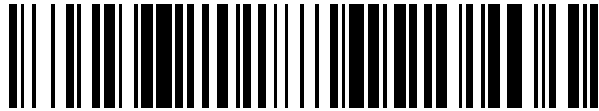


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 350**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2007 E 07804957 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2032708**

54 Título: **Novirhabdovirus recombinantes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

16.06.2006 EP 06290982

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

17.10.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (100.0%)
Etablissement Public à Caractère Scientifique et
Technologique 147, rue de l'Université
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**HARMACHE, ABDALLAH;
BREMONT, MICHEL y
KOUMANS, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 509 350 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

Novirhabdovirus recombinantes y usos de los mismos

La presente invención se refiere al uso de novirhabdovirus como un vector génico, para producir proteínas recombinantes o para producir vacunas útiles en peces o en vertebrados superiores.

5 Los novirhabdovirus son virus de ARN de cadena negativa de la familia *Rhabdoviridae*.

El género *Novirhabdovirus* comprende diversas especies patógenas para animales acuáticos, en particular para peces.

10 La estructura del genoma novirhabdoviral es similar a la de los rhabdovirus de mamíferos, pero difiere de éstos por la presencia de un gen adicional, que codifica una proteína no estructural, denominada proteína NV (de “no virión”), cuya función sigue siendo desconocida en el momento actual.

El genoma novirhabdoviral comprende seis genes, cuya organización puede representarse como un diagrama de la siguiente manera:

3'-N-P-M-G-NV-L-5'

15 N representa el gen que codifica la nucleoproteína asociada con el ARN viral, P representa el gen que codifica la fosfoproteína asociada con la polimerasa viral, M representa el en que codifica la proteína de matriz, G representa el gen que codifica la glucoproteína de envoltura G, NV representa el en que codifica la proteína NV y L representa el gen que codifica la ARN polimerasa viral dependiente de ARN.

20 Estos genes se separan por regiones intergénicas: cada una de ellas comprende una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación y una señal de inicio de la transcripción, que permite la transcripción de los genes a ARNm individuales, separados por un dinucleótido intergénico no transcrito.

25 La especie tipo del género es el Virus de Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV) que es el agente etiológico de una enfermedad grave de varias especies de salmónidos, principalmente en truchas de un año. Otras especies en el género incluyen rhabdovirus Hirame (HRV), Virus de Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV) y rhabdovirus de Cabeza de serpiente (SKRV). La secuencia genómica completa del IHNV está disponible en GenBank con el número de acceso L40883; la secuencia genómica completa del VHSV está disponible en GenBank con el número de acceso Y18236; la secuencia genómica completa del HRV está disponible en GenBank con el número de acceso AF104985; la secuencia genómica completa del SKRV está disponible en GenBank con el número de acceso AF147498.

30 Pueden obtenerse novirhabdovirus recombinantes por genética inversa, transfectando conjuntamente una célula huésped con un ADN complementario antígenómico ADN (ADNc antígenómico), es decir, una copia de sentido positivo de genoma viral, y con moléculas de ADN que codifican las proteínas virales N, P y L (BIACCHESSI y col., J Virol, 74, 11247-53, 2000), y modificarse su genoma.

35 Este enfoque también permitió diferentes modificaciones para el genoma novirhabdoviral. Por ejemplo, se ha mostrado que el gen NV del virus IHN puede suprimirse y reemplazarse por un gen ajeno (BIACCHESSI y col., 2000, citado anteriormente; THOULOZE y col., J Virol, 78, 4098-107, 2004; documento PCT WO 03/097090). También se ha mostrado que era posible reemplazar las proteínas estructurales principales (M y G) de IHNV con las de VHSV (BIACCHESSI y col., J Virol, 76, 2881-9, 2002).

40 También se ha intentado insertar un gen adicional en un novirhabdovirus. (BIACCHESSI, Tesis Doctoral: “GENERATION DE RHABDOVIRUS AQUATIQUES RECOMBINANTS PAR GENETIQUE INVERSE”, UNIVERSITE PARIS XI ORSAY, 5 de abril de 2002). Se insertó una construcción de ADN que contenía un gen ajeno (que codificaba IL-1-β de la trucha arco iris) flanqueado por una señal de inicio de la transcripción y una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación reconocida por la L polimerasa viral, en el ADNc del IHNV, en la región intergénica entre los genes M y G del IHNV. Más específicamente, ya que este gen se introdujo en un sitio de restricción de EagI de origen natural situado entre el extremo de la ORF M y la señal de terminación de la transcripción del gen M, esta construcción comprendía una secuencia (CCAAGACAGAAAAAATGGCAC; SEC ID N°: 1) que consistía en el sitio de terminación de la transcripción/poliadenilación predicho del gen M del IHNV (CCAAGACAGAAAAA; SEC ID N°: 2) seguido del dinucleótido intergénico no transcrito TG y de la secuencia de inicio de la transcripción GCAC, estando dicha secuencia inmediatamente seguida de la ORF de la IL-1-β flanqueada en 5' por un sitio de restricción de SpeI, y en 3' por un sitio de restricción de SmaI.

50 El virus recombinante (IHNV-IL-1) obtenido de este modo fue capaz de multiplicarse de forma normal en cultivo celular y fue tan patógeno en truchas arco iris juveniles como el IHNV de tipo silvestre. Sin embargo, se detectó solamente ARNm de IL-1β, pero no proteína IL-1β en las células infectadas. Por otro lado, un IHNV recombinante similar, que contenía un gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), acompañado de la misma señal de inicio de la transcripción y la misma señal de terminación de la transcripción/poliadenilación era capaz de expresar GFP en las células infectadas (BREMONT, Current Topics in Microbiology and Immunology 292: 119-141, 2005).

Los inventores han encontrado ahora que cuando la secuencia de inicio de la transcripción GCAC desvelada por BIA-CHESI o BREMONT se reemplaza por la secuencia GCACTTTTGTGC (SEC ID N°: 3), el gen adicional no solamente se transcribe sino que también se traduce, independientemente de su naturaleza, permitiendo la expresión de una amplia serie de proteínas ajenas.

5 La presente invención proporciona por lo tanto novirhabdovirus recombinantes que tienen una o más unidades de transcripción adicionales insertadas en al menos una de las regiones intergénicas del genoma de un novirhabdovirus huésped. La invención también proporciona construcciones de ADN recombinantes que permiten obtener dichos novirhabdovirus recombinantes.

10 En el presente documento, una "unidad de transcripción" (denominada también en el presente documento como "cistrón") se define como una construcción de ADN que comprende una señal de inicio de la transcripción, seguida de una ORF que codifica una proteína de interés, y una de señal de terminación de la transcripción/poliadenilación.

La invención se refiere a una construcción de ADN recombinante que comprende:

- 15 a) una región que comprende una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación del gen M de novirhabdovirus, definiéndose dicha región por la siguiente secuencia: VHHAGAYAGAAAAAAA (SEC ID N°: 4), en la que A, T, G, V, H e Y tienen su significado habitual en el código de nucleótidos de IUPAC;
- 20 b) una región que comprende una secuencia de inicio de la transcripción del gen G novirhabdovirus, definiéndose dicha región por la siguiente secuencia: GCACDWKWGTGY (SEC ID N°: 5), en la que A, T, G, C, D, W, K e Y tienen su significado habitual en el código de nucleótidos de IUPAC;
- 20 en la que dicha región a) está seguida o dicha región b) está precedida de un dinucleótido intergénico no transgénico de un novirhabdovirus,
- c) una región que comprende una fase abierta de lectura que codifica una proteína de interés.

25 en la que las regiones a), b) y c) están dispuestas en un orden seleccionado del grupo que consiste en: a-b-c y b-c-a.

La secuencia de terminación/poliadenilación de la región a) y la secuencia de inicio de la región b) pueden derivar de un mismo gen o de dos genes diferentes de un novirhabdovirus. Preferentemente, derivan de uno o dos genes del novirhabdovirus en los que se pretende insertar la construcción.

El dinucleótido intergénico no transcrito se selecciona preferentemente entre TG y CG.

30 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de terminación/poliadenilación de la región a) y la secuencia de inicio de la región b) derivan del novirhabdovirus en el que se pretende insertar la construcción y preferentemente derivan respectivamente del gen M y G de dicho novirhabdovirus.

35 Por ejemplo, si se pretende insertar la construcción en IHNV, la secuencia de terminación/poliadenilación será CCAAGACAGAAAAAAA (SEC ID N°: 2), y la secuencia de inicio de la transcripción será GCACTTTTGTGC (SEC ID N°: 3).

40 Del mismo modo, si se pretende insertar la construcción en VHSV, la secuencia de terminación/poliadenilación será be ATTAGATAGAAAAAAA (SEC ID N°: 6), y la secuencia de inicio de la transcripción será GCACATTTGTGT (SEC ID N°: 7); si se pretende insertar la construcción en HRV, la secuencia de terminación/poliadenilación será ATCAGATAGAAAAAAA (SEC ID N°: 8), y la secuencia de inicio de la transcripción será GCACATTTGTGT (SEC ID N°: 7); si se pretende insertar la construcción en SKRV, la secuencia de terminación/poliadenilación será GAAAGACAGAAAAAAA (SEC ID N°: 9), y la secuencia de inicio de la transcripción será GCACGAGAGTGC (SEC ID N°: 10).

45 En la región c) la fase abierta de lectura que codifica el polipéptido de interés puede estar fusionada opcionalmente con una fase abierta de lectura que codifica una proteína estructural novirhabdoviral (es decir, N, P, M o G), preferentemente proteína N. La fusión permite la incorporación del polipéptido de interés en la partícula novirhabdoviral. Preferentemente, el extremo N terminal del polipéptido de interés está fusionado con el extremo C terminal de dicha proteína estructural novirhabdoviral.

50 Sin embargo, cuando la proteína de interés que se expresa en un novirhabdovirus de la invención es una proteína de membrana, tal como una glucoproteína de membrana de un virus con envoltura, ésta puede incorporarse en la partícula viral, sin necesidad de fusionarla con una proteína estructural novirhabdoviral.

El orden las regiones a), b) y c) en la construcción de ADN depende de la posición en la que se pretende insertar dicha construcción en la región intergénica del novirhabdovirus huésped.

55 Si la construcción va a insertarse entre el extremo de una ORF endógena y la señal de terminación de la transcripción/poliadenilación del gen endógeno correspondiente, el orden será a-b-c. En este caso, la transcripción del gen endógeno se terminará en la secuencia de terminación/poliadenilación de la región a) de la construcción, y la transcripción de la ORF que codifica la proteína de interés se iniciará en la secuencia de inicio de la región b) de la

construcción y se terminará en la señal de terminación/poliadenilación endógena del gen endógeno.

5 Si la construcción se va a insertar entre la señal de inicio de la transcripción y el codón de partida de un gen endógeno, el orden será c-a-b. En este caso, la transcripción de la ORF que codifica la proteína de interés se iniciará en la señal de inicio del gen endógeno, y se terminará en la secuencia de terminación/poliadenilación de la región a) y la transcripción del gen endógeno se iniciará en la secuencia de inicio de la región b) de la construcción.

