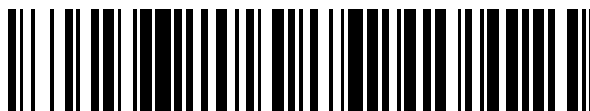


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 073**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2012** **PCT/NO2012/050040**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012** **WO12078051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2012** **E 12725287 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017** **EP 2686011**

54 Título: **Vacuna contra la IPN**

30 Prioridad:

16.03.2011 NO 20110402
02.05.2011 NO 20110650

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2017

73 Titular/es:

BENCHMARK ANIMAL HEALTH LIMITED (100.0%)
Benchmark House 8 Smithy Wood Drive
SheffieldS35 1QN, GB

72 Inventor/es:

EVENSEN, ØYSTEIN;
RITCHIE, GORDON;
JØSSUND, TRUDE BAKKE y
MUTOLOKI, STEPHEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 073 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra la IPN

Campo de la invención

5 La presente invención versa sobre un virus avirulento vivo de la necrosis pancreática infecciosa que en estudios biológicos se ha demostrado que es genéticamente estable. Los peces expuestos a dicho virus resultan positivos al virus sin mostrar ningún signo de enfermedad, y también se ha demostrado que el virus avirulento protege a los peces contra la IPN durante un lapso prolongado después de su administración. Así, también forman parte de la presente invención dicho virus y una vacuna que comprende dicho virus para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de la necrosis pancreática infecciosa.

10 **Antecedentes de la invención**

La necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad viral económicamente significativa de los peces salmónidos en el mundo entero. La enfermedad fue descrita por vez primera en truchas de agua dulce en Norteamérica en la década de 1950 y ha sido documentada en Europa desde comienzos de la década de 1970. Inicialmente, se consideraba que la IPN era una grave enfermedad que afectaba a los alevines y las crías desarrolladas de la trucha arcoíris. Sin embargo, cuando empezó a expandirse la industria de la salmicultura en la década de 1970, también aumentó la incidencia de la enfermedad de la IPN en los salmones, con el resultado de que la IPN es ahora generalizada en la industria de la salmicultura en el mundo entero. La pérdida económica debida a la enfermedad es grande, y pueden producirse brotes en las crías de salmón atlántico en agua dulce y en esguines que han dejado de serlo tras ser transferidos a agua salada.

20 El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es el causante de la IPN y es un miembro del género *Aquabirnavirus*, familia *Birnaviridae*. Los birnavirus acuáticos tienen una amplia gama de anfitriones, infectando a muchas especies de peces. Aparte de los salmónidos, han sido aislados de peces que pertenecen a más de 32 familias diferentes, a 11 especies de moluscos y a cuatro familias de crustáceos.

25 El genoma del IPNV consiste en dos segmentos de ARN bicatenario que están rodeados por una cápside icosaédrica de envoltura única de 60 nm de diámetro. El segmento genómico A (normalmente 3097 nucleótidos) codifica una poliproteína precursora de 106 kDa compuesta de pVP2-VP4-VP3, en ese orden, y una proteína VP5 no estructural de 15 kDa, encontrada solo en células infectadas. El segmento B (normalmente 2777 nucleótidos) codifica un polipéptido interno menor VP1 (94 kDa), que es la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) asociada al virión.

30 La mayor parte de los birnavirus acuáticos, independientemente del anfitrión o de la ubicación geográfica, están antigenéticamente desarrollados y pertenecen a un único serogrupo A. El serogrupo A ha sido dividido en nueve serotipos: A1-A9. El serotipo A1 contiene la mayor parte de los aislados procedentes de Estados Unidos; los serotipos A2 a A5 son fundamentalmente aislados europeos, y los serotipos A6 a A9 se dan en Canadá. El serogrupo B comprende un serotipo aislado de moluscos.

35 Dentro de los diversos serotipos/genogrupos, hay un grado elevado de variabilidad antigénica y diferencias en la virulencia y la patogenicidad entre las cepas. La virulencia del IPNV ha estado asociada con el segmento A y, en particular, con la proteína estructural VP2.

40 La VP2 es una proteína capsídica fundamental (Figura 4) y es responsable de la producción de anticuerpos monoclonales específicos al tipo en anfitriones que han sido infectados con el virus. Se ha emitido la hipótesis de que las variaciