

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 915**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/42** (2006.01)

**A61K 31/7036** (2006.01)

**A61K 31/52** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

**A61K 31/351** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10000710 .3**

96 Fecha de presentación: **09.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **2193792**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2010**

54 Título: **NEOMICINA PARA EL AUMENTO DE LA SOBREVIVENCIA DE ANIMALES ACUÁTICOS  
EXPUESTOS A IPNV.**

30 Prioridad:  
**07.12.2001 US 336684 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.01.2012**

73 Titular/es:  
**SANDINO, ANA MARIA  
AV. 11 DE SEPTIEMBRE NO. 1881 OF. 1202  
SANTIAGO DE CHILE, CL y  
MLYNARZ, GERALDINE**

72 Inventor/es:  
**Sandino, Ana Maria y  
Mlynarz, Geraldine**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 372 915 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).

## DESCRIPCION

Neomicina para el aumento de la sobrevivencia de animales acuáticos expuestos a IPNV

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención está dirigida al uso de neomicina para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la infección de animales acuáticos, producida por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

## ANTECEDENTES

- 10 Se estima que las enfermedades de los peces cuestan veinte a treinta centavos por cada dólar gastado en la crianza de peces en los Estados Unidos. Aunque los patógenos de peces incluyen hongos, protozoos y agentes bacterianos, las enfermedades virales son la mayor preocupación de los criadores de peces, gerentes del criadero y científicos, porque son principalmente ingobernables. Los peces son susceptibles a una variedad de infecciones y enfermedades virales. Tales virus incluyen IPNV, virus de la necrosis celular del pillar (PCNV), virus de necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus de la necrosis hipodermal y hematopoyética infecciosa (IHHNV), virus de la mancha blanca del camarón (WSV), virus del síndrome Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV), virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), así como también otros en las familias siguientes: *Birnaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Iridoviridae*, *Reoviridae*, *Ortomixovirus*, *Paramixovirus*, *Arterivirus* y *Picornavirus*. Por ejemplo, los birnavirus acuáticos infectan sobre 63 organismos marinos y de agua fresca, tales como peces, camarones y otros crustáceos, ostras y otros moluscos. El birnavirus acuático, IPNV, es el agente causante de la enfermedad pancreática en el pez. Otras especies de *Birnaviridae* son conocidas, tales como IBDV, virus de la tellina y virus de la ostra.

IPNV e IBDV son miembros de la familia *Birnaviridae*. Ellos son virus icosaédricos sin envoltura de aproximadamente 60 nm de diámetro con un genoma que consiste en dos segmentos de RNA de doble-hebra.

- 25 El virus infeccioso de la necrosis pancreática (IPNV) es una enfermedad viral contagiosa en una variedad de animales acuáticos. En el pez, IPNV causa morbilidad y mortalidad en la trucha arco iris, salmón Atlántico, salmón de Pacífico, trucha de arroyo y otros salmónidos, sobre todo en fases de pecerillos y fases juveniles. IPNV es capaz de infectar a varios hospederos diferentes y tiene presencia mundial. Pilcher et al., Crit. Rev. Microbiol. 7:287 (1980). IPNV se ha aislado en una variedad de especies animales acuáticas a lo largo del mundo, incluyendo varias especies de truchas y especies de salmones, carpa, percha, pica, anguilas, carbón, moluscos y crustáceos. Los ejemplos de especies de peces y crustáceos/mariscos en que IPNV y virus similares a IPNV se ha aislado se encuentran en la Tabla 1. Por ejemplo, IPNV se ha encontrado en animales acuáticos, tales como salmón Atlántico, la trucha arco iris cultivada *Oncorhynchus mykiss*, lenguado salvaje *Rhombosolea tapirina*, bacalao *Pseudophycis* sp., pez perro *Squalus megalops* y brezo *Genypterus blacodes*. Crane et al., Dis. Aquat. Organ. 43:1 (2000). IPNV se ha aislado de especies salmónidos y especies no-salmónidos de peces sin síntomas patogénicos.

- 35 El virus de la enfermedad infecciosa bursal (IBDV) también es una enfermedad viral contagiosa en una variedad de aves. IBDV afecta la bursa de Fabricius, un órgano que produce linfocitos que ayudan a proteger a las aves contra enfermedades. IBDV ataca la bursa, matando las células linfoides y suprimiendo los sistemas inmunológicos de las aves. Los síntomas clínicos de IBDV incluyen diarrea, disminución de peso, palidez y cojera. Estos síntomas producen poblaciones aumentadas de cadáveres de aves, sobre el promedio de mortalidad, pobre conversión del alimento y pobre ganancia de peso. IBDV causa problemas serios para los productores de aves de corral comerciales a lo largo del mundo, costando millones de dólares anualmente en pérdidas de la producción y costos de tratamiento, y sumando sobre cien millones de dólares en pérdidas cada año a nivel mundial. IBDV es capaz de producir virus mutantes rápidamente, llamados cepas variantes que son resistentes a las vacunas.

TABLA 1

Especies de Peces y Crustáceos / Mariscos desde los cuales IPNV y Virus similares a IPNV han sido aislados.	
Nombre Científico	Nombre Común (en Inglés o Español)
<b><u>Salmón</u></b>	
Hucho hucho	Danube Salmón
Oncorhynchus gorbuscha	Pink Salmón
Oncorhynchus Keta	Chum Salmón
Oncorhynchus kisutch	Coho Salmón
Oncorhynchus masou	Cherry Salmon
Oncorhynchus mykiss	Rainbow Trout
Oncorhynchus Nerea	Sockete Salmon
Oncorhynchus rhodurus	Amago Salmon
Oncorhynchus tshawytscha	Chinook Salmon
Salmo clarki	Cutthroat trout
Salmo gairdneri	Rainbow trout
Salmo salar	Atlantic Salmon
Salvelinus alpinus	Aretic charr
Salvelinus namaycush	Lake trout
Salvelinus pluvius	Japanese chare, White spotted
Thymalus thymalus	Grayling
<b><u>Peces adicionales</u></b>	
Abramis braxa	Bream
Alosa aestivalis	Blueback herring
Alosa sapidissima	American shad
Anguilla Anguilla	European eel

(continuación)

<b>Especies de Peces y Crustáceos / Mariscos desde los cuales IPNV y Virus similares a IPNV han sido aislados.</b>	
<b>Nombre Científico</b>	<b>Nombre Común (en Inglés o Español)</b>
<b><u>Peces adicionales</u></b>	
Anguilla japonica	Japanese eel
Barbus barbas	Barbel
Blicca djoerkna	Silver bream
Brachydanio rerio	Zebra danio
Brevoortia tyrannus	Atlantic menhaden
Carassius auratus	Goldfish
Carassius carassius	Crucion carp
Catostomus commersoni	White sucker
Chondrostoma nasus	Sheap
Cobitis sp.	Spined loach
Cyprinus Carpio	Carp
Dicentrarchus labrax	Bass (sea bass)
Esox lucius	Northern pike
Esox Níger	Chain pickerel
Lampetra fluviatilis	River Lamprey
Leistomus xanthurus	Spot
Leuciscus rutilus	Roach
Menidia Mendía	Atlantic Silverside
Morone saxatilis	Striped Bass
Oxyeleotris matmoratus	Marble Globy
Paralichthys lethostigma	Southern flounder
Perca fluviatilis	Red fin Perch
Peudorasbora parva	Gobio

(continuación)

<b>Especies de Peces y Crustáceos / Mariscos desde los cuales IPNV y Virus similares a IPNV han sido aislados.</b>	
<b>Nombre Científico</b>	<b>Nombre Común (en Inglés o Español)</b>
<b><u>Peces adicionales</u></b>	
Phoxinus phoxinus	Minnow
Scardinius arythophthalmus	Leucisco
Scophthalmus Maximus	Turbot
Seriola quinquerodiata	Japanese Amber Jack
Solea solea	Common sole
Stizostedion vitreum vitreum	Pungent Throat
Symphysodon discos	
Tilapia mossambica	Aucun
Trinectes maculatus	
<b><u>Mariscos / Crustaceos</u></b>	
Carcinus masnas	Shore Crab
Crassostrea gigas	Japanese Oyster
Crassostrea virginica	Eastern Oyster
Littorina littorea	Common periwinkle
Mercenaria mercenaria	Hard clam
Mytilus edulis	Common mussel
Ostrea edulis	Native oyster
Patella Vulgata	Common limpet
Penassus Japonicus	
Tellina tenuis	Thin tellis

En los sobrevivientes de un IPNV epizootico, el virus persiste y puede causar el retraso de crecimiento severo en el pez que exhibe la persistencia del virus. McKnight et al., Br. Vet. J. 132: 76 (1976). En salmones pequeños, IPNV produce necrosis considerable o inflamación del páncreas. La enfermedad aguda se ha informado principalmente en un número limitado de especies salmónidas, tales como la trucha y el salmón. Muchas de estas especies son de gran importancia económica. Debido a que la mortalidad puede ser tan alta como 90 por ciento, la aparición de un brote de IPNV en un criadero puede ser un desastre económico. Pilcher et al., Crit. Rev. Microbiol. 7:287 (1980).

La edad más susceptible para la infección de IPNV es el pez joven, especialmente en aquellos que tienen dos a cuatro meses de edad, en los cuales tales infecciones presentan una mortalidad alta. Wolf et al., US. Dept. Int. Bur. Sport Fish and Wildlife Fish Disease Leaflet 1:14 (1966); Frantsi et al., J. Wildlife Dis. 7:249 (1971). En la trucha, el IPNV ataca normalmente peces jóvenes de aproximadamente cinco a seis semanas después de su primer alimento. Se sabe que el IPNV afecta al pez en su primer año en el agua salada y se extiende rápidamente en el pez cultivado contenido en jaulas de mar. Los peces afectados son delgados, anoréxicos y letárgicos con una tendencia a congregarse en las esquinas de la jaula y no mantener una posición horizontal. Ferguson et al., J. Fish Dis. 9:95 (1986). Los peces afectados son más oscuros que lo usual, mueven los ojos ligeramente y a menudo tienen inflada la barriga. Al principio de un brote se ven grandes números de peces lentos y oscuros contra las salidas de agua, y se ven peces con "escalofríos" cerca de la superficie. Los peces estremeciéndose con escalofríos tienen un síntoma característico de la enfermedad, presentan una forma violenta de nadar en que los peces rotan girando sobre su eje longitudinal. Si se examina la anatomía interior del pez afectado, una mucosidad blanca característica se ve en el estómago. El páncreas parece ser el órgano objetivo primario para el virus. McKnight et al., Br. Vet. J. 132:76 (1976).

Después de un brote de IPNV, el pez sobreviviente generalmente se vuelve portador del virus. Los peces que llevan el virus son un problema serio para la industria de la acuicultura, porque el único método actualmente disponible para eliminar el virus en el pez del portador, es la destrucción completa de estos peces. Varios factores parecen influir en la severidad de la infección y el subsiguiente establecimiento del estado de portador. Estos factores incluyen edad, especie y temperatura del agua. Los portadores sobrevivientes tienen IPNV infeccioso para el resto de su vida, lo que es perceptible en su materia fecal y productos sexuales. Billi et al., J. Fish. Res. Bd. Can. 26:1459 (1969); Yamamoto, Can. J. Micro. 21:1343 (1975); y Reno et al., J. Fish. Res. Bd. Can. 33:1451 (1978).

La persistencia del virus en el pez portador parece ser el resultado de la producción del virus en forma continuada, por un número pequeño de células infectadas en ciertos órganos. Hedrick, Ph.D. Tesis, "Persistent Infections of Salmonid Cell Lines with Infectious Pancreatic Necrosis Virus: A Model for the Carrier State in Trout", Oregon State University, 1980. Para IPNV, hay por lo menos 9 tipos de cepas de Serogrupo A y otras 4 cepas representantes del Serotipo A1. IPNV Serotipo A1 es el birnavirus acuático predominante y el serotipo de IPNV en Estados Unidos. La familia *Birnaviridae* describe y clasifica un grupo de virus, birnavirus que llevan un genoma de RNA de doble-hebra bisegmentado como su característica prominente; los dos segmentos se llaman el segmento A y B. El RNA está encerrado en una cápside icosaédrica no-envolvente, de aproximadamente 60 nm de diámetro, que se coloca como una sola capa. Los dos representantes principales de esta familia de virus son el virus de la necrosis pancreática infecciosa de pez (IPNV) y el agente causal de la enfermedad infecciosa de la bursa de pollos (IBDV). El RNA tanto de IPNV como de IBDV está unido covalentemente a un polipéptido de alto peso molecular, el cual tiene aproximadamente 100 kDa. El birnavirus tiene al menos cuatro proteínas estructurales: llamadas VP1, VP2, VP3 y VP4. La secuencia de VP1, VP2, VP3 y VP4 permitieron la construcción del mapa genómico tanto de IPNV como de IBDV. Ver Dobos, P., The Molecular Biology of IPNV. Ann. Rev. Fish Disease, 5:25-54 (1995).

El genoma viral de IPNV está contenido dentro de una cápside icosaédrica no-envolvente, que tiene aproximadamente 60 nm de diámetro. El segmento más grande, segmento "A", tiene un peso molecular de  $2,5 \times 10^6$  Daltons (Da) y codifica al menos tres proteínas. Su orden en el genoma, del N (5') terminal, es  $\beta$ (VP2) (aproximadamente 54 kDa, proteína principal de la cápside);  $\gamma_2$  (NS) (una proteína no estructural de aproximadamente 27,5 kDa que tiene actividad proteolítica); y  $\gamma_1$  (VP3) (una proteína menor de cápside de aproximadamente 31 kDa). Chang et al., Can. J. Microbiol. 24:19 (1978); Huang et al., J. Virol. 60: 1002 (1986). Estas proteínas son codificadas en un solo RNAm dentro de la célula infectada. Mertens et al., Nature 297:243 (1982). El segmento A del genoma de IPNV contiene un marco de lectura abierto grande (ORF) codificando una poliproteína de 106 kDa que tiene la estructura: NH<sub>2</sub>-preVP2-VP4-proteasa-VP3-COOH. La poliproteína es cortada cotransduccionalmente por una proteasa codificada por el virus, para generar el preVP2 (pVP2) y VP3. El pVP2 es luego cortado durante la maduración viral para producir VP2. El segmento de genoma A contiene un ORF pequeño adicional que se superpone al amino terminal del ORF de la poliproteína y es un marco de lectura diferente. Este ORF pequeño codifica un polipéptido menor de 17 kDa rico en arginina que puede detectarse en células infectadas con IPNV. El producto del segmento del genoma B es un polipéptido interior menor VP1. VP1 es una RNA-polimerasa putativa dependiente de RNA virion-asociada. VP1 está presente en los viriones en dos formas: (1) como un polipéptido libre y (2) como una proteína unida a genoma (VPg).

Los mapas genómicos establecidos para IBDV son similares al mapa genómico del IPNV descrito antes, que indica que su organización genómica es en general característica de birnavirus. Así, los únicos rasgos de birnavirus son: (i) un segmento del genoma A es estructuralmente y funcionalmente bicistrónico; (ii) la producción de una poliproteína que es cortada por una proteasa virus-codificada; y (iii) la presencia de una proteína unida a genoma (VPg). Además, el segmento de genoma A y el segmento de genoma B contienen regiones no codificantes de tamaño considerable en ambos extremos. Estas secuencias no codificantes pueden ser importantes para el reconocimiento de la polimerasa, iniciación de traducción y posiblemente el embalaje del genoma. Además, el segmento A de IPNV contiene terminales repetidas invertidas de 14 nucleótidos que son similares a aquellos informados para el segmento A de IBDV. Ver, *Encyclop. Vir.*, Ed. R.G. Webster y A. Granosf, Academic Press (1995) 143-149.

5 Unos pocos compuestos antivirales utilizados para el tratamiento de virus humanos han sido probados por su habilidad de bloquear la infección de IPNV *in vitro*. Ellos son: virazole (Savan et al., J. Fish Dis. 3:437 (1980)); ribavirin, pirazofurin y EICAR (5-etinil-1-β-ribofuranosilimidazol-carboxamida) (Migus et al., J. Gen. Virol. 47:47 (1980); Jashés et al., Antiviral Res. 29:309 (1996)). Aunque el ribavirin mostró inhibir la replicación de IPNV *in vitro*, no tuvo eficacia *in vivo*. Migus et al., J. Gen Virol. 47:47 (1980). Cuando se dio EICAR a la trucha arco iris y pececillos de salmón Coho en el primer día después que los pececillos se infectaron experimentalmente con IPNV, ocurrieron menos muertes entre los pececillos infectados. Moya et al., Antiviral Res. 48: 125 (2000).

10 Se establecieron ensayos *in vivo* para demostrar la habilidad del compuesto candidato para inhibir la replicación viral *in vivo* y/o mejorar la morbilidad y mortalidad. Esto mostró que ribavirin inhibe eficazmente la replicación de IPNV *in vitro* pero no *in vivo*. Migus et al., supra (1980); Savan et al., J. Fish. Dis. 3: 437 (1980).

Para disminuir el predominio de la enfermedad y aumentar los rendimientos de peces cultivados, un número considerable de antibióticos y químicos son utilizados para tratar el agua durante el cultivo del pez. Se listan ejemplos de tales antibióticos y químicos en la Tabla 2

**Tabla 2**

<b>Químicos Administrados en Peces Cultivados (nombre en inglés o español)</b>		
Ácido acético	Gentamicina	Sulfaguanidina
Acriflavina	Griseofulvina	Sulfamerazina
Bacitracina	Hidroxi metil piridina	Tetraciclina
Cal	Iodosforosforus 1.7% actividad	Trimetoprim
Cianato sódico	Hipoclorito de sodio 30%	Verde de malaquita
Cloranfenicol	Isoniacida	Violeta genciana
Clorotetraciclina	Kanamicina	Vitamina C
Cloruro de sodio	Levamisol	
Dibromuro	Ácido Nalidixico	
Diclorinetildimetil fosfato		
Dicromato de potasio	Neomicina	
Bicromato de potasio		
Oxido de estaño di-n-butil	Organofosfatos	
Dimetridazol	Oxitetraciclina	
Dibromuroetilen dipirididileno	Ácido de oxolina	
Eritromicina	Permanganato de potasio	
Isomero de Hexaclorinbenceno	Praziquantel	
"Febantel" Fenotiaccina	Sal cuaternaria de amonio	

15

(continuación)

Químicos Administrados en Peces Cultivados (nombre en inglés o español)		
Flumeuina	Cloruro toluen sulfónico de sodio	

5 Además de la destrucción de stocks infectados y la desinfección de medios del criadero, no hay ningún tratamiento actual que comprenda un compuesto isoxazol y/o un compuesto aminoglicósido para combatir las infecciones virales en un lugar de acuicultura, que sea capaz de aumentar la supervivencia de animales acuáticos susceptibles a la infección viral. Hay también una necesidad por métodos y composiciones que comprendan compuestos isoxazol y/o compuestos aminoglicósido que pueden administrarse antes, durante y por periodos de tiempo después que la especie susceptible se expone a un virus.

10 También hay una necesidad de un tratamiento para combatir un virus en un lugar de acuicultura que utilice un compuesto isoxazol y/o un compuesto aminoglicósido que sea estable en solución. Además, no hay actualmente una composición de comida acuática que contenga un compuesto isoxazol que sea capaz de aumentar la supervivencia de animales acuáticos susceptibles a una infección viral antes, durante y por periodos de tiempo después que la especie susceptible se expone al virus. De acuerdo con esto, hay una necesidad por un método para aumentar la supervivencia de animales acuáticos expuestos o infectados con un virus donde el método incluya administración de un compuesto isoxazol y/o un compuesto aminoglicósido. Hay una necesidad por un método de administración de un compuesto isoxazol y/o un compuesto aminoglicósido a los animales, incluyendo los animales acuáticos, susceptibles a una infección viral, para aumentar su supervivencia cuando sea expuesto al virus o infectado con el virus.

20 Además de la destrucción de stocks infectados y la desinfección de medios del criadero, no hay ningún tratamiento actual para combatir IPNV en acuicultura que sea capaz de aumentar la supervivencia de animales acuáticos susceptibles a la infección con IPNV. Tampoco hay ningún tratamiento actual para combatir IBDV de manera que sea capaz de aumentar la supervivencia de animales susceptibles a la infección con IBDV. Hay también una necesidad por métodos y composiciones que pueden administrarse antes, durante y por periodos de tiempo después que la especie susceptible se expone a IPNV o IBDV. No hay un tratamiento para combatir IPNV en un lugar de acuicultura que emplee un compuesto que sea estable en solución, particularmente un compuesto isoxazol. No hay actualmente una composición de comida acuática que contenga un compuesto que sea capaz de aumentar la supervivencia de animales acuáticos susceptibles a una infección con IBDV antes, durante y por periodos de tiempo después que la especie susceptible se expone a IBDV. De acuerdo con esto, hay una gran necesidad por un método para aumentar la supervivencia de animales, incluyendo animales acuáticos expuestos al IPNV e IBDV o infectados con estos virus, además de la necesidad por tales métodos. Por esto hay una necesidad por un método de administración de un compuesto para animales acuáticos susceptibles a una infección por IPNV que aumentaría su supervivencia cuando sea expuesto al IPNV o infectado con IPNV.

35 También hay una necesidad por un método de administración de un compuesto a los animales susceptibles a infección por IBDV que aumentaría su supervivencia cuando es expuesto o infectado con IBDV.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

40 Es por consiguiente un objetivo de la presente invención proporcionar un método para aumentar la supervivencia de un animal susceptible a la infección por IPNV, administrando una cantidad efectiva de neomicina al animal definido en la reivindicación 1.

Es un objetivo adicional de esta invención proporcionar un método de tratamiento para un animal acuático susceptible a la infección por IPNV, que consiste en alimentar a los peces u otros animales con una cantidad efectiva de neomicina como está definido en la reivindicación 1.

45 En el cumplimiento de estos objetivos, se ha proporcionado el uso de neomicina para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la infección de un animal acuático por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

En estos objetivos de la invención, la administración puede ser realizada por métodos conocidos en el estado de la técnica, incluyendo cualquiera de los siguientes métodos: introducción del compuesto en el medio acuático; inclusión

del compuesto en los alimentos; e inyectar en el animal el compuesto disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 El compuesto utilizado es neomicina. Es preferible que el compuesto sea estable en solución y/o humedad. En otro objetivo de la presente invención, el compuesto es utilizado en una cantidad efectiva que aumente la sobrevivencia del animal de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%; preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 70%. Las concentraciones preferidas también pueden aumentar la carga viral/título viral de IPNV en un tejido de aproximadamente 10 a 1000-pliegues o la carga puede ser disminuida entre aproximadamente  $10^1$  pfu/mL y  $10^3$  pfu/mL. Las concentraciones preferidas de una cantidad efectiva del compuesto pueden ser de aproximadamente 7,0 µg/mL y aproximadamente 30 µg/mL de agua de su ambiente, preferiblemente de aproximadamente 9,0 µg/mL y aproximadamente 14 µg/mL de agua de su ambiente.

15 Otro objetivo de la presente invención está dirigido a los animales acuáticos preferidos, que son peces, copépodos, cefalópodos, crustáceos, camarones, anguilas, moluscos y ostras. Otro aspecto de la invención está dirigido al pez en el que el método y las composiciones son aplicados, que se nombran en la tabla 1. También, el pez puede ser seleccionado de las siguientes familias: *Anguillidae*, *Bothidae*, *Caragidae*, *Cotostornidae*, *Chichlidae*, *Clupeidae*, *Cobitidae*, *Coregonidae*, *Cyprinidae*, *Esocidae*, *Moronidae*, *Paraichthyidae*, *Percidae*, *Poecilidae*, *Salmonidae*, *Salvelinus*, *Sciaenidae*, *Thymallidae* y las especies *Seriola quinqueradiata* (yellowtail), *Scophthalmus maximus* (rodabalo), *Limanda limanda* (dab), *Hippoglossus hippoglossus* (halibut), *Gadus morhua* (Bacalao Atlántico), *Misgrunus anguillissaudatus* (loach), y *Esox lucious* (pike); más preferibles son los peces de las familias *Salmonidae* y *Salvelinus*, incluyendo trucha arcoiris, trucha de arroyo, salmón, *Oncorhynchus tshawytscha* (Chinook, King, o Spring), *Oncorhynchus nerka* (Blueback, Red, Sockeye), *Oncorhynchus kisutch* (Coho, Silver) *Oncorhynchus gorbuscha* (Pink) *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoiris), *Oncorhynchus keta* (Chum o Keta) and *Oncorhynchus masou* (Masou o Cherry).

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar alimentos y métodos de utilización de tales alimentos que contienen neomicina. Una composición preferida es alimento en pellet, que puede ser pellet húmedo.

25 Otro objetivo de la invención es proporcionar una cantidad efectiva del compuesto para disminuir o detener el progreso de una enfermedad, tal como enfermedad pancreática.