Si la construcción se va a insertar entre la señal de terminación de la transcripción/poliadenilación de un primer gen endógeno, y la señal de inicio de la transcripción de un segundo gen endógeno, el orden será b-c-a. En este caso, la transcripción de la ORF que codifica la proteína de interés se iniciará en la secuencia de inicio de la región b), y se terminará por la secuencia de terminación/poliadenilación de la región a) de la construcción.

10 La presente invención también proporciona un ADNc antígenómico del genoma de un novirhabdovirus, caracterizado por que contiene una o más construcciones de ADN recombinante de la invención insertadas en una parte de dicho ADNc comprendido entre el codón de parada de una primera ORF endógena y el codón de inicio de una segunda ORF endógena de un novirhabdovirus huésped.

15 De acuerdo con una realización preferida, dicho ADNc antígenómico contiene dos construcciones de la invención insertadas en una parte de dicho ADNc comprendida entre el codón de parada de una primera ORF endógena y el codón de inicio de una segunda ORF endógena; de acuerdo con otra realización preferida más, dicho ADNc antígenómico contiene tres construcciones de la invención insertadas en una parte de dicho ADNc comprendida entre el codón de parada de una primera ORF endógena y el codón de inicio de una segunda ORF endógena.

Preferentemente, la primera ORF endógena es la ORF M, y la segunda ORF endógena es la ORF G.

20 La presente invención también proporciona un novirhabdovirus recombinante que contiene un ARN genómico complementario de un ADN antígenómico de la invención.

25 La invención también se refiere al uso de novirhabdovirus recombinantes que tienen una o más unidades de transcripción adicionales insertadas en al menos una de las regiones intergénicas del genoma de un novirhabdovirus huésped, para producir proteínas de interés en células de vertebrados (preferentemente células de peces) en cultivo, y/o para obtener vacunas.

30 Los inventores han encontrado que, cuando contienen una construcción, los novirhabdovirus de la invención son capaces de multiplicarse de forma normal en células de peces en cultivo y mantener su capacidad patógena. Cuando se añade una segunda construcción, se conserva la capacidad para multiplicarse en cultivos celulares, mientras se reduce la patogenicidad. La adición de una tercera construcción no tiene ningún efecto significativo en la capacidad para multiplicarse en cultivos celulares; típicamente el novirhabdovirus recombinante de la invención, que comprende, una, dos o tres construcciones, puede producirse en cultivos celulares a títulos $>10^8$ u.f.p./ml. Por otro lado, el novirhabdovirus recombinante de la invención, que comprende tres construcciones tiene una patogenicidad considerablemente reducida.

35 Para la producción de proteínas de interés en células en cultivo, se puede usar un novirhabdovirus que contiene una o más construcciones, preferentemente dos o tres construcciones.

40 El uso de un novirhabdovirus de la invención que tiene o dos más construcciones es de interés particular si se desea expresar simultáneamente varios polipéptidos, por ejemplo subunidades de una misma enzima, o un precursor inactivo de una proteína activa, y una segunda proteína capaz de convertir dicho precursor en la forma activa. En el desarrollo de vacunas se forman algunos epítomos protectores solamente cuando se expresan dos o más polipéptidos simultáneamente. El uso de un novirhabdovirus de la invención permitirá expresar dichos polipéptidos para formar los epítomos protectores.

Además, como se ha desvelado anteriormente, el hecho de que las proteínas expresadas pueden incorporarse en la partícula viral, es de interés particular para la producción de vacunas.

45 Pueden usarse novirhabdovirus de la invención que contienen tres o más construcciones como vacunas atenuadas vivas, para la vacunación de peces, por ejemplo, salmónidos en el caso de IHNV o VHSV. Pueden administrarse provechosamente por baño, es decir, mediante la sencilla adición de la vacuna al agua en el tanque de cría que contiene los animales para inmunizar.

Como alternativa, los novirhabdovirus recombinantes o las células que producen el virus pueden usarse como vacuna inactiva en peces.

50 Los novirhabdovirus recombinantes de la invención, y en particular los que se replican a bajas temperaturas tales como IHNV y VHSV, también pueden usarse como un sistema de suministro de antígenos no replicativo para la vacunación de vertebrados superiores, tales como aves y mamíferos. Los inventores han observado de hecho que cuando se inyecta un IHNV recombinante de la invención que expresa un antígeno ajeno en un mamífero, dicho virus es completamente incapaz de replicarse en dicho mamífero, mientras por otro lado, se induce una respuesta

inmunitaria fuerte contra el antígeno ajeno incorporado en la partícula viral, en ausencia completa de adyuvantes adicionales.

5 Los inventores también han encontrado que los novirhabdovirus que se replican a temperaturas bajas (de 14 a 20 °C), tales como IHNV y VHSV, son particularmente adecuados para la producción de proteínas termosensibles que son difíciles de producir en huéspedes de expresión clásica tales como *E. coli*, baculovirus, levadura, que generalmente requieren temperaturas de al menos 25-30 °C para su crecimiento. Son por ejemplo de interés particular para producir proteínas inmunoprotectoras *in vitro*, útiles como componentes de vacuna. Muchas de estas proteínas, especialmente las que se originan a partir de organismos patógenos de peces, no pueden expresarse o plegarse en la estructura correcta a la temperatura convencional de la mayoría de los sistemas de expresión basados en bacterias, levadura, eucariotas y baculovirus.

Por lo tanto, un objeto de la invención es el uso de un IHNV o VHSV recombinante que comprende una secuencia heteróloga que codifica una proteína antigénica de interés de acuerdo con la invención, para expresar *in vitro* dicha proteína en un sistema de expresión de baja temperatura.

15 La invención proporciona por lo tanto un sistema de expresión *in vitro* de baja temperatura, caracterizado por que dicho sistema de expresión comprende un IHNV o VHSV recombinante que comprende al menos una secuencia heteróloga que codifica una proteína de interés antigénica de acuerdo con la invención, y una célula de vertebrado susceptible de infección por dicho virus recombinante y capaz de crecer a temperatura baja.

La invención también proporciona un procedimiento para expresar *in vitro* una proteína de interés antigénica, comprendiendo dicho procedimiento:

- 20
- infectar una célula de vertebrado susceptible de infección por IHNV o VHSV y capaz de crecer a temperatura baja con un IHNV o VHSV recombinante que comprende al menos una secuencia heteróloga que codifica una proteína antigénica de interés de acuerdo con la invención;
 - cultivar dicha célula a una temperatura de aproximadamente 14 °C a aproximadamente 20 °C;
 - recuperar la proteína antigénica de interés producida por dicha célula.

25 De acuerdo con una realización preferida de la invención, dicha célula de vertebrado es una célula de pez, por ejemplo, una célula de EPC.

30 Se puede usar un IHNV o VHSV recombinante en el que la secuencia heteróloga se inserta en reemplazo de una secuencia endógena del novirhabdovirus huésped; sin embargo, se usará preferentemente un IHNV o VHSV recombinante en el que la secuencia heteróloga se inserta además de las secuencias endógenas del novirhabdovirus huésped. Aún más preferentemente, se usará un novirhabdovirus recombinante de la invención, en el que la secuencia heteróloga es una parte de una unidad de transcripción adicional insertada en una de las regiones intergénicas del novirhabdovirus huésped. Un novirhabdovirus preferido es IHNV.

35 La presente invención se entenderá más exhaustivamente a partir de la descripción adicional a continuación, que se refiere a ejemplos no limitantes de construcción y de uso de los novirhabdovirus recombinantes de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1: construcción de novirhabdovirus recombinantes que comprenden uno, dos o tres cistrones adicionales en la región intergénica m-g

La Figura 1 representa de forma esquemática las diferentes construcciones descritas a continuación.

Leyenda de la Figura 1:

- 40 **A:** es la construcción pIHN inicial que contiene el genoma de ADNc de IHNV de longitud completa. Los siguientes elementos se representan para esta construcción y se omitirán en los esquemas que muestran las otras construcciones: prom T7 = promotor de ARN polimerasa T7, δ = secuencia delta de hepatitis de ribozima, T7t = secuencia terminadora de ARN polimerasa T7.
- 45 **B:** pIHN-LUC.
C: pIHN-X.
D: pIHN-LUC- Δ G
E: inserto generado mediante restricción de pIHN-X con *EagI*
F: pIHN-X-LUC- Δ G.
G: inserto generado mediante digestión de pIHN-LUC por *SpeI*/*NsiI*
- 50 **H:** pIHN-X-LUC
I: inserto *EagI*/*EagI* generado mediante digestión de pIHN-Y.
J: pIHN-X-Y-LUC

Construcción de los ADNc recombinantes

Las construcciones se llevaron a cabo usando el plásmido pIHNV descrito por BIACCHESI y col. (2000, citado anteriormente). Este plásmido contiene el ADNc completo del genoma del virus IHN, clonado cadena arriba del promotor de la ARN polimerasa del fago T7 y cadena abajo de una secuencia de ribozima del virus δ de hepatitis y del terminador de la transcripción de la ARN polimerasa del fago T7, en el vector pBlueScript SK (Stratagene).

El genoma de ADNc de pIHNV contiene un único sitio de restricción *EagI* localizado en la región intergénica M-G. Este sitio de restricción se usa para insertar un cistrón adicional, que codifica un gen de interés, como se representa en esquema en la Figura 1. Al comienzo y al final del gen de interés, se han introducido respectivamente sitios de enzimas de restricción *SpeI* y *SmaI*, para permitir el reemplazo del gen de interés por otro gen. El plásmido pIHNV se representa en esquema en la Figura 1A.

Construcción de ADNc antigenómicos recombinantes con un cistrón adicional pIHNV-LUC (Figura 1B):

pIHNV-LUC resulta de la inserción del gen de casete de expresión de luciferasa de Renilla en el sitio *EagI* de pIHNV.

Se obtiene de la siguiente manera:

Se amplificó por PCR el gen de Luciferasa de Renilla a partir del vector pBind (Promega GenBank, número de acceso AF264722) usando los siguientes oligonucleótidos:

EagI SpeI RnLuc:

ggggCGGCCGCAAGACAGAAAAAATGGCACTTTTGTGCACTAGTATGACTTCGAAAGTTTATGATCCA (SEC ID N°: 11).

Este oligonucleótido contiene el sitio de restricción de *EagI* (CGGCCG) seguido de la secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación del gen M (CCAAGACAGAAAAA; SEC ID N°: 2), del dinucleótido TG y de la secuencia de inicio de la transcripción del gen G (GCACTTTTGTGC; SEC ID N°: 3) seguida de al menos 24 nucleótidos de la luciferasa de Renilla.

EagI SmaI RnLuc:

ggggCGGCCGCCCGGTTATTGTTTCATTTTTGAGAACTCG (SEC ID N°: 12).

Este oligonucleótido contiene un sitio de restricción de *EagI* (CGGCCG).

