ul style="list-style-type: none"> · IPN/mediante inyección (1) ·IPN oral (2) dosis de refuerzo 	<p>Mortalidad en el sitio 1: · Controles 9% · Vacunaciones 3% Mortalidad en el sitio</p>

				2: · Controles 4,2% · Vacunaciones 1,5%
7	44.000 vacunaciones 115.000 controles	Chile (Multi Export) 2 sitios	· IPN/mediante inyección (1) · IPN oral (2) dosis de refuerzo	Mortalidad en el sitio 1: · Controles 6,41% · Vacunaciones 1,39% RPS = 78% Mortalidad en el sitio 2 (2 grupos de vacunaciones, 1 de controles): · Controles 3,51% · Vacunaciones 0,98% y 0,75% RPS = 77% y 84%
8		Marine Harvest	· FV4-IPN (4) mediante inyección	Mortalidad: · Controles 14% · Vacunaciones 3% RPS = 79%
9		VIKAN (Noruega) Estimulación	· FV4-IPN (4) mediante inyección Lab.	Mortalidad: · Controles 12% · Vacunaciones 7% RPS = 42%
10	90.000 vacunaciones con FV4-IPN + IPN oral 90.000 con Compact 6 (sistema de expresión de E. coli)	Hydrotech (Noruega)	· FV4-IPN (4) mediante inyección · IPN oral (2) dosis de refuerzo	Mortalidad: · Controles Compact 6) 8,12% · Vacunaciones 2,79%
(1) AquaVac™ IPN – para inyección (2) AquaVac™ IPN – oral (3) AquaVac™ FNM ^{PLUS} IPN – para inyección (4) AquaVac™ FV4-IPN – para inyección				

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para la producción de una vacuna bivalente para la utilización contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en peces, caracterizado porque comprende:
- (i) cultivar células huésped de levadura que expresan dos polipéptidos diferentes de IPNV que son respectivamente:
- 10 (a) un polipéptido VP3 de IPNV o un fragmento del mismo que comprende una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia del Anexo B o el Anexo D
- (b) un polipéptido VP2 de IPNV o un fragmento del mismo que comprende una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia del Anexo A o el Anexo C,
- 15 en el que en cada caso el polipéptido o el fragmento es capaz de estimular la producción de anticuerpos que se unen a IPNV,
- y en el que los polipéptidos de IPNV expresados se secretan de las células huésped en el sobrenadante de cultivo,
- 20 (ii) formular los polipéptidos de IPNV como una vacuna.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el que la célula huésped de levadura es *Pichia Pastoris*.
- 25 3. Proceso según la reivindicación 1, en el que las células huésped se separan del sobrenadante, y el sobrenadante que contiene los polipéptidos de IPNV secretados se formula como la vacuna.
4. Proceso según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que los polipéptidos de IPNV se secretan con una secuencia señal que es la secuencia señal del factor de apareamiento α de levadura.
- 30 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la vacuna se formula mediante dilución con PBS o la adición de adyuvante o una combinación de los mismos.
- 35 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:
- (i) aislar una región codificante de ácidos nucleicos de IPNV que codifica:
- 40 (a) un polipéptido VP3 de IPNV o un fragmento del mismo que comprende una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia del Anexo B o el Anexo D, o
- (b) un polipéptido VP2 de IPNV o un fragmento del mismo que comprende una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia del Anexo A o el Anexo C,
- 45 en el que en cada caso el polipéptido o el fragmento es capaz de estimular la producción de anticuerpos que se unen a IPNV,
- (ii) preparar un ADN plasmídico recombinante que contiene la región codificante de IPNV
- (iii) preparar líneas celulares de levadura que expresan el polipéptido de IPNV,
- 50 (iv) cribar la expresión del polipéptido de IPNV en las líneas celulares.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los polipéptidos de IPNV son codificados por múltiples copias de la región codificante de genes de IPNV unidos para formar un único marco de lectura abierto con un único codón de iniciación y de terminación para producir un antígeno de IPNV multivalente.
- 55 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que los polipéptidos de IPNV se expresan en diferentes células huésped de levadura.
- 60 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que cada uno de los polipéptidos de IPNV está

presente como dos o más copias de antígeno fusionadas en la orientación correcta para la expresión como un único polipéptido, de manera que se producen antígenos de IPNV multiméricos.

5 10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los polipéptidos de IPNV son VP3 que presentan la secuencia del Anexo B o el anexo D y VP2 que presenta la secuencia del Anexo A o el Anexo C.