30 En otro objetivo de la invención, los métodos y composiciones de alimentos están dirigidos a peces que pesan entre aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 gramos, peces que pesan entre aproximadamente 10 gramos y aproximadamente 200 gramos, peces que pesan entre aproximadamente 200 gramos y aproximadamente 5000 gramos o más.

La administración o alimentación puede ocurrir (i) antes de la exposición del animal al virus (ii) durante la exposición del animal al virus; y/o (iii) después de la exposición del animal al virus.

35 En otro asunto de la invención, el alimento para los animales acuáticos, tales como alimento para peces, está en forma de pellet. Preferiblemente, el alimento contiene neomicina en concentración de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg/gramo de alimento, preferiblemente de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 25 µg/gramo de alimento.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir la siguiente descripción detallada.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 La figura 1A es una fotografía de un gel de policramida al 7% que muestra el efecto de la neomicina sobre la síntesis de RNA genómico de IPNV. Monocapas de células de embriones de salmón Chinook (CHSE-214) fueron infectadas con IPNV en ausencia de neomicina (líneas 3, 5, 7 y 9) o en presencia de 4 mg/mL de neomicina (líneas 2, 4, 6 y 8). La neomicina fue agregada a las células 1, 3, 5 y 7 horas post infección (h.p.i.), (líneas 2, 4, 6, y 8) respectivamente y las células fueron incubadas a 15°C. A las 24 horas post infección, las células fueron sacadas de la incubación, se extrajo el RNA de ellas y analizadas con electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) teñidas con nitrato de plata. La línea 1 muestra un RNA genómico de IPNV control. Los datos muestran que la neomicina inhibió la síntesis de RNA de IPNV.

50 La figura 1B es una autoradiografía que muestra el efecto de la neomicina sobre la síntesis de polipéptido de IPNV. Monocapas de células CHSE-214 fueron infectadas con IPNV en ausencia (líneas 3, 5, 7 y 9) o en presencia de 4 mg/mL de neomicina (líneas 2, 4, 6 y 8). La neomicina fue agregada en 7, 5, 3 y 1 horas post infección (h.p.i.), (líneas 2, 4, 6 y 8) respectivamente, y las células fueron incubadas a 15°C. A las 4 horas post infección, 50 µCi/mL de (<sup>35</sup>S)-metionina fueron aplicados a las células. A las 24 h.p.i., se agregaron 100 µL de una solución de lisis de proteína a las células monocapas. Los polipéptidos de la ruptura de células fueron analizados con 15% SDS-PAGE

y con una autoradiografía. La línea 1 es un control de células CHSE-214 no infectadas. La neomicina no inhibe la síntesis de polipéptido de IPNV.

5 La figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de varias concentraciones de neomicina en el tratamiento de alevines de salmón Atlántico sobreviviente infectado con IPNV. Los alevines de salmón pesaron aproximadamente 0,45 a aproximadamente 1,0 gramo. En el día 0 los peces fueron infectados con  $10^5$  pfu/mL de IPNV. El día 1 post infección, los peces fueron tratados diariamente por inmersión durante 1 hora en un baño de 10, 40 u 80 ppm de neomicina. Los alevines de peces no infectados control fueron tratados diariamente por una hora con 0 u 80 ppm de neomicina. Este tratamiento diario con neomicina continuó por 10 días post infección. Los peces fueron  
10 monitoreados durante 26 días post infección para documentar las muertes. Los datos son presentados gráficamente en términos de porcentaje de sobrevivencia. El tratamiento de alevines de salmón infectados con IPNV, con concentraciones tan bajas como 10 ppm de neomicina puede mantener la sobrevivencia en niveles equivalentes a los controles no infectados.

Los textos de la figura 2 indican:

(▲-▲) CONTROL (-) = control negativo, peces no infectados;

15 (■ - ■) IPNV (-) /N3 = control negativo, peces no infectados tratados con 80 ppm de neomicina en el día 1 post infección;

(Δ - Δ) CONTROL (+) = control positivo, peces no tratados infectados;

(X-X) IPNV(+)/N1 = peces infectados tratados con 10 ppm de neomicina en el día 1 post infección;

(x-x) IPNV(+)/(N2) = peces infectados tratados con 40 ppm de neomicina en el día 1 post infección; y

20 (●-●) IPNV(+)/(N3) = peces infectados tratados con 80 ppm de neomicina en el día 1 post infección.

La figura 3 es un gráfico que muestra el efecto de varias concentraciones de neomicina para el tratamiento de alevines de salmón Atlántico sobrevivientes a la infección de IPNV. Las crías de salmón pesaron aproximadamente 0,45 a aproximadamente 1,0 gramo. En el día 0, los peces fueron infectados con  $10^5$  pfu/mL de IPNV. Al comienzo de los 13 días post infección, después del comienzo del brote de mortalidad, los peces fueron tratados diariamente por inmersión durante una hora en un baño que contenía 10, 40 y 80 ppm de neomicina y continuó hasta el día 23 post infección. Los peces fueron monitoreados durante los 26 días post infección para documentar las muertes. Los  
25 datos son presentados gráficamente en términos de porcentajes de sobrevivencia. El tratamiento con neomicina es capaz de detener el brote de mortalidad inmediatamente, evitando el aumento de la mortalidad.

Los textos de la figura 3 indican:

30 (▲-▲) CONTROL (-) = control negativo, peces no infectados;

(■ - ■) IPNV (-) /N3 = control negativo, los peces no infectados tratados con 80 ppm de neomicina en el día 1 post infección;

(Δ - Δ) CONTROL (+) = control positivo, peces no tratados infectados;

(X-X) IPNV(+)/N1 = peces infectados tratados con 10 ppm de neomicina en el día 13 post infección;

35 (x-x) IPNV(+)/(N2) = peces infectados tratados con 40 ppm de neomicina en el día 13 post infección; y

(●-●) IPNV(+)/(N3) = peces infectados tratados con 80 ppm de neomicina en el día 13 post infección.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención responde a una necesidad de larga data en la acuicultura y la producción animal, para proporcionar el uso de neomicina para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la infección de animales acuáticos, producida por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y aumentar de  
40 esta manera la sobrevivencia de los animales.

Los términos “administrar”, “administrado” o “administración” indican cualquiera de los medios en que el compuesto profiláctico/terapéutico es entregado al animal y dejarlo disponible para bloquear la replicación viral o su ingreso.

Tales medios de liberación incluyen: introducción en el medio acuático; inclusión en los alimentos; e inyección en el animal acuático, tal como la inyección intraperitoneal.

Los métodos de administración también incluyen: baños del animal acuático en tanques que contienen el compuesto; y la inclusión del compuesto en los alimentos.

- 5 El método de la invención y la administración pueden ser realizadas antes, durante o después de la exposición y/o infección con IPNV. Además, el método puede ser aplicado antes, durante y/o después de la infección con IPNV, así como también antes, durante y/o después que la enfermedad o muerte por IPNV aparecen. Por ejemplo, la administración puede ser iniciada después de la infección cuando se observa un 20% de mortalidad.

10 La administración incluye aquellos protocolos que aumentan la sobrevivencia de un animal acuático expuesto a IPNV. La administración puede ocurrir antes, durante y/o después de la exposición al virus. Tales protocolos incluyen los siguientes: (a) inclusión del compuesto antiviral en al menos un día de alimentación; (b) inclusión del compuesto antiviral en el medio acuático por al menos 0,5 a 2,0 horas/día por un período diario o cíclico que incluye bi-semanalmente, tri- semanalmente y una semana sí/una semana no; (c) administración previa a: la presencia de títulos de virus, exposición a IPNV, enfermedad por IPNV, y/o muerte asociada a IPNV; (d) administración sobre la  
15 detección de: la presencia de virus, exposición a IPNV, enfermedad por IPNV, y/o muerte asociada a IPNV; (e) administración siguiendo: la presencia de títulos de virus, exposición a IPNV, enfermedad por IPNV y/o muerte asociada a IPNV; (f) los protocolos descritos en este documento; (g) administración diaria por períodos de aproximadamente 5 días a aproximadamente 30 días; y/o (h) administración por más de una vez por día.

20 La estabilidad del compuesto que se utiliza en los métodos y composiciones de la presente invención, incluyendo composiciones de alimentos, está determinada y se explica en los métodos de administración de la composición que contiene el compuesto y en el modo de preparación de la composición que contiene el compuesto. En los centros de cultivo de peces y criaderos de animales, es importante tener un método de tratamiento que puede ser usado antes, durante, y/o después de la infección con IPNV, así como antes, durante y/o después de la enfermedad por IPNV o aparición de muertes. La estabilidad en solución, composiciones de alimentos secos y/o composiciones  
25 de alimentos húmedos o mojados es una característica del compuesto utilizado en el método y composición de la invención.

“Cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad efectiva” es la cantidad del compuesto suficiente para aumentar la sobrevivencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 70%. Preferiblemente, la cantidad efectiva es la que reduce la carga viral en el animal o reduce el promedio de la carga viral en la población que está en tratamiento.  
30 Preferiblemente, la cantidad efectiva no es tóxica para más de aproximadamente el 5% a aproximadamente 10% de los animales acuáticos tratados u otros animales. Los expertos en la materia pueden determinar las concentraciones del compuesto que son terapéuticamente efectivas. Tales concentraciones pueden variar con el método de administración y el compuesto. Por ejemplo, al administrar el compuesto a los peces en un baño de agua, el rango de concentraciones del compuesto en el agua es de aproximadamente 1 - 50 µg/mL, preferiblemente aproximadamente 2 - 20 µg/mL, más preferiblemente aproximadamente 6 - 14 µg/mL. La cantidad efectiva terapéutica liberada como un componente del alimento de peces es de aproximadamente 0,1 - 10,0 µg del compuesto/gramo de alimento. La cantidad efectiva terapéutica liberada por inyección directa es calculada después de la inyección, de aproximadamente 2 - 20 µg del compuesto por gramo de masa del pez y la dosis identificada en la que la sobrevivencia a la exposición a IPNV aumenta en al menos 10% respecto a los controles. Para la orientación sobre las concentraciones iniciales de la prueba, son determinados la EC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub>, y también se determina la masa del animal acuático que se tratará. La cantidad terapéutica efectiva de neomicina para la actividad antiviral por inmersión de los peces en baños de agua, por ejemplo, es de aproximadamente 5 a aproximadamente 110 ppm, preferiblemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 ppm. La cantidad efectiva terapéutica de neomicina para aumentar la sobrevivencia de animales acuáticos infectados es de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg para administración oral, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mg/kg. La cantidad efectiva terapéutica de neomicina inyectada para aumentar la sobrevivencia de animales acuáticos infectados con el virus es de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg. Un período de tratamiento preferido por inmersión es de aproximadamente 3 días; un período de tratamiento preferido por dosificación oral es de aproximadamente 5 días; un preferido protocolo de tratamiento por inyección es una administración. Por supuesto, la aplicación de los métodos puede ser combinada; por ejemplo, el tratamiento por inmersión puede ser combinado con un tratamiento oral de un compuesto isoxazol y/o compuestos aminoglicósidos.  
40  
45  
50

Como se usa aquí, el término “carga viral” significa la concentración del virus presente en un organismo y se expresa en términos de unidades en forma de placa. Las unidades en forma de placa pueden ser determinadas de varias maneras. Una manera es determinar la concentración del virus, de la siguiente forma: se obtiene una muestra de tejido y se ensaya sobre monocapas de células de embriones de salmón Chinook (CHSE-214) que crecen a 18°C en un Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM), suplementado con 5% de suero fetal de bovino (FBS) y antibióticos para una confluencia de aproximadamente 90%. Después de una hora, las células son superpuestas con 5% de agarosa  
55

en MEM suplementado con 10% de FBS e incubadas por 3 días a 15°C. En varias oportunidades, las células son fijadas con formaldehído y teñidas con solución de cristal violeta al 5% para detectar lisis celular. El número de placas formadas es contado y dividido por la cantidad de muestra proporcionada para llegar al número de unidades con forma de placa (pfu) por mL. La carga viral también puede ser aproximada por correlación con la aparición de ciertos síntomas en los animales acuáticos. Por ejemplo, el rango de títulos para un pez que tiene tejido dañado y lesiones puede estar de aproximadamente  $10^5$  a  $10^9$  pfu/mL.

La presencia de título viral y carga viral de IPNV pueden ser determinados. El virus es identificado y/o cuantificado en muestras de tejido tomadas del animal acuático o por observación de varios aspectos clínicos y comportamientos asociados con el virus específico. Los métodos para medir el título viral son conocidos en el estado de la técnica y discutidos en este documento.

IPNV es clasificado y/o identificado en base a ensayos de seroneutralización, ensayos de cultivos celulares, ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR), análisis enzimático restringido y/o análisis de la secuencia. El ensayo RT-PCR es el método más rápido, específico y sensible para detectar e identificar el birnavirus acuático. Existen al menos 9 tipos de cepas de Serogrupo A y otras 4 cepas representativas de Serotipo A1 de IPNV, donde predomina el birnavirus acuático y el serotipo de IPNV en los Estados Unidos. Se usan secuencias de cebador que son muy conservadas entre el birnavirus acuático en los ensayos de PCR para identificar todos los serotipos reconocidos del serogrupo A del birnavirus acuático. Los cebadores son típicamente específicos para las regiones de cDNA codificadas por el segmento A del genoma o la región que codifica VP2 completo del birnavirus acuático.

El título viral de IPNV o la carga viral se determina por la identificación y cuantificación de la presencia de IPNV en muestras de tejido tomadas de animales acuáticos o a través de la observación de varios aspectos clínicos y comportamientos. Los métodos para la detección de IPNV, identificación y cuantificación (medición de título viral de IPNV) son conocidos en el estado de la técnica e incluyen el método de la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR), realizado en muestras de tejido de riñón y bazo de los peces analizados, de acuerdo con los métodos conocidos en el estado de la técnica. Ver por ejemplo, Lopez – Lastra et al., J. Fish Dis. 17:269 (1994), el contenido de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

Riñón, hígado, bazo y/o muestras de fluido ovárico son obtenidas de peces asintomáticos, tales como peces sangrando en época de desove. Muestras de peces afectados clínicamente, tales como alevín completo, vísceras enteras, riñón, hígado y/o bazo son probadas para determinar la presencia y cantidad de IPNV.

Los términos “tratamiento” y “tratar” como se usan en este documento, significan “administrar” como se definió en este documento y también incluye eliminación o reducción de los síntomas de la enfermedad o desorden, prevención de los síntomas o desorden, el aumento de la severidad y prevención del desorden en la forma que está ocurriendo.

Un compuesto es “estable en solución” cuando (a) no se descompone fácilmente o no se modifica químicamente en la solución de manera que se haga no funcional y/o (b) mantiene la actividad prevista cuando está mojado o en solución por un período de tiempo superior a 1 hora, de preferencia por 24 horas, más preferiblemente por períodos de semanas o más.

El compuesto utilizado, de acuerdo con la presente invención, incluye neomicina, como está definida en la reivindicación 1.

Como es usado en este documento, el término “animal acuático susceptible a la infección por un virus” pretenden significar que IPNV es capaz de replicarse y/o residir en el animal acuático, de una manera que puede ser detectado en un tejido del animal acuático. Tal infección puede ser asintomática y puede ser transmitida a otros animales acuáticos en forma horizontal y/o vertical.

El término “birnavirus acuático” pretende abarcar cualquier Birnavirus que infecte un organismo acuático. El birnavirus acuático preferido es el IPNV, que incluye al menos 9 serotipos conocidos.

El término “animal acuático” incluye, no sólo limitado a los peces, copépodos, cefalópodos, crustáceos incluyendo camarones, anguilas, moluscos y ostras. Los animales acuáticos preferidos son los peces, que incluyen entre otras a las siguientes familias: *Anguillidae*, *Bothidae*, *Caragidae*, *Cotostornidae*, *Chichlidae*, *Clupeidae*, *Cobitidae*, *Coregonidae*, *Cyprinidae*, *Esocidae*, *Moronidae*, *Paraichthyidae*, *Percidae*, *Poecilidae*, *Salmonidae*, *Salvelinus*, *Sciaenidae*, *Thymallidae* y las especies *Seriola quinqueradiata* (yellowtail), *Scophthalmus maximus* (rodabalo), *Limanda limanda* (dab), *Hippoglossus hippoglossus* (halibut), *Gadus morhua* (Bacalao Atlántico), *Misgrunus anguillisaudatus* (loach), y *Esox lucius* (pike). Los peces preferidos son aquellos listados en la Tabla 1. Los mariscos y crustáceos más preferidos son los listados en la tabla 1. El término “salmonoide” es usado en este documento para referirse a peces de las familias *Salmonidae* y *Salvelinus*. Además de todas las truchas, las familias incluyen de manera no limitada a ellas, a las siguientes especies de salmón: *Oncorhynchus kisutch* (Chinook, King o

Spring), *Oncorhynchus nerka* (Blueback, Red, Sockeye), *Oncorhynchus kisutch* (Coho, Silver), *Oncorhynchus gorbusha* (Pink), *Oncorhynchus mykiss* (trucha Arcoiris), *Oncorhynchus keta* (Chum o Keta), *Oncorhynchus masou* (Masou o Cherry).