El producto de PCR se digirió con enzima *EagI* y se insertó en el sitio *EagI* de pIHNV, lo que conduce a la construcción de pIHNV-LUC, como se muestra en la Figura 2.

El plásmido final se secuenció para comprobar la orientación y la secuencia del fragmento *EagI* insertado.

Todos estos plásmidos se secuenciaron para comprobar la orientación y/o la secuencia de los fragmentos insertados.

pIHNV-X o pIHNV-Z (Figura 1C)

Estas construcciones resultan del reemplazo del gen de luciferasa por cualquier otro gen de interés (ejemplificado por X o Z). Se obtienen por amplificación por PCR del gen de interés con un conjunto de cebadores que contienen el sitio *SpeI* en un lado (o un sitio de restricción compatible como *NheI*) y en el otro lado el sitio *SmaI* (o un sitio de restricción de extremos romos compatibles).

Para pIHNV-X, el fragmento *SpeI/SmaI* que contiene la fase abierta de lectura de luciferasa se reemplaza con un fragmento de PCR *NheI/EcoRV* compatible que contiene el gen de interés X. La construcción pIHNV-X resultante ha perdido los sitios de restricción *SpeI* y *SmaI*.

De forma similar, la construcción pIHNV-X se obtiene a partir de pIHNV-Luc por el reemplazo del fragmento *SpeI/SmaI* que contiene el gen Luc por el fragmento de PCR *SpeI/SmaI* que contiene el gen Z. Esta construcción se denomina pIHNV-Z.

Construcción de ADNc antigenómicos recombinantes con dos cistrones adicionales

pIHNV-X-LUC (Figura 1D a 1H)

El fragmento *SmaI/Agel* se retira del plásmido pIHNV-LUC, dando como resultado la eliminación de uno de los dos sitios *EagI* y la delección del gen G. La construcción intermedia obtenida de este modo se denomina pIHNV-LUC- Δ G (Figura 1D).

El casete de expresión de X se obtiene por la digestión con enzima de restricción *EagI* de pIHNV-X (Figura 1E).

Este inserto se liga con pIHN-LUC-ΔG digerido con *EagI*, dando como resultado la construcción pIHN-X-LUC-ΔG (Figura 1F). Casualmente después del ligamiento de los dos fragmentos de *EagI* que condujo a la construcción pIHN-X-LUC-ΔG se generó un sitio de restricción *NotI* único entre las unidades de expresión de X y Luc.

- 5 Finalmente, el fragmento *SpeI/NsiI* de la construcción pIHN-X-LUC-ΔG se reemplaza con el fragmento correspondiente que contiene el gen G obtenido de la construcción pIHN-LUC, por digestión con *SpeI/NsiI* (Figura 1G). La construcción resultante se denomina pIHN-X-LUC (Figura 1H).

Construcción de ADNc antígenómicos recombinantes con tres cistrones adicionales

pIHN-X-Y-LUC (Figura 1I y 1J)

El plásmido pIHN-Y se obtiene como se ha descrito para pIHN-X.

- 10 pIHN-Y se digiere con *EagI* y se recupera el inserto *EagI/EagI* (Figura 1I) y se inserta en pIHN-X-LUC previamente digerido con *NotI*. La construcción obtenida de este modo se denomina pIHN-X-Y-LUC (Figura 1J).

pIHN-X-Y-Z

Esta construcción se obtiene por el reemplazo del fragmento *SpeI/SmaI* de pIHN-X-Y-LUC que contiene el gen Luc por el fragmento *SpeI/SmaI* que contiene el gen Z recuperado de pIHN-Z.

- 15 Producción de los virus recombinantes:

Se construyeron tres plásmidos de expresión que comprendían respectivamente los genes codificantes de la nucleoproteína N, la fosfoproteína P y la ARN polimerasa dependiente de ARN L de IHN, como se describe en BACCCHESI y col. (2000, publicación mencionada anteriormente). Estas construcciones se denominan respectivamente pT7-N, pT7-P y pT7-L.

- 20 Los 3 plásmidos, pT7-N, pT7-P y pT7-L (a dosis respectivas de 0,25 μg; 0,2 μg y 0,2 μg, y se introduce uno de los plásmidos pIHN-LUC, pIHN-X o Z, pIHN-X-LUC, pIHN-X-Y-LUC o pIHN-X-Y-Z a la dosis de 1 μg, por transfección en presencia de lipofectamine (GIBCO-BRL), en células EPC (epitelioma papuloso ciprínido) infectado previamente con un virus vaccinia recombinante que expresa la ARN polimerasa del fago T7 (vTF7-3, FUERST y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4477-4481, 1986).

- 25 Después de la transfección, las células se incuban durante 5 horas a 37 °C y después se lavan con medio de cultivo MEM (sin suero) y se incuban durante 7 días a 14 °C en medio de cultivo MEM que contiene suero de ternero fetal al 2 %. Las células y el sobrenadante se congelan/descongelan, y se clarifican por centrifugación durante 10 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante se usa a una dilución 1/10 para infectar una capa de células EPC. Los virus se producen en el sobrenadante 3-4 días después de la infección.

- 30 Se produjeron diferentes virus INH recombinante, que tenían uno, dos o tres cistrones adicionales. Se enumeran respectivamente las Tablas I, II y III a continuación.

TABLA I

rIHNV	Casete	Objetivo
CAP	CAP	Protección frente a SDV
6KE1	6KE1	Protección frente a SDV
CAP-E3E2	CAP-E3E2	Protección frente a SDV
E3E2	E3E2	Protección frente a SDV
E3E2-6KE1	E3E2-6KE1	Protección frente a SDV
IL1β	IL1β	Inmunoestimulación
G _{VHSV}	G _{VHSV}	Protección frente a VHSV
ΔG-G _{VHSV}	G _{VHSV}	Protección frente a VHSV
LUC _{FF}	LUC _{FF}	Bioluminiscencia
LUC _{RN}	LUC _{RN}	Bioluminiscencia
EGFP	EGFP	Proteína indicadora

(continuación)

rIHNV	Casete	Objetivo
N-LUCi	N-LUC	Incorporación de proteína ajena
N-EGFP	N-EGFP	Incorporación de proteína ajena
P-Luci	P-Luci	Incorporación de proteína ajena
P-EGFP	P-EGFP	Incorporación de proteína ajena
M-Luci	M-Luci	Incorporación de proteína ajena
M-EGFP	M-EGFP	Incorporación de proteína ajena
G _{VHSV} -LUC	V _{VHSV} -LUC	Incorporación de proteína ajena
G _{VHSV} -EGFP	V _{VHSV} -EGFP	Incorporación de proteína ajena
NV-EGFP	NV-EGFP	Incorporación de proteína ajena
NVmyc	NV myc	Papel de NV
HA _{ISAV}	HA ISAV	Protección frente a ISAV
F5 _{ISAV}	F5 ISAV	Protección frente a ISAV
VP2 _{IPNV}	VP2 IPNV	Protección frente a IPNV
VP2 _{IBDV}	VP2 IBDV	Protección frente a IBDV

TABLA II

rIHNV	1º casete	2º casete	Objetivo
2C G _{VHSV} /LUC	G _{VHSV}	LUC	Protección frente a VHSV/Bioluminiscencia
2C VP2/LUC	VP2 _{IPNV}	LUC	Protección frente a IPNV/Bioluminiscencia
2CHA/LUC	HA ISAV	LUC	Protección frente a ISAV/Bioluminiscencia
2C HA/CAP-E3E2	HA ISAV	CAP-E3E2	Protección frente a SDV/ISAV
2C HA/E3E2-6KE1	HA ISAV	E3E2-6KE1	Protección frente a SDV/ISAV

5

TABLA III

rIHNV	1º casete	2º casete	3º casete	Objetivo
3C2 G _{VHSV} /HA/LUC	G _{VHSV}	VP2 IPNV	LUC	Protección frente a IHNV/VHSV/IPNV
3C G _{VHSV} /IL1β/LUC	G _{VHSV}	IL1β	LUC	Inmunoestimulación de IHNV/HSV
3C1 HA/F5/LUC	HA ISAV	F5 ISAV	LUC	Protección frente a IHNV/ISAV
3C3 HA/VP2/LUC	HA ISAV	VP2 IPNV	LUC	Protección frente a IHNV/ISAV, IPNV
3C20 HA/IL1β/LUC	HA ISAV	IL1 β	LUC	Inmunoestimulación y Protección frente a IHNV/ISAV.
3C14 HA/VP2/CAP-E3E2	HA ISAV	VP2 IPNV	CAP-E3E2	Protección frente a IHNV/ISAV/IPNV/SDV
3C15 HA/VP2/E3E2-6KE1	HA ISAV	VP2 IPNV	E3E2-6KE1	Protección frente a IHNV/ISAV/IPNV/SDV
3C10 HA/F5/CAP-E3E2	HA ISAV	F5 ISAV	CAP-E3E2	Protección frente a IHNV/ISAV/VHSV

(continuación)

Leyenda de las tablas

SDV: Virus de la Enfermedad del Sueño
 ISAV: Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón
 VHSV: Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral
 IBVD: Virus de la Bursitis Infecciosa
 IPNV: Virus de la necrosis pancreática infecciosa
 6KE1: gen de la glucoproteína E1 de SDV
 CAP: gen de la cápsida de SDV
 E3E2: gen de la glucoproteína E2 de SDV
 EGFP: Proteína verde fluorescente potenciada
 F5: gen F de ISAV
 G_{VHSV}: gen de glucoproteína G de VHSV
 HA: gen de HA de ISAV
 IL1 β : Interleucina 1 de la trucha arco iris
 LUC_{FF}: Luciferasa de luciérnaga LUC_{RR}: luciferasa de Renilla
 VP2: gen de VP2 de IPNV
 Δ G: supresión del gen G de IHNV

Ejemplo 2: multiplicación en cultivo celular de novirhabdovirus recombinantes que comprenden uno, dos o tres cistrones adicionales.

- 5 Las reservas virales de cada uno de los virus producidos están constituidas por pases sucesivos en cultivo de células (EPC) del sobrenadante tomado 7 días después de la transfección (sobrenadante PO). Las células se infectan con dilución 1/100 del sobrenadante clarificado. Después de 3 pases, se retiran los sobrenadantes cuando la capa de células se destruye por el efecto citopático del virus; esto sucede habitualmente de 3 a 6 días después de la infección. Las reservas virales se titulan después por dilución limitante.
- 10 La Figura 3 muestra ejemplos de título viral de diversos virus recombinantes en cultivo de células EPC. Aunque el título viral para todos los virus recombinantes está en el mismo intervalo (10^8 UFP/ml), los virus recombinantes que comprenden tres unidades de expresión adicionales tienen un crecimiento más lento en comparación con el virus de tipo silvestre. En general se tarda seis días en obtener un efecto citopático completo en células EPC en lugar de tres días para el IHNV de tipo silvestre.

15 Ejemplo 3: expresión de proteínas de interés en novirhabdovirus recombinantes de la invención

Se produjeron proteínas de interés usando los IHNV recombinantes enumerados en las Tablas I, II y III.

IHNV recombinante que expresa las proteínas estructurales del virus de la enfermedad del sueño

- 20 Se infectan células EPC con IHNV de tipo silvestre, IHNV-6KE1, IHNV-CapE3E2 o IHNV-E3E26KE1 a una MOI (multiplicación de infección) de 0,02 (0,02 UFP/célula). Las células se lisan 48 horas después de la infección, y los lisados se analizan por transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la glucoproteína E1 de SDV.

Los resultados se muestran en la Figura 4: Carril 1: IHNV-E3E26KE1; Carril 2: IHNV-CapE3E2; Carril 3: IHNV-6KE1; Carril 4: IHNV de tipo silvestre.

25 IHNV recombinante que expresa la glucoproteína hemaglutinina (HA) de virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV)

Se infectan células EPC con IHNV de tipo silvestre o IHNV-HA_{ISAV}, como se ha descrito anteriormente. Las células se lisan 2 días después de la infección, y los lisados se inmunoprecipitan con anticuerpo monoclonal anti-HA y se analizan por transferencia de Western usando un anticuerpo policlonal dirigido contra la glucoproteína HA de ISAV.

Los resultados se muestran en la Figura 5: Carril 1: IHNV de tipo silvestre; Carril 2: IHNV-ISAV HA.

30 IHNV recombinante que expresa la glucoproteína G del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) fusionada con una proteína indicadora

- 35 Se infectan células EPC, como se ha descrito anteriormente, con IHNV de tipo silvestre, IHNV-G_{VHSV}, IHNV-G_{VHSV}/LUC_{RR}, IHNVG_{VHSV}/EGFP, o con el sobrenadante de células EPC no infectadas (infectadas con simulación). Las células se lisan 2 días después de la infección, y los lisados se analizan por transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la glucoproteína G de VHSV.

Los resultados se muestran en la Figura 6: Carril 1: IHNV de tipo silvestre; Carril 2: IHNV-G_{VHSV}; Carril 3: IHNV-G_{VHSV}/LUC_{RR}; Carril 4: IHNV-G_{VHSV}/EGFP. Las bandas observadas son coherentes con el tamaño esperado para respectivamente glucoproteína G de VHSV y las proteínas de fusión G_{VHSV}/LUC_{RR} y G_{VHSV}/EGFP.

IHNV recombinante que expresa VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV)

- 5 Se infectan células EPC, como se ha descrito anteriormente, con IHNV-VP2_{IBDV} o con el IHNV de tipo silvestre. 24 horas después de la infección se detecta la expresión de VP2 IBDV usando ensayo de Inmunofluorescencia indirecta. Las células se fijan y se permeabilizan en un baño de -20 °C de metanol al 50 % y acetona al 50 % durante 15 minutos en un congelador. Las células fijadas se incuban después durante una hora con dilución 1:400 de un anticuerpo monoclonal dirigido contra VP2 IBDV. Después de una etapa de lavado las células se incuban durante 45 minutos con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (FITC). Después de una etapa de lavado para eliminar anticuerpos no unidos las células se examinan con respecto a tinción de fluoresceína con un microscopio óptico de UV y se fotografían con una cámara acoplada a ordenador (Nikon).

La Figura 7 muestra el marcaje específico de proteína VP2 en el citoplasma de células infectadas con IHNV-VP2_{IBDV}.

No puede detectarse fluorescencia en células infectadas por IHNV.

15 IHNV recombinante que expresa la proteína F de ISAV

Se infectan células EPC, como se ha descrito anteriormente con IHNV-F_{5ISA}. 36 horas después de la infección, las células se tratan para inmunofluorescencia indirecta como se ha descrito anteriormente usando un anticuerpo dirigido contra la proteína F de ISAV.

- 20 Los resultados mostrados en la Figura 8 demuestran la expresión de la proteína F de ISAV en células infectadas por IHNV-F_{5ISA}.

IHNV recombinante que expresa HA de ISAV y VP2 de IPNV

- 25 Se infectan células EPC, como se ha descrito anteriormente con IHNV-_{3C3} (HA/VP2/LUC). 36 horas después de la infección, las células se tratan como se ha descrito anteriormente usando un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína HA de ISAV y un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína VP2 de IPNV. El anticuerpo monoclonal primario se revela con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína (FITC) y el anticuerpo policlonal de conejo primario contra la proteína HA se revela con anticuerpo anti-conejo conjugado con TRITC.

Los resultados se muestran en la Figura 9: panel izquierdo: mAb anti VP2 de IPNV; panel derecho: Policlonal anti HA de ISAV.

- 30 Esta tinción de inmunofluorescencia doble muestra que las células infectadas por IHNV-_{3C3} expresan simultáneamente la HA de ISAV y la VP2 de IPNV.

Ejemplo 4: incorporación de una glucoproteína de membrana ajena en la partícula viral de ihnv recombinante.

Se infectan células EPC, como se ha descrito en el Ejemplo 3, con IHNV-F_{5ISA}, o se infectan con simulación.

- 35 3 días después de la infección, se recupera el sobrenadante sin células, y el virus recombinante se purifica de dicho sobrenadante usando un gradiente de sacarosa. El virus purificado se carga en un gel de SDS-PAGE. Las proteínas virales se analizan por transferencia de Western usando un anticuerpo policlonal dirigido contra la glucoproteína ISAV-F. Se usaron células infectadas con ISAV como un control positivo.

Los resultados se muestran en la Figura 10. Estos resultados demuestran que la proteína F de ISAV se incorpora en las partículas virales de IHNV recombinantes.

- 40 Se obtuvieron resultados similares cuando se realizaron análisis de incorporación con HA de ISAV y glucoproteína G de VHSV respectivamente en virus recombinantes IHNV-ISAV HA y IHNV-VHSV G purificados.

Ejemplo 5: incorporación de una proteína no de membrana ajena en la partícula viral de ihnv recombinante

La posibilidad de incorporar físicamente una proteína no de membrana en la partícula viral de IHNV se evalúa usando dos proteínas indicadoras no de membrana: la EGFP y la luciferasa de renilla.

- 45 Se construyen genes quiméricos que codifican una de las proteínas estructurales del virus IHNV (N, P, M, G) o la proteína NV no estructural, fusionada por su extremo C terminal con el extremo N terminal de la EGFP o de la luciferasa de renilla.

Se introdujo un sitio de enzima de restricción *SpeI* en ambos extremos de cada gen quimérico para permitir su inserción en el sitio de restricción *SpeI* único de las construcciones pIHNV LUC o la pIHNV EGFP.

Se obtuvieron las siguientes construcciones: pIHNV N-EGFP, pIHNV G-EGFP, pIHNV M-EGFP o pIHNV NV-EGFP, pIHNV N-LUC, pIHNV G-LUC, pIHNV P-LUC, pIHNV M-LUC o pIHNV NV-LUC.

Se obtienen IHNV recombinantes a partir de estas construcciones, como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior.

IHNV recombinante que expresa proteína N, G, M o NV en fusión con la parte N terminal de la EGFP

5 Se infectan células EPC con IHNV N-EGFP, IHNV G-EGFP, IHNV M-EGFP o IHNV NV-EGFP. 24 horas después de la infección, las células se examinan directamente con respecto a la expresión de las proteínas de fusión de EGFP usando un microscopio de exploración de láser confocal (CLSM).

10 Los resultados se muestran en la Figura 11: A: IHNV N-EGFP; B: IHNV G-EGFP; C: IHNV M-EGFP; D: IHNV NV-EGFP. La G-EGFP y la M-EGFP tienen localización de membrana de acuerdo con la localización esperada de las proteínas G y M, mientras que la NV-EGFP parece acumularse en el núcleo de las células infectadas y se descubre que la N-EGFP es citosólica.

IHNV recombinante que expresa la proteína N, G, M o NV en fusión con la parte N terminal de la Luciferasa

15 Se infectan células EPC con IHNV Luc, IHNV N-LUC, IHNV G-LUC, IHNV M-LUC o IHNV NV-LUC. 4 días después de la infección, se recupera el sobrenadante sin células, y el virus recombinante se purifica a partir de dicho sobrenadante usando un gradiente de sacarosa. La concentración de proteína total de cada virus purificado se midió usando un ensayo de unión a colorante colorimétrico (Bradford). Después se ensayó un microgramo de cada virus purificado con respecto a la actividad luciferasa para determinar qué proteína estructural es más adecuada para la incorporación de luciferasa en la partícula viral.

20 El resultado de la Figura 12 muestra que la fusión de una proteína no de membrana ajena (luciferasa en este caso) con la proteína N es la mejor estrategia para incorporar esta proteína en la partícula viral de IHNV.

Ejemplo 5: expresión de una proteína de interés en truchas vivas

25 Los peces se infectan por inmersión en baño con rIHNV LUC, de acuerdo con el siguiente protocolo: los peces jóvenes se sitúan en tanques de cría en un volumen pequeño de agua (3 litros de agua por cada 100 peces jóvenes, peso medio de 1 g). El rIHNV LUC se añade al agua del tanque a una concentración final de 5×10^4 UFP/ml (UFP = unidad formadora de placas). Después de incubación durante 2 horas, los tanques se llenan y se reestablece la circulación del agua.

A los 4 días después de la infección, los peces se sumergen en un baño que contiene un sustrato de luciferasa (Sustrato de Células Vivas EnduRen™, Promega) y se someten a captura de imágenes por CCD después de anestesiarse, para evaluar la actividad luciferasa.

30 Los resultados se muestran en la Figura 13.

A: i: peces infectados por rIHNV LUC, baño de sustrato de luciferasa; 1: peces infectados con simulación, sin baño de sustrato de luciferasa; 2: peces infectados con simulación, baño de sustrato de luciferasa; 3: peces infectados por rIHNV, baño de sustrato de luciferasa; 4: peces infectados por rIHNV LUC, sin baño de sustrato de luciferasa.

35 B: Imagen original de la luz producida por la oxidación de la luciferasa de renilla de su sustrato coelenterazina. La intensidad de la luz emitida se correlaciona directamente con el nivel de la expresión de luciferasa de renilla y con la replicación viral de IHNV-LUC en la trucha viva.

C: Señales de bioluminiscencia superpuestas sobre la imagen A.

40 **Ejemplo 6: patogenicidad de los novirhabdovirus recombinantes que comprenden uno o tres cistrones adicionales**

La patogenicidad de los novirhabdovirus obtenida como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior se evalúa por infecciones experimentales en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los virus ensayados son los siguientes:

- 45 rIHNV: wt
 rIHNV: 6K-E1 SDV
 rIHNV: E3-E2 SDV
 rIHNV: Cap-E3-E2 SDV
 rIHNV: E3-E2-6K-E1 SDV
 50 rIHNV: LUCRN
 rIHNV: G-VSHV
 rIHNV 3C1: HA/F5/LUCRN;
 rIHNV 3C20: HA/ILB/LUCRN;
 rIHNV 3C14: HA/VP2/Cap-E3-E2;

rIHNV 3C15: HA/VP2/E3-E26KE1

Truchas jóvenes son infectadas por baño con 5×10^4 UFP/ml de uno de estos virus, de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 5 anterior, y se controla la mortalidad.

5 Los resultados se muestran en la Figura 14.

Estos resultados muestran que la patogenicidad de los virus está ligada al número de cistrones adicionales. Aunque la presencia de un cistrón solamente induce en la mayoría de los casos una reducción ligera o moderada de la patogenicidad, la presencia de tres cistrones adicionales induce una atenuación drástica de la capacidad patógena.

Ejemplo 7: propiedades de vacuna en peces de los novirhabdovirus recombinantes de la invención

10 Para establecer si los virus recombinantes atenuados por la presencia de tres cistrones adicionales pueden usarse para preparar vacunas, se ensayó su capacidad para proteger peces jóvenes contra una exposición posterior al aislado viral de IHNV patógeno 32/87.

15 En un primer experimento, se exponen truchas jóvenes inmunizadas por baño con rIHNV 3C1, 3C20, 3C14 o 3C15, en las mismas condiciones que en los ensayos de patogenicidad descritos en el Ejemplo 6, a IHNV 32/87 bien por baño 46 días después, o bien por inyección intraperitoneal dos meses después. La mortalidad se controla durante un periodo de 58 días.

Exposición por baño:

46 días después de haber recibido IHNV 3C1, 3C20, 3C14 o 3C15, o nada los peces se infectan por baño con 10^5 ufp/ml de IHNV 32/87.

20 **Exposición por inyección:**

Dos meses después de haber recibido IHNV 3C1, o una inmunización de simulación, se exponen lotes de 20 truchas jóvenes con el recombinante candidato a vacuna por inyección intraperitoneal al aislado viral de IHNV patógeno 32/87 (10^6 ufp/pez).

Los resultados se muestran en la Figura 15.

25 En el caso de exposición por baño, el 100 % de las truchas expuestas inmunizadas con IHNV 3C1, 3C20, 3C14 o 3C15, y el 98 % de las inmunizadas por IHNV 3C20 sobreviven a la exposición, mientras que solamente el 20 % de las truchas inmunizadas con simulación sobreviven.

En el caso de la exposición por inyección, el 100 % de las truchas expuestas inmunizadas con IHNV 3C1 sobreviven, mientras que solamente el 6 % de las truchas inmunizadas con simulación sobreviven.

30 **Ejemplo 8: uso de sistema de ihnv recombinante como un vector de vacuna en especies de mamífero**

Replicación de IHNV recombinante en células cultivadas de diversas especies

35 Se infectan células EPC, así como células de diversas especies de vertebrados superiores (células epiteliales de pulmón humano A549; células de riñón porcino PK15; células de riñón de conejo RK13; fibroblastos de ratón 3T3; células de embrión de pollo del intestino CEV-I (ATCC CRL10495) con IHNV-LUC recombinante a alta multiplicidad de infección (5 UFP/célula). Las células se incuban a 14 y 28 °C durante tres días.

Al final del tiempo de incubación se mide la expresión de luciferasa usando un luminómetro y el sistema de Ensayo de luciferasa de Renilla (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los resultados se muestran en la Figura 16.

40 La intensidad de la luz, que se representa en el eje Y en Unidades de Luciferasa (ULR), es proporcional a la concentración de luciferasa en el lisado celular y por lo tanto a la replicación viral.

La luminiscencia detectada en las células no infectadas se corresponde con la luminiscencia de fondo provocada por la oxidación no enzimática del sustrato de Renilla coelenterazina.

45 Estos resultados muestran que se produce replicación significativa de IHNV-LUC recombinante en varias líneas celulares a 14 °C en comparación con la replicación en las células de peces EPC. Sin embargo, a 28 °C, las células ensayadas incluyendo las células EPC son incapaces de replicar el virus IHNV-LUC.

Administración de IHNV recombinante *in vivo* en ratones

Para ensayar la replicación de IHNV en mamíferos vivos, los ratones se inoculan con una gran cantidad de virus

IHNV-LUC recombinante (5×10^8 ufp/ratón).

28 días después de la inoculación, se comprueba la actividad luciferasa en los sueros de ratones. No se detecta actividad luciferasa, lo que confirma los resultados obtenidos en los cultivos celulares.

Por lo tanto, IHNV es de hecho un virus inactivado de forma natural en vertebrados superiores.

5 En un segundo experimento, se inoculan 15 ratones por vía intradérmica con el IHNV 3C1 recombinante (HA/F5/LUC) ($1 \mu\text{g}$ de virus purificado/ratón). 5 ratones de control reciben el tampón de TNE. Cuatro semanas después de la inoculación el suero de los ratones inoculados se ensayó con respecto a la presencia de respuesta de anticuerpo contra virus IHN de tipo silvestre usando ensayo de ELISA, con una placa revestida con virus IHN purificado.

10 15 de los 15 ratones inoculados con IHNV 3C1 recombinante, y ninguno de los 5 ratones en el grupo de control, tuvieron resultados seropositivos del ensayo para IHNV.

Además, el suero de uno de los ratones inoculados con IHNV 3C1 recombinante diluido a 1/500 se ensayó en transferencia de Western frente a un lisado de células infectadas con ISAV, un lisado de células infectadas con simulación, y un extracto proteico completo de IHNV-HA recombinante.

15 Como control, un anticuerpo policlonal dirigido contra la glucoproteína HA de ISAV diluida a 1/500 se ensayó en transferencia de Western contra los mismos antígenos.

Los resultados se muestran en la Figura 17.

A: Transferencia de Western con el anticuerpo policlonal dirigido contra la glucoproteína HA de ISAV;
B: Transferencia de Western con el suero de ratones inoculados con IHNV 3C1 recombinante.

20 Estos resultados muestran que el suero de los ratones inoculados contiene anticuerpos dirigidos contra diferentes proteínas de IHNV 3C1 y, en particular, contiene anticuerpos dirigidos contra la glucoproteína HA del virus ISA.

Por lo tanto, el sistema de IHNV ofrece la posibilidad de producir económicamente altos niveles de antígenos que se presentarán con seguridad en su forma nativa para vacunación de especies de mamífero contra diversos patógenos.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
HARMACHE, Abdallah
BREMONT, Michel

30 <120> NOVIRHABDOVIRUS RECOMBINANTES Y USOS DE LOS MISMOS.
<130> MJP/mad-F539/132-WO

<150> EP 290 982.5
<151> 16-06-2006

35 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

40 <210> 1
<211> 22
<212> ADN
<213> Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa

45 <400> 1
ccaagacaga aaaaaatggc ac 22

<210> 2
<211> 16
<212> ADN

50 <213> Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa

<400> 2
ccaagacaga aaaaaa 16

55 <210> 3
<211> 12

<212> ADN
 <213> Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
 <400> 3
 gcactttgt gc 12
 5
 <210> 4
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Consenso
 <400> 4
 15 vhhagayaga aaaaaa 16
 <210> 5
 <211> 12
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Consenso
 25 <400> 5
 gcacdwkwt gy 12
 <210> 6
 <211> 16
 30 <212> ADN
 <213> Virus de la septicemia hemorrágica viral
 <400> 6
 35 attagataga aaaaaa 16
 <210> 7
 <211> 12
 <212> ADN
 40 <213> Virus de la septicemia hemorrágica viral
 <400> 7
 gcacattgt gt 12
 <210> 8
 45 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Rhabdovirus de Hirame
 <400> 8
 50 atcagataga aaaaaa 16
 <210> 9
 <211> 16
 <212> ADN
 55 <213> Rhabdovirus de cabeza de serpiente
 <400> 9
 gaaagacaga aaaaaa 16
 60 <210> 10
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Rhabdovirus de cabeza de serpiente
 65 <400> 10
 gcacgagagt gc 12

ES 2 509 350 T3

<210> 11
<211> 70
<212> ADN
<213> Artificial

5
<220>
<223> Cebador

<400> 11
10 gggcgggccg ccaagacaga aaaaaatggc acttttgtgc actagtatga cttcgaaagt 60
ttatgatcca 70

<210> 12
<211> 40
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 12
gggcgggccg cccgggttat tgttcatttt tgagaactcg 40

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ADN recombinante que comprende:
 - a) una región que comprende una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación del gen M de novirhabdovirus, estando definida dicha región por la siguiente secuencia: VHHAGAYAGAAAAAAA (SEC ID N°: 4), en la que A, T, G, V, H e Y tienen su significado habitual en el código de nucleótidos de IUPAC;
 - b) una región que comprende una secuencia de inicio de la transcripción del gen G de novirhabdovirus, definiéndose dicha región por la siguiente secuencia: GCACDWKWTGY (SEC ID N°: 5), en la que A, T, G, C, D, W, K e Y tienen su significado habitual en el código de nucleótidos de IUPAC; en la que dicha región a) está seguida o dicha región b) está precedida por un dinucleótido intergénico no transgénico de un novirhabdovirus,
 - c) una región que comprende una fase abierta de lectura que codifica una proteína de interés; en la que las regiones a), b) y c) se disponen en un orden seleccionado del grupo que consiste en: a-b-c y b-c-a.
2. Un ADNc antigenómico del genoma de un novirhabdovirus, **caracterizado porque** contiene una o más construcciones de ADN recombinantes de la reivindicación 1, insertada en una parte de dicho ADNc comprendida entre el codón de parada de una primera ORF endógena y el codón de inicio de una segunda ORF endógena del novirhabdovirus huésped.
3. Un ADNc antigenómico de la reivindicación 2, que contiene dos construcciones de la reivindicación 1.
4. Un ADNc antigenómico de la reivindicación 2, que contiene tres construcciones de la reivindicación 1.
5. Un novirhabdovirus recombinante que contiene un ARN genómico complementario de un ADNc antigenómico de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4.
6. Un novirhabdovirus recombinante que contiene un ARN genómico complementario de un ADNc antigenómico de la reivindicación 4.
7. Un novirhabdovirus recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, que es un IHNV recombinante.
8. El uso de un novirhabdovirus recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para producir proteínas de interés en células de peces en cultivo.
9. Un novirhabdovirus recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 para uso como una vacuna atenuada viva.
10. Un novirhabdovirus recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para uso como un sistema de administración de antígeno para la vacunación de aves o mamíferos.
11. El uso de un IHNV o VHSV recombinante que comprende una construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, que codifica una proteína antigénica de interés, para expresar dicha proteína *in vitro* en un sistema de expresión de baja temperatura.
12. Un sistema de expresión *in vitro* de baja temperatura, **caracterizado porque** dicho sistema de expresión comprende un IHNV o VHSV recombinante que comprende al menos una construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, que codifica una proteína antigénica de interés y una célula de vertebrado susceptible de infección por dicho virus recombinante y capaz de crecer a baja temperatura.
13. Un procedimiento para expresar *in vitro* una proteína antigénica de interés, comprendiendo dicho procedimiento: infectar una célula de vertebrado susceptible de infección por IHNV o VHSV y capaz de crecer a baja temperatura con un IHNV o VHSV recombinante que comprende al menos una construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, que codifica una proteína antigénica de interés;
 - cultivar dicha célula a una temperatura de aproximadamente 14 °C a aproximadamente 20 °C; recuperar la proteína antigénica de interés producida por dicha célula.