10 11. Proceso según la reivindicación 10 en el que el ácido nucleico que codifica las regiones codificantes de IPNV se aísla utilizando las parejas de cebadores directo e inverso específicos para VP3 o VP2, en el que las parejas de cebadores se seleccionan entre:

CTA ACA ACG GAA TTC ATG GAC AAA GTC VP2 cebador directo (SEC ID. NO. 1)

GAAGCTGCAGAGGACAAAGTCAAC VP2var directo (SEC ID. NO. 2)

15 CGT TGC CGA TTG GCG GCC GCT GGT TGA TC VP2 cebador inverso (SEC ID. NO. 3)

ACCACTGCAGTCACAGTCCTGAATC VP2 directo (SEC ID. NO. 4)

20 GAGCGCGGCCGCGCAATTCCGTTCCCTG VP2 inverso (SEC ID. NO. 5)

CCT GGG ACT GCA GAT GGC ATC AAA TG VP3 cebador directo (SEC ID. NO. 6)

GTT ACA CCG CGG CCG CGT CTC CGC TGG G VP3 cebador inverso (SEC ID. NO. 7)

25 GACGCTGCAGTGCAACGCCTCCTG VP3 directo (SEC ID. NO. 8)

GTGCAGCGGCCGCGGGGGTCGTCTTCATC VP3inverso (SEC ID. NO. 9)

30 GACGCTGCAGTGCAACGCCTCCTG VP3 directo (SEC ID. NO. 10)

CTCTCTAGAGTCTCCGCTGGG VP3 inverso (SEC ID. NO. 11)

CCCTCAGAGTCACAGTCCTG VP2 directo (SEC ID. NO. 12)

35 GAGCGCGGCCGCGCAATTCCGTTCCCTG VP2 inverso (SEC ID. NO. 13)

12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el polipéptido de IPNV o cada uno de ellos se une a un polipéptido enlazador adaptado para unir el polipéptido a una micropartícula.

40 13. Proceso según la reivindicación 12 que comprende además la etapa de formular el polipéptido de IPNV o cada uno de ellos para hacerlo adecuado para la administración mediante la incorporación por inmersión o por vía oral en el alimento de los peces por empaquetamiento en un sistema de liberación de micropartículas seleccionado entre: partícula de látex; microesferas de poli(láctido-co-glicólido); minipélets de atelocolágeno; bentonita; o cerámicas de apatita porosas.

45 14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además la etapa de combinar la vacuna con otros antígenos bacterianos para controlar otras enfermedades.

50 15. Vector de expresión de levadura caracterizado porque el vector codifica dos polipéptidos diferentes de IPNV que son:

(a) un polipéptido VP3 de IPNV o un fragmento del mismo que comprende una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia del Anexo B o el Anexo D

55 (b) un polipéptido VP2 de IPNV o un fragmento del mismo que comprende una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia del Anexo A o el Anexo C,

en cada caso fusionado a una secuencia señal de secreción,

60 y en el que en cada caso el polipéptido o fragmento es capaz de estimular la producción de anticuerpos que

se unen a IPNV.

16. Célula huésped de levadura que contiene o es transformada con el vector de la reivindicación 15.

5 17. Vacuna bivalente para utilizar contra el IPNV en peces, cuya vacuna comprende sobrenadante de una célula huésped de levadura que comprende dos polipéptidos diferentes de IPNV que son respectivamente:

10 (a) un polipéptido VP3 de IPNV o un fragmento del mismo que comprende una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia del Anexo B o el Anexo D

(b) un polipéptido VP2 de IPNV o un fragmento del mismo que comprende una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia del Anexo A o el Anexo C,

15 en la que en cada caso el polipéptido o fragmento es capaz de estimular la producción de anticuerpos que se unen a IPNV.

18. Vacuna según la reivindicación 17 caracterizada porque consiste esencialmente en los polipéptidos de IPNV VP3 que tiene la secuencia del Anexo B o el Anexo D y VP2 que tiene la secuencia del Anexo A o el Anexo C.

20 19. Vacuna según la reivindicación 17, caracterizada porque consiste esencialmente en los polipéptidos de IPNV VP3 que tiene la secuencia del Anexo B o el Anexo D y VP2 que tiene la secuencia del Anexo A o el Anexo C, en cada caso fusionado a una secuencial señal de secreción de levadura.

25 20. Vacuna según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en la que las secuencias de VP3 y VP2 se muestran en el Anexo B y el Anexo A.

21. Vacuna según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en la que las secuencias de VP3 y VP2 se muestran en el Anexo D y el Anexo C.

30 22. Vacuna según la reivindicación 18, en la que las secuencias de VP3 y VP2 se muestran en el Anexo E.

23. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, que comprende un diluyente o adyuvante farmacológicamente aceptable o una combinación de éstos.