5 Para la administración, la composición utilizada en el método de esta invención puede ser preparada procesando la neomicina para su dosificación en formas de polvo, gránulos microfinos, gránulos, gránulos finos, comprimidos, líquidos, pellet o jarabe con o sin un vehículo sólido, semi sólido o líquido, o también suplementando la comida de los peces con el compuesto o las formas de dosificación. El vehículo puede incluir carne picada de pescado crudo (por ejemplo, carne picada de caballa, sardina, lanza de arena, saurio, abadejo de Alaska, calamar, etc.), alimentos formulados (basados en harina de pescado, torta de soja, levadura, trigo, vitaminas, etc.) y otros vehículos convencionales, tales como lactosa, sacarosa, glucosa, almidón, talco, arcilla ácida y tantos otros. Además, emulsionantes, dispersantes, agentes gelantes, adhesivos, etc. pueden ser adicionados en proporciones adecuadas.

15 Tales composiciones contienen el compuesto que puede ser administrado para prevenir y/o tratar las infecciones por el virus en animales acuáticos susceptibles a adquirir la infección. También, tales composiciones contienen el compuesto que puede ser administrado para la prevención y/o el tratamiento de infección por IPNV en animales acuáticos susceptibles de infectarse con el virus. Para la profilaxis o el tratamiento de IPNV en salmón o trucha, por ejemplo, una modalidad de tratamiento preferido consiste en aprovechar la estabilidad del compuesto en la carne picada de pescado crudo, agregando un polvo o gránulo fino pre mezclado con el compuesto a la carne picada de pescado crudo, o una mezcla de esa carne picada y alimento formulado para administrar esta mezcla como pellets o pellets húmedos.

20 La dosis y duración de la administración de esta composición profiláctica – terapéutica para el tratamiento de animales acuáticos susceptibles a la infección por IPNV, dependen del compuesto específico, especies, edad, temperatura del agua, severidad de la enfermedad, etc.

25 En uno de los aspectos preferidos, la composición profiláctica – terapéutica de esta invención, contiene neomicina que: (1) aumenta la sobrevivencia de los animales acuáticos en presencia de IPNV; y (2) es estable en alimento de pez, tales como carne picada de pescado crudo. La composición administrada al pez en carne picada de pescado crudo, asegura una alta concentración de neomicina en la sangre del pez por un período de tiempo prolongado.

Aún cuando los inhibidores de la replicación de IPNV *in vitro* pueden no tener eficacia *in vivo*, los ensayos *in vitro* pueden ser usados para identificar compuestos que muestren una actividad antiviral y/o menor citotoxicidad, previo a la determinación de la eficacia y seguridad *in vivo*.

30 Los métodos de identificación de compuestos que bloquean la replicación viral *in vitro*, son descritos en el estado de la técnica. Jashes et al., Antiviral Res. 29:309 (1996). Para determinar si un compuesto es capaz de bloquear la replicación de IPNV *in vitro*, monocapas de células de embrión de salmón Chinook (CHSE-214), son cultivadas a 18°C en un Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM), suplementado con 5% de suero fetal de bovino (FBS) y antibióticos para una confluencia de aproximadamente 90%. Las monocapas se infectaron con 50 – 100 unidades formadoras de placas de una cepa de IPNV, tal como la cepa VR-299a. Después de la absorción durante una hora con agitación cada 15 minutos, una muestra del virus se retira. Las células se recubren con 0,5 % agarosa en MEM suplementado con 10% FBS y se deja incubar durante 3 días a 15°C. El compuesto probado se agrega a varias concentraciones diferentes en la cubierta de agarosa. En varios momentos puntuales durante y después de la incubación, las células son fijadas con formaldehído y teñidas con una solución de 0,5 % de cristal violeta para detectar las células que han sido lisadas. Comparando el número de placas formadas en las varias concentraciones de los compuestos ensayados, se determinan los 50% (EC<sub>50</sub>) y 100 % (EC<sub>100</sub>). Se repiten los ensayos por lo menos tres veces para determinar la variabilidad y obtener los resultados exactos.

45 Los métodos generales que miden el efecto citotóxico *in vitro* de un compuesto son conocidos, tales como los que se describen en Jashes et al., supra (1996). En uno de tales métodos, diferentes concentraciones del compuesto son agregados a monocapas de células CHSE-214. Las monocapas de células son incubadas con el compuesto a 15°C durante 3 días. La viabilidad de las células es medida por exclusión de células con azul de tripano. Se determina la concentración citotóxica requerida para reducir la viabilidad al 50% (CC<sub>50</sub>).

50 Los métodos para medir compuestos que bloquean la síntesis de ADN celular *in vitro* son conocidos en el estado de la técnica, tales como los descritos en Jashes et al., supra (1996). En uno de tales métodos, células CHSE-214 fueron cultivadas a aproximadamente 50% de confluencia para asegurar que ocurra el crecimiento activo. El compuesto en diferentes concentraciones es agregado a las células, junto con 1,0 µCi/ml [metilo <sup>3</sup>H] timidina (teniendo una actividad específica de aproximadamente 67 Ci/mmol) e incubadas durante 20 horas a 15°C. La <sup>3</sup>H-timidina incorporada es medida como radioactividad asociada con el material ácido insoluble. Las concentraciones del compuesto que se requieren para reducir la incorporación de [metilo <sup>3</sup>H] timidina en 50% (IC<sub>50</sub>) se determinan para identificar un compuesto y su concentración que bloquea la síntesis de ADN.

55

Los peces se aclimataron por una semana, durante la que se colectaron muestras de agua al azar de tiempo y muestras de tejido y se probaron para la presencia de bacterias y virus. Las muestras se someten a cultivo en agar de soja de triptona (TSA), medio de enfermedad de riñón (KDM-2), y cultivos celulares CHSE-214 con y sin antibióticos.

5 Las cepas SP de IPNV se propagan en células de embrión de salmónes del Chinook (CHSE- 214), y pueden ser tituladas y almacenadas a -70°C para el uso futuro. Los peces pueden ser obtenidos de innumerables fuentes. Para algunos de los ejemplos de esta invención, algunos de los peces utilizados fueron obtenidos de la Universidad de Chile ubicada en la isla de Chiloé.

10 Los alevines de salmón Atlántico utilizados en los ejemplos tienen 90 días de vida y pesan  $\pm$  0,2 gramos. Los alevines son distribuidos en grupos de 50 miembros cada uno y mantenidos en agua a 10-12°C. El 80% del agua se cambia diariamente.; cada 5 días el agua se cambia completamente. Los peces son alimentados 2 veces al día con alimento que equivale al 3% de su peso corporal. A los alevines se les observan sus síntomas clínicos, muerte y/o comportamiento anormal, lo que es cuidadosamente registrado.

15 Los peces infectados experimentalmente son expuestos al virus en agua a 10-12°C que contiene aproximadamente  $10^6$  pfu/mL del virus, tales como cepas IPNV Sp, por 2 horas. La exposición al virus coincide típicamente con la alimentación para facilitar la captación de IPNV. Grupos de controles no infectados se tratan usando los mismos métodos como aquéllos de los grupos infectados, excepto que se agrega el virus al medio de cultivo celular.

Los agentes antivirales pueden ser administrados por exposición de los peces al agente antiviral por un período de tiempo y por un protocolo específico. Un rango de concentración del compuesto administrado es de 0,1 a 100  $\mu$ g/mL.

20 El método y la composición presentes pueden ser aplicados a animales acuáticos de todas las edades, para bajar la mortalidad y aumentar los rendimientos. Bajar la mortalidad y aumentar los rendimientos también pueden ser alcanzados por peces que permanecen como portadores del virus.

25 Para administrar el compuesto, las concentraciones que reducen la incorporación de [metilo-<sup>3</sup>H] timidina en 50 % (IC<sub>50</sub>) se usa como una indicación inicial de la concentración o rango de dosis para ser evaluado inicialmente, antes de la identificación de la cantidad terapéutica efectiva. Los alevines son inmersos durante 2 horas en una solución que contiene el compuesto. Los alevines no infectados están bajo las mismas condiciones en ausencia del compuesto antiviral. Esta administración se prueba antes, durante y después de la exposición y/o infección de IPNV. En los centros de cultivo de peces, es importante contar con un método de tratamiento que pueda ser iniciado antes, durante y/o después de la infección con IPNV, así como también antes, durante y/o después que la enfermedad producida por IPNV y la muerte aparezcan. La estabilidad del compuesto usado en el presente método y la composición de alimentos es otra característica importante, el modo de preparación y la administración del compuesto. Por ejemplo, la neomicina es estable en solución.

35 La detección, identificación y la cuantificación de IPNV se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) en las muestras de tejido (por ejemplo, hígado y pulmón) del pez u otro animal acuático, utilizando métodos conocidos en el arte, tal como los descritos en López-Lastra *et al*, J. Fish Dis. 17: 269 (1994). La primera amplificación se hace con cebadores, tales como los cebadores III y IV, que obtiene un producto de 657 bp. En la segunda amplificación, se usan cebadores tales como I y II, que obtienen un producto de 228 bp. Los productos de PCR se visualizan con tinción de plata, después de ser sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida (PAGE) al 12%.

40 La administración de la composición de la invención presente no sólo aumenta el rendimiento del pez tratado, sino también puede bajar los títulos virales presentes en los animales acuáticos IPNV-infectados sobrevivientes portadores. El método presente para el tratamiento de infecciones IPNV en el pez, puede ser un medio preferido para aumentar la producción y rendimiento de salmón y de la trucha.

45 La transmisión de IPNV es horizontal y vertical. Para criadores selectos que pueden preferir utilizar stocks libres de virus para engendrar sus animales acuáticos (como salmón y trucha), los compuestos preferidos a ser usados en el método y composiciones de la invención presente son aquéllos que son capaces de eliminar IPNV en los stocks de crías. Tal eliminación del título de IPNV es documentada utilizando los métodos descritos aquí.

50 Los compuestos preferidos se eligen por su habilidad de disminuir y/o eliminar la progenie viral infectiva y su habilidad de inhibir la replicación viral *in vivo*. También, el efecto inhibitorio del compuesto en la formación de partículas virales es determinado. Además, las muestras virales son expuestas al compuesto toda la noche y sus títulos se evalúan después de esto. Esos compuestos que bajan el título viral por un orden de magnitud menor, indica la habilidad del compuesto de disminuir eficazmente la descendencia viral infectiva. La capacidad del compuesto para disminuir y/o eliminar la descendencia viral infectiva *in vivo* y/o inhibir la replicación viral *in vivo*, es

determinada por métodos conocidos en el arte que incluye la valoración de la capacidad del compuesto de aumentar la supervivencia de los animales antes, durante y/o después de la exposición al virus.

Los siguientes ejemplos de pruebas demuestran la eficacia de la invención.

#### **EJEMPLO 1: El efecto de neomicina sobre la síntesis de RNA de IPNV.**

5 Se determinó el efecto de la neomicina en la síntesis RNA genómico de IPNV. Los resultados se muestran en la autoradiografía de la Figura 1A. Monocapas de células de embriones de salmones Chinook de línea celular 214 (CHSE-214) fueron infectadas con IPNV en ausencia de neomicina (líneas 3, 5, 7 y 9) o en presencia de 4 mg/mL de neomicina (líneas 2, 4, 6 y 8). La neomicina fue agregada a las células 1, 3, 5 y 7 horas post infección (h.p.i.), (líneas 2, 4, 6 y 8) respectivamente, y las células fueron incubadas a 15°C. A las 24 horas post infección, las células fueron cosechadas, se les extrajo el RNA y se analizó con electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% (PAGE) teñidas con nitrato de plata. La línea 1 muestra un control de RNA genómico de IPNV. Los datos muestran que la neomicina inhibió la síntesis de RNA de IPNV.

#### **EJEMPLO 2: El efecto de neomicina sobre la síntesis de polipéptido de IPNV.**

15 Se determinó el efecto de neomicina sobre la síntesis de polipéptido de IPNV y los resultados se muestran en la autoradiografía de la Figura 1B. Monocapas de células de CHSE-214 fueron infectadas con IPNV en ausencia (líneas 3, 5, 7 y 9) o en presencia de 4 mg/mL de neomicina (líneas 2, 4, 6 y 8). La neomicina fue agregada 7, 5, 3 y 1 hora post infección (h.p.i.), (líneas 2, 4, 6 y 8) respectivamente, y las células fueron incubadas a 15°C. A las 4 horas post infección, se aplicó a las células 50 µCi/ml de [<sup>35</sup>S]-metionina. A las 24 horas h.p.i. se agregaron a las monocapas de células, 100 µL de una solución de lisis de proteína. Se analizaron los polipéptidos de las células rotas con 15% SDS-PAGE y autoradiografía. La línea 1 es un control de células CHSE-214 no infectadas. La neomicina no inhibe la síntesis de polipéptido de IPNV.

#### **EJEMPLO 3: El efecto del tratamiento con neomicina sobre la sobrevivencia de alevines infectadas con IPNV.**

25 Alevines de salmón Atlántico (con peso corporal promedio de aproximadamente 0,75 ± 0,3 g) fueron infectadas el día 0 con 104 pfu/mL de IPNV. Un día post infección, los peces fueron tratados diariamente por inmersión durante 1 hora en un baño que contenía 10, 40 u 80 ppm de neomicina. Los alevines de peces no infectados control son tratados diariamente durante 1 hora con 0 u 80 ppm de neomicina. Este tratamiento diario con neomicina continuó durante 10 días post infección. Los peces fueron observados durante 26 días post infección para documentar las muertes. Los resultados están representados gráficamente en términos de “% de sobrevivencia” en la Figura 2. El tratamiento de alevines de salmón infectados con IPNV con menos de 10 ppm puede mantener la sobrevivencia en niveles equivalentes a los controles de no infectados.

#### **EJEMPLO 4**

35 La sobrevivencia de alevines infectados con IPNV tratados con neomicina, fue cercano a 2 semanas post infección. Los alevines de salmón que pesaban aproximadamente 0,45 a aproximadamente 1,0 g, fueron infectadas el día 0 con 10<sup>5</sup> pfu/mL de IPNV. Al comienzo de los 13 días post infección, después que el brote de mortalidad comenzó, los peces fueron tratados diariamente por inmersión durante 1 hora en un baño que contenía 10, 40 y 80 ppm de neomicina y continuó durante 23 días post infección. Los peces fueron observados durante 26 días post infección para documentar las muertes. Los resultados son presentados gráficamente en la Figura 3 en términos de porcentaje de sobrevivencia. Es importante considerar que los alevines de salmón infectados con IPNV, dejaron de morir inmediatamente cuando fueron tratadas con neomicina.

45 La descripción anterior de las realizaciones preferidas de la presente invención ha sido presentada con propósitos de ilustración y descripción. No pretende ser exhaustivo ni limitar la invención de las formas precisas descritas. Muchas variaciones y modificaciones de las realizaciones descritas en este documento serán obvias para una persona entendida en el estado de la técnica, a la luz de la descripción anterior. El alcance de la invención está definido sólo por las reivindicaciones adjuntas.