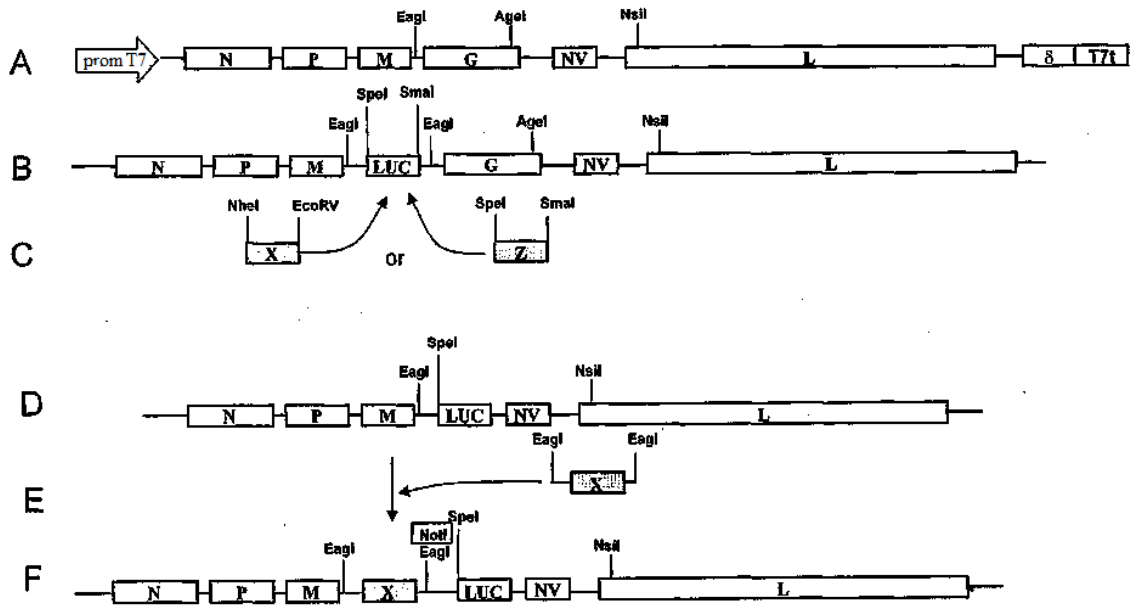


Figura 1

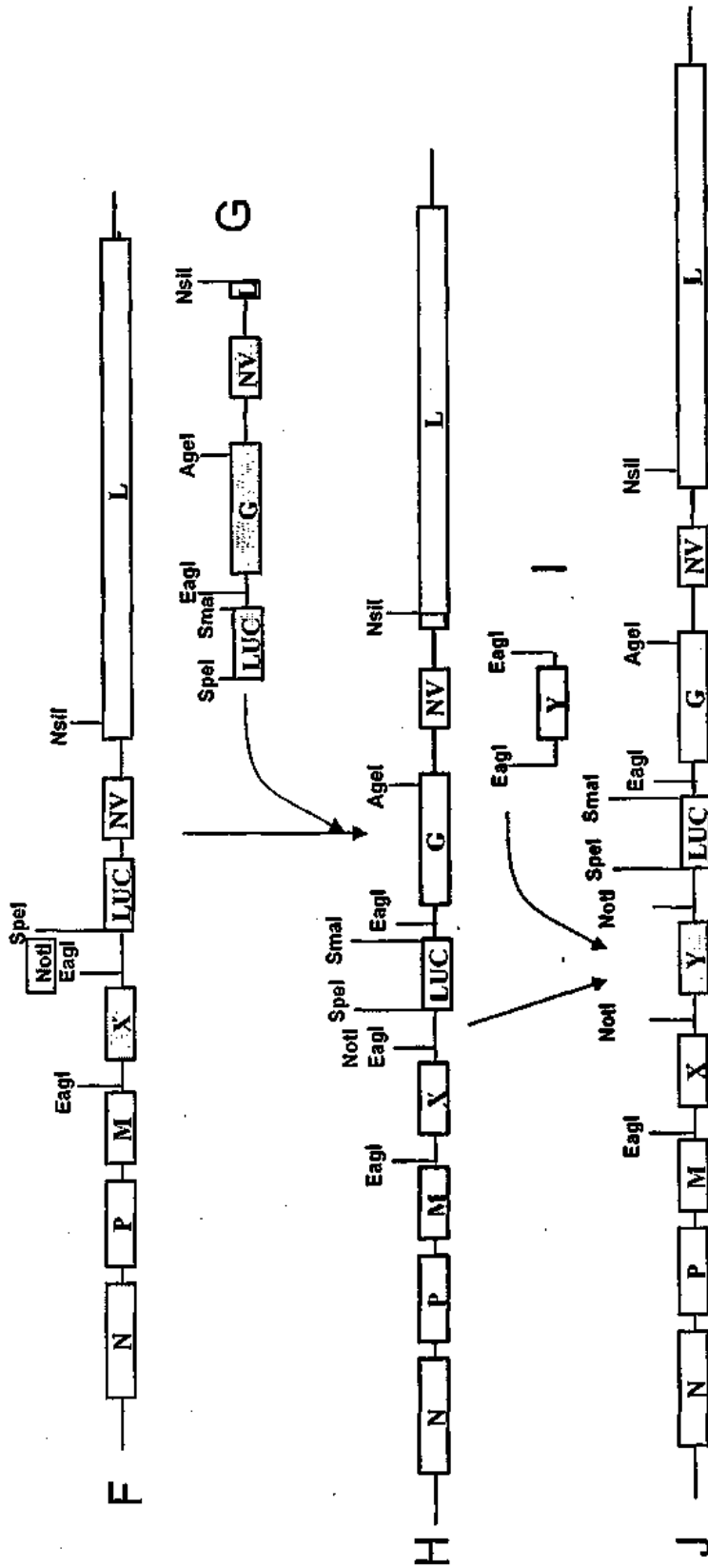


Figura 1 (continuación)