35 24. Vacuna según la reivindicación 23, que se selecciona entre: una suspensión acuosa para su uso como vacuna por inmersión; una vacuna oral que comprende aceite de pescado y un portador de lecitina.

40 25. Composición de vacuna que comprende una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24 y otros antígenos bacterianos utilizados para controlar otras enfermedades.

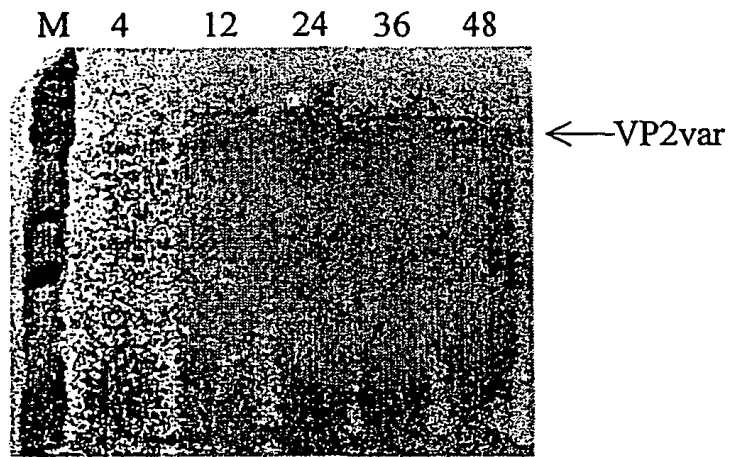
26. Composición de vacuna según la reivindicación 25, en la que los antígenos para otras enfermedades de peces derivan de *Aeromonas salmonicida* y/o son uno o más antígenos de *Vibrio* derivados de cualquiera entre *V. anguillarum*, *V. salmonicida* y *V. viscosus*.

45 27. Vacuna o composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26 para su uso en un método de tratamiento terapéutico, o profilaxis, de IPNV en un pez, cuyo método de tratamiento terapéutico o profilaxis de IPNV comprende administrar una dosis de la vacuna de IPNV a un pez.

50 28. Vacuna según la reivindicación 27 en la que el tratamiento o la profilaxis es contra una cepa del serotipo Sp de IPNV.