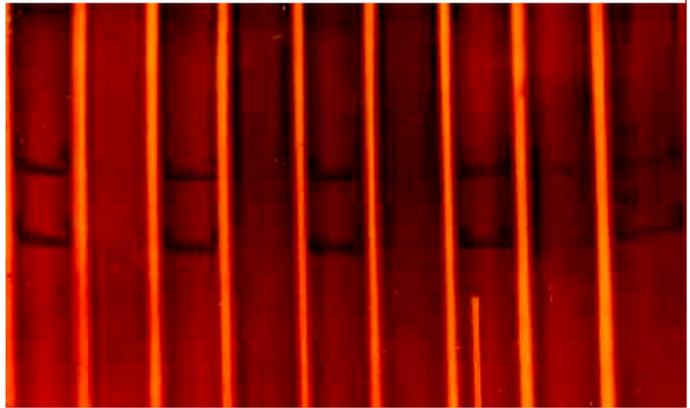
## REIVINDICACIONES

1. Uso de neomicina para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infección de un animal acuático por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).
- 5 2. Uso de acuerdo a la reivindicación 1, donde la administración del medicamento se lleva a cabo en un momento seleccionado de un grupo que consiste de antes, durante, después, durante y después, antes y durante; antes, durante y después o antes y después que dicho animal acuático es expuesto a dicho virus y/o infectado con dicho virus.
- 10 3. Uso de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, donde la administración del medicamento es a través de un método seleccionado de un grupo que consiste en: introducción del compuesto en el ambiente acuático, incluyendo el compuesto en el alimento e inyectando en el animal acuático el compuesto disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la administración inhibe la síntesis del RNA genómico viral en dicho animal acuático.
- 15 5. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la administración disminuye la carga viral/título viral del IPNV en un tejido del animal acuático.
6. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la administración disminuye la carga viral/título viral del IPNV en un tejido del animal acuático desde  $10^5$  pfu/mL a una carga viral/título viral de  $10^1$  a  $10^3$  pfu/mL.
- 20 7. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la administración disminuye la carga viral/título viral del IPNV en un tejido del animal acuático de 10-veces a  $10^4$ -veces.
8. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la administración disminuye la carga viral/título viral del IPNV en un tejido del animal acuático de 10-veces a 100-veces.
9. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el medicamento es administrado en una concentración de 7,0 a 30  $\mu\text{g/mL}$  de agua en el ambiente de un animal acuático.
- 25 10. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el medicamento es administrado en una concentración de 9,0 a aproximadamente 14  $\mu\text{g/mL}$  de agua en el ambiente de un animal acuático.
11. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el animal acuático es seleccionado de un grupo que consiste en peces, copépodos, cefalópodos, crustáceos, camarones, anguilas y moluscos.
- 30 12. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el animal acuático es un pez seleccionado de un grupo que consiste en peces de las familias *Anguillidae*, *Bothidae*, *Caragidae*, *Cotostornidae*, *Chichlidae*, *Clupeidae*, *Cobitidae*, *Coregonidae*, *Cyprinidae*, *Esocidae*, *Moronidae*, *Paraichthyidae*, *Percidae*, *Poecillidae*, *Salmonidae*, *Salvelinus*, *Sciaenidae*, *Thymallidae* y las especies *Seriola quinqueradiata* (yellowtail), *Scophthalmus maximus* (rodabalo), *Limanda limanda* (dab), *Hippoglossus hippoglossus* (halibut), *Gadus morhua* (Bacalao Atlántico), *Misgrunus anguillisaudatus* (loach), y *Esox lucious* (pike).
- 35 13. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el animal acuático es un pez de las familias *Salmonidae* o *Salvelinus* seleccionado de un grupo que consiste de las truchas *Oncorhynchus kisutch* (Chinook, King o Spring), *Oncorhynchus nerka* (Blueback, Red, Sockeye), *Oncorhynchus kisutch* (Coho, Silver), *Oncorhynchus gorbuscha* (Pink), *Oncorhynchus mykiss* (trucha Arcoiris), *Oncorhynchus keta* (Chum o Keta), *Oncorhynchus masou* (Masou o Cherry) y *Salmon salar* (salmón Atlántico).
- 40 14. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde dicho medicamento es un alimento de pez en forma de pellet húmedo.
15. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la administración del medicamento disminuye o detiene la progresión de la enfermedad pancreática
- 45 16. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde el animal acuático es seleccionado de un grupo que consiste en salmón, trucha arcoiris y trucha de arroyo.

17. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde dicho medicamento se administra después que los signos clínicos del IPNV son detectados y/o después de la detección del IPNV en el tejido de dichos animales y/o después de la detección del aumento de la mortalidad o disminución de la supervivencia de dichos animales acuáticos.

# FIG. 1A

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Neomicina (4 mg/mL)	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Tiempo de adición (h.p.i)	-	1	-	3	-	5	-	7	-



# FIG. 1B

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IPNV									
Neomicina (4 mg/mL)	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Tiempo de adición (h.p.i)	-	7	-	5	-	3	-	1	-

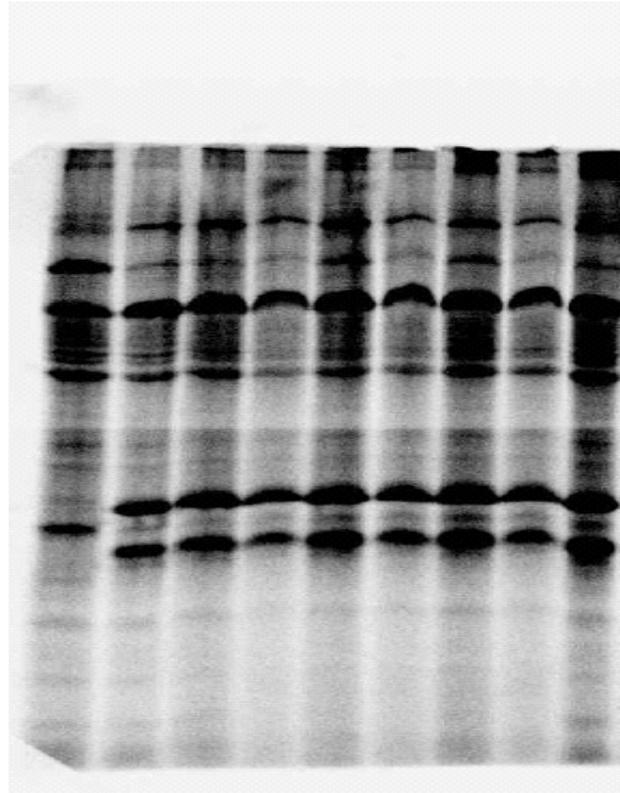


FIG. 2

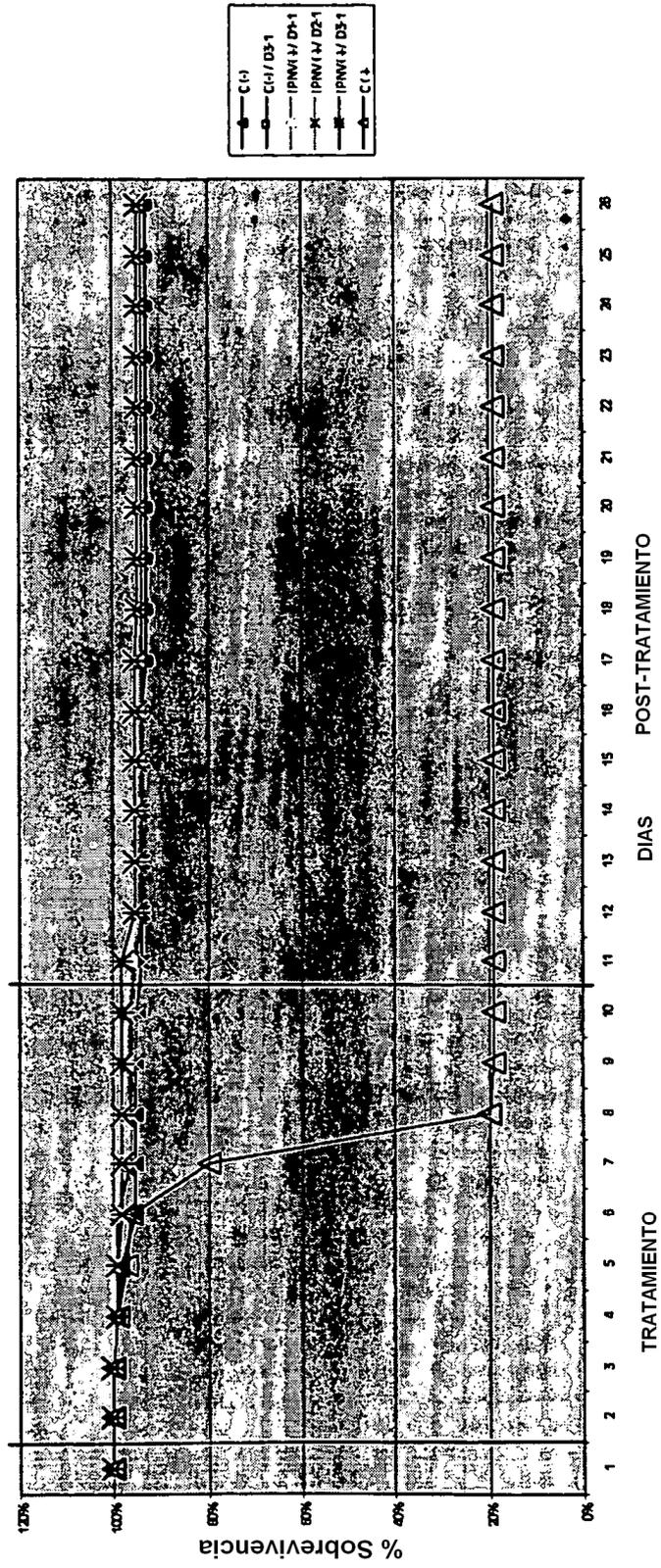


FIG. 3