Secuencia del IHNV de tipo silvestre



Casete adicional

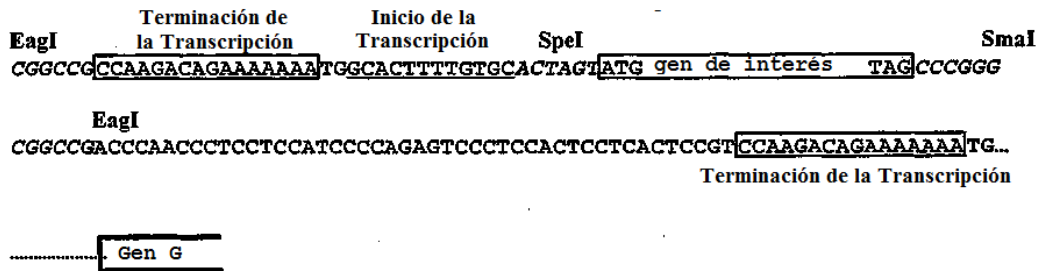


Figura 2

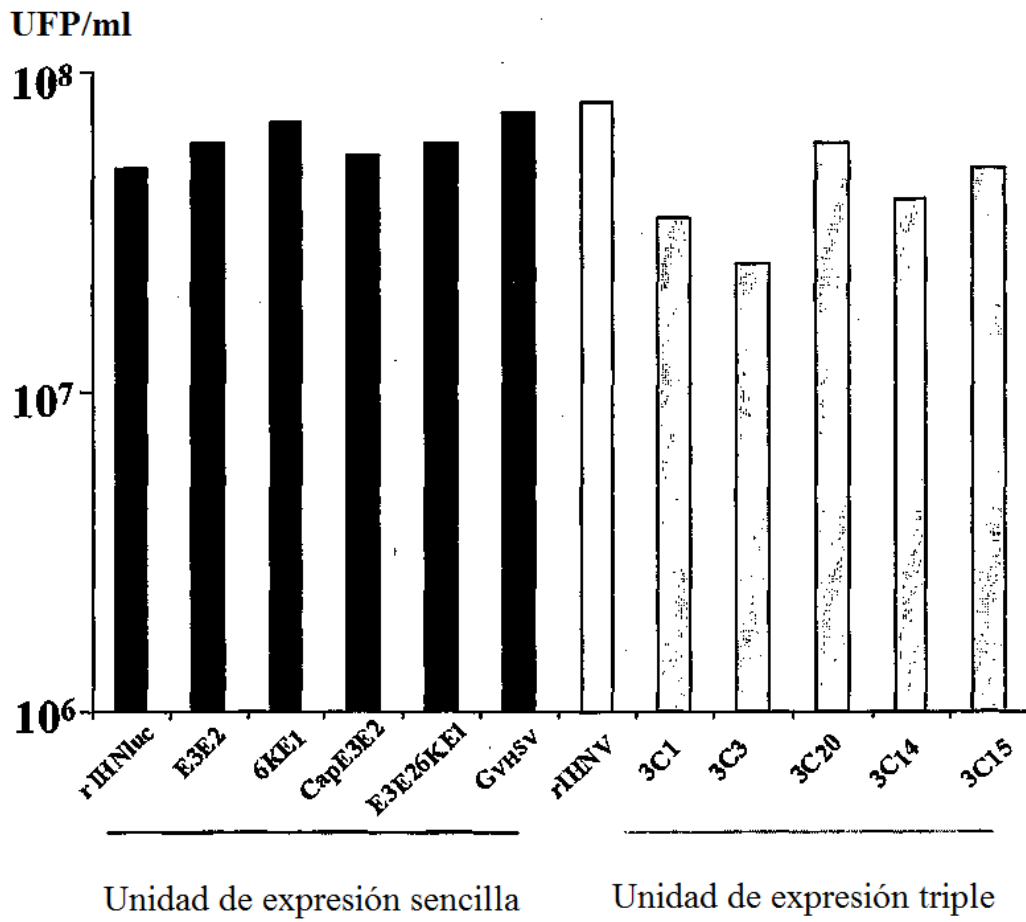


Figura 3

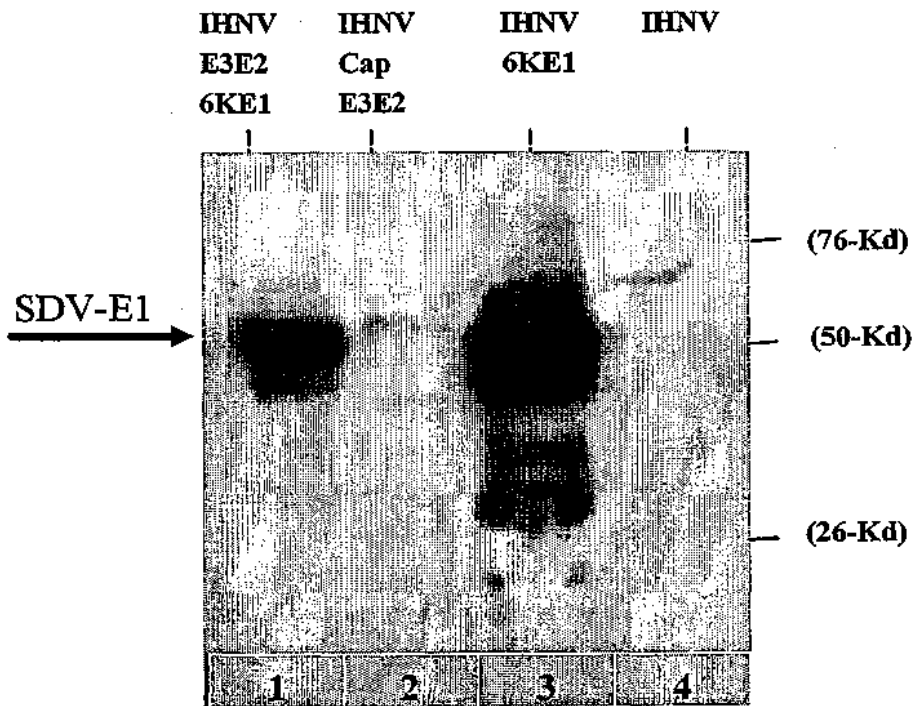


Figura 4

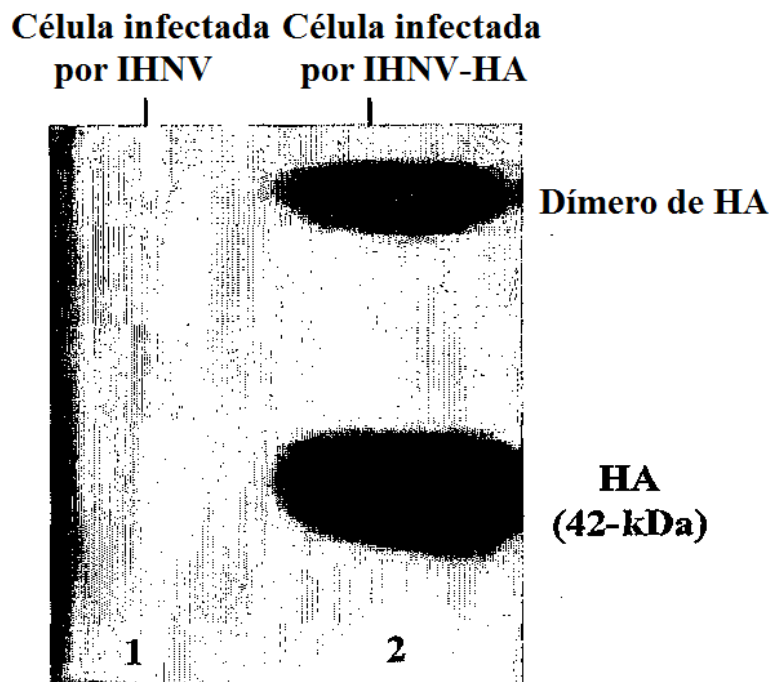


Figura 5

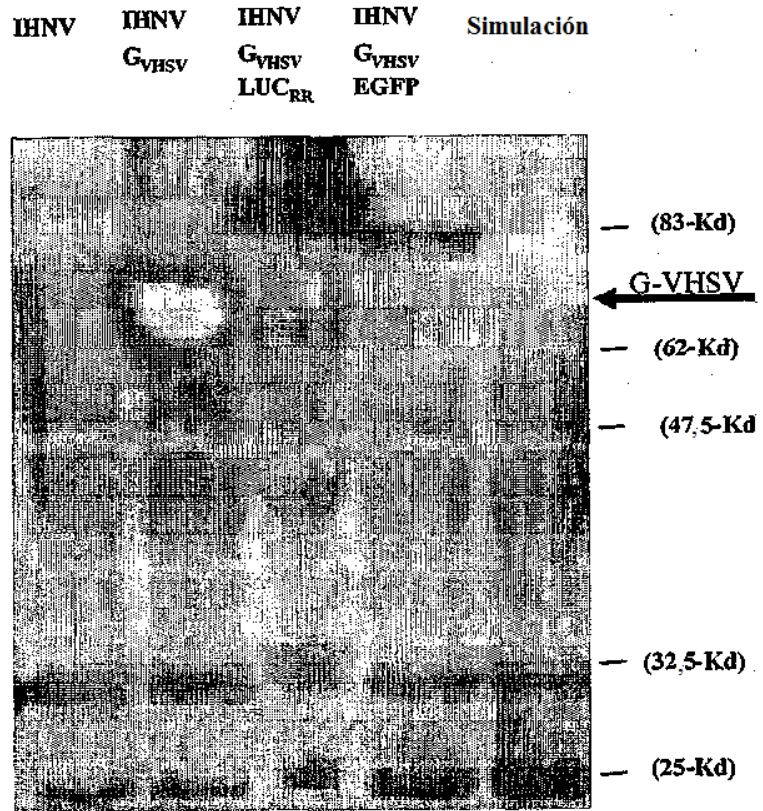


Figura 6



Figura 7

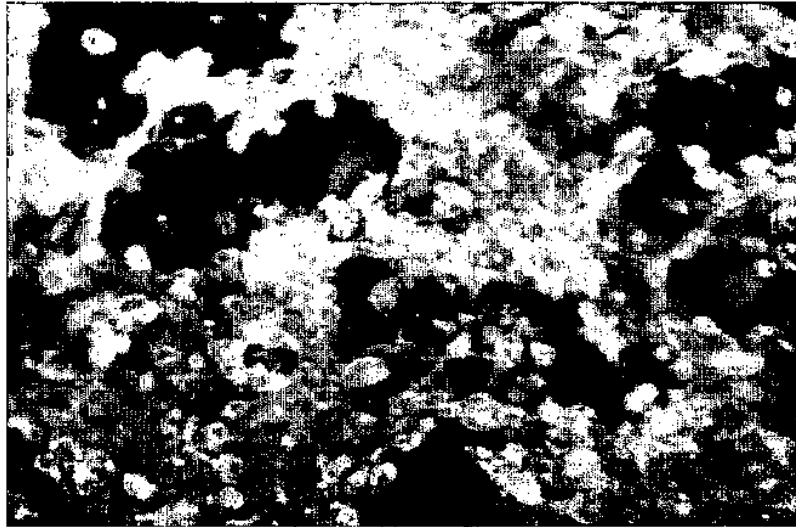
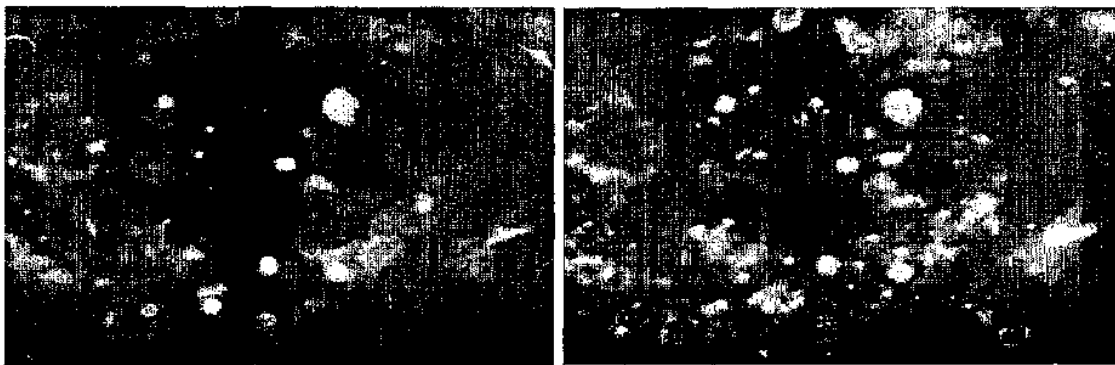