Figura 1

A



B

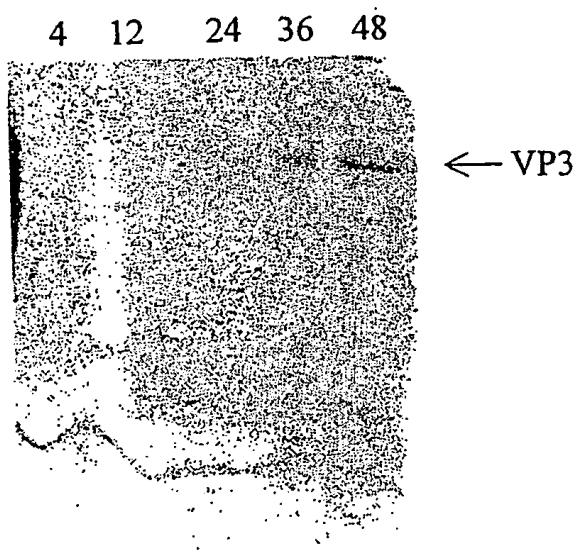


Figura 2

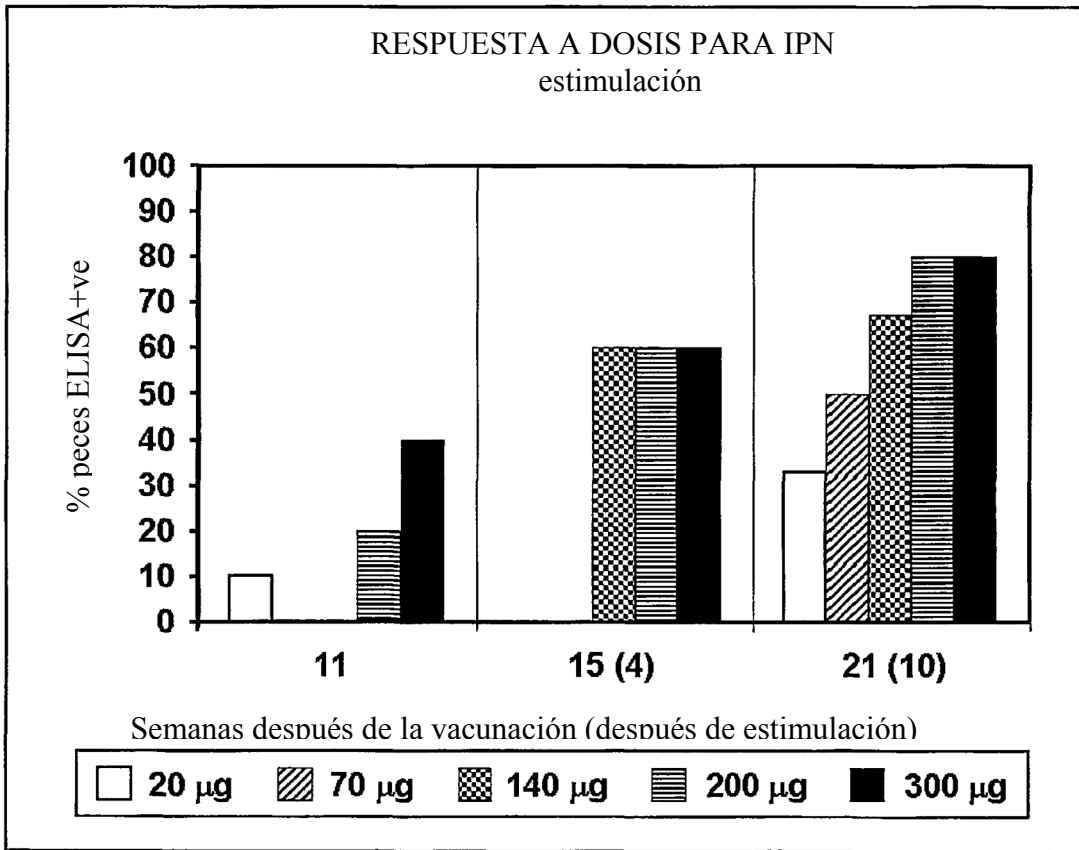


Figura 3

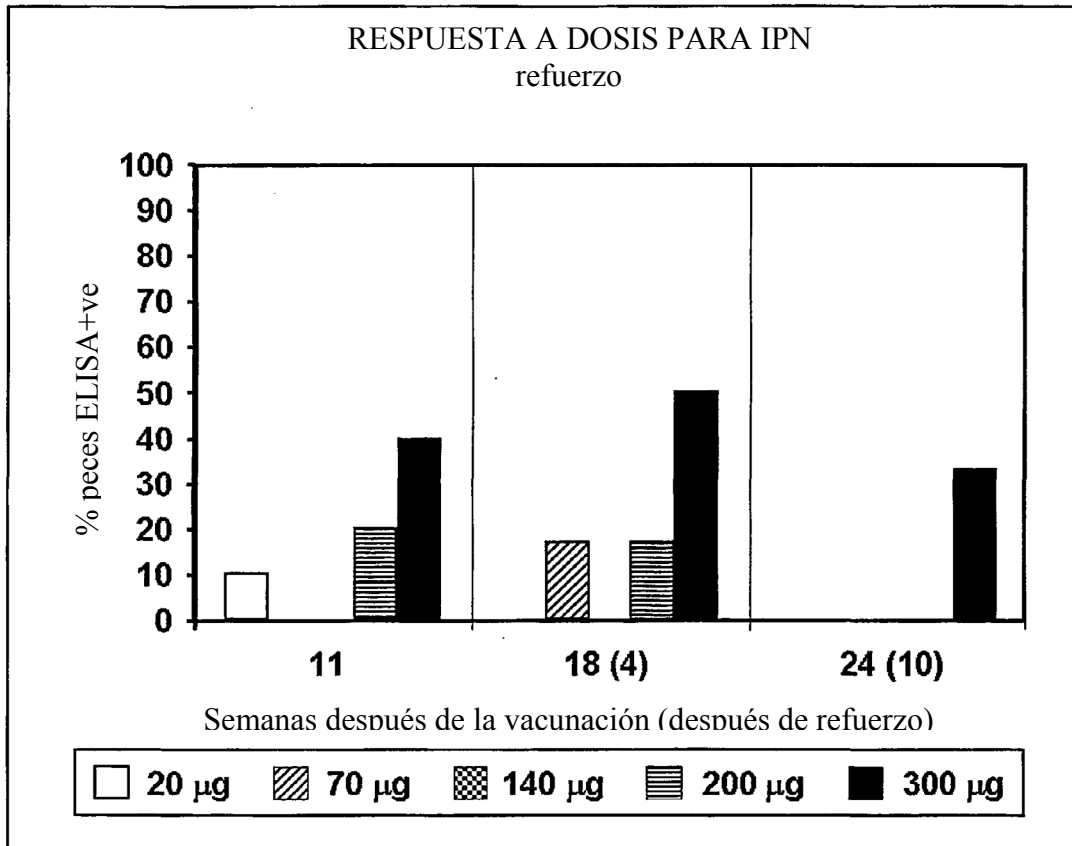


Figura 4