Figura 8



Anti IPNV VP2

Anti ISAV HA

Figura 9

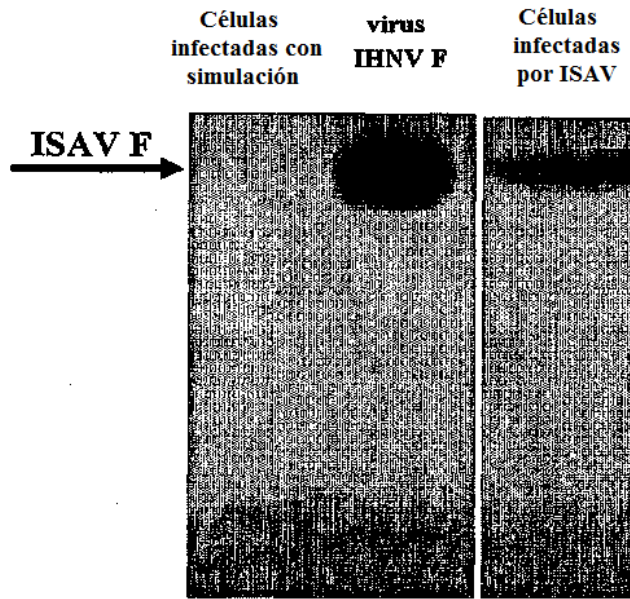


Figura 10

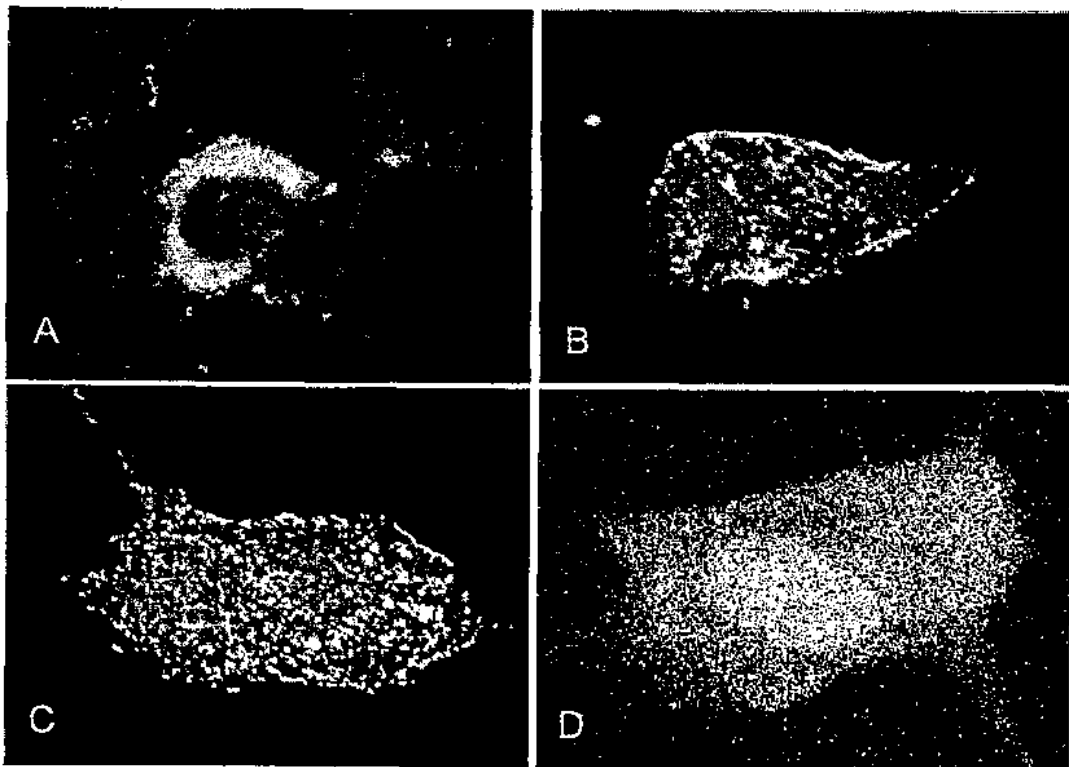


Figura 11

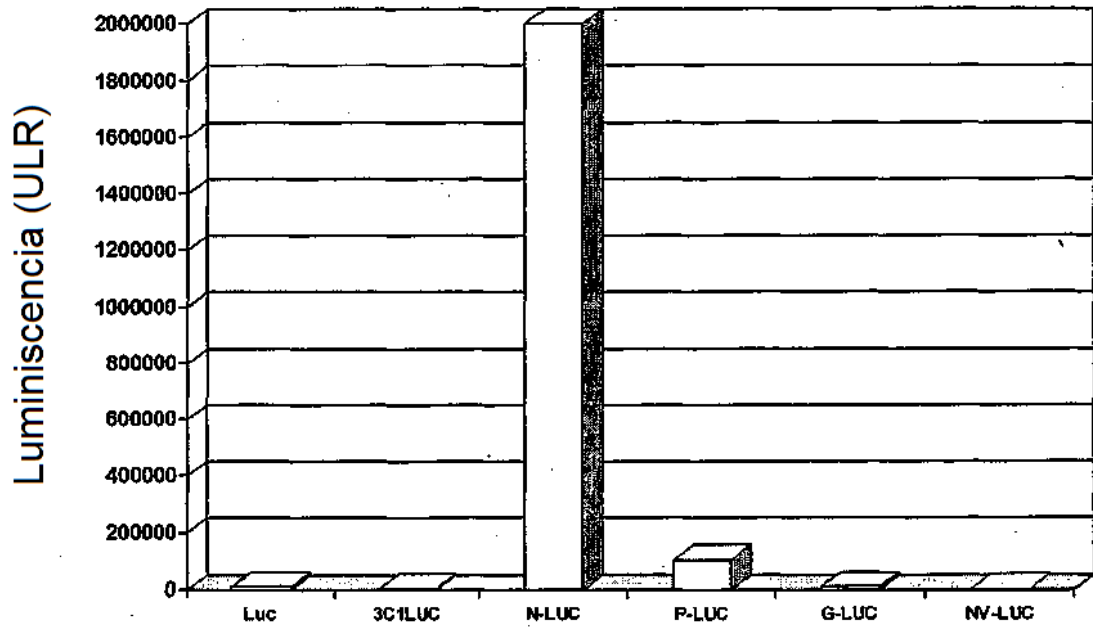


Figura 12



Figura 13

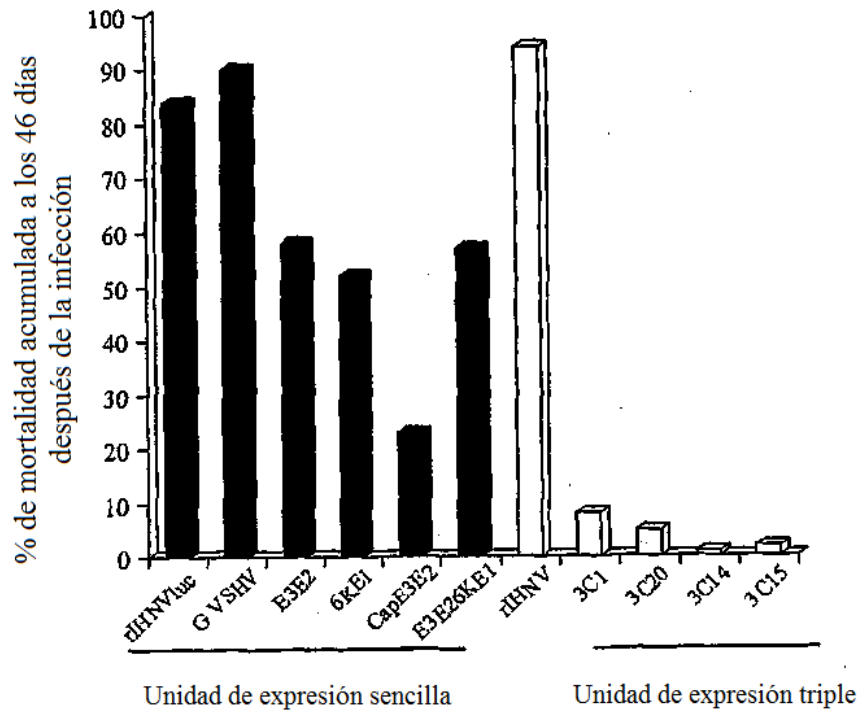


Figura 14

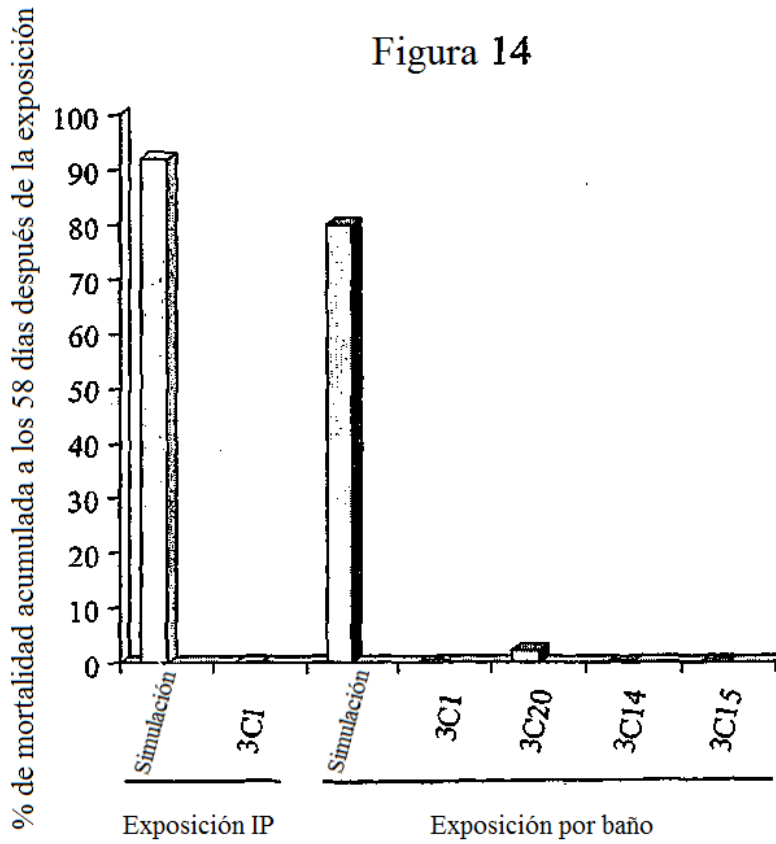


Figura 15

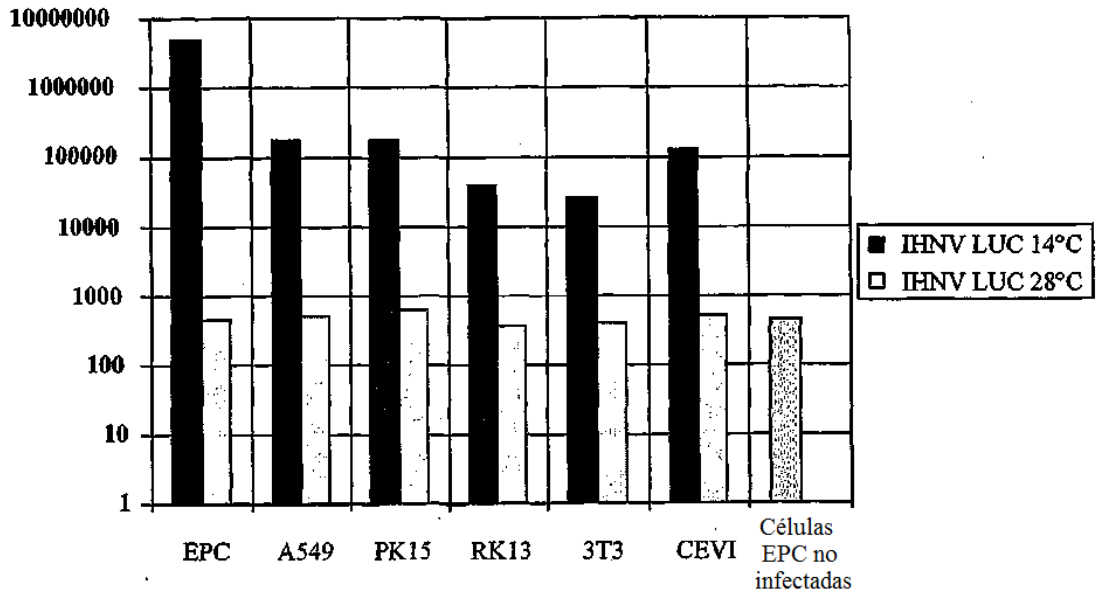


Figura 16

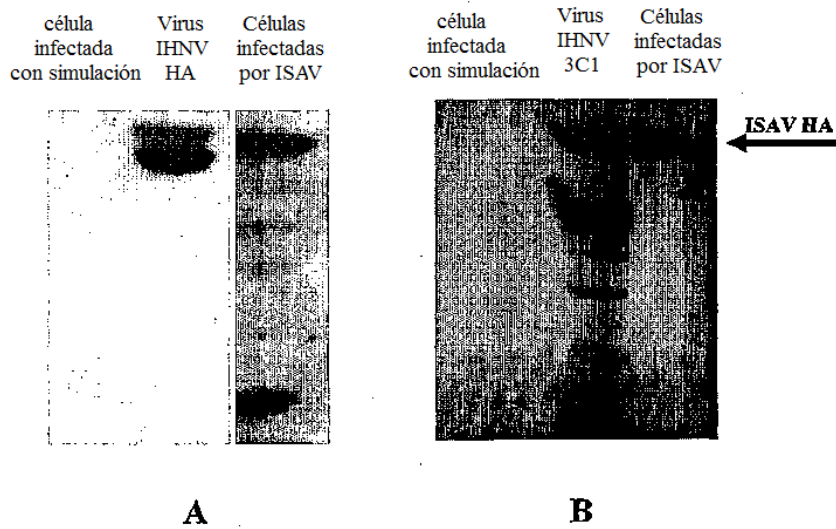


Figura 17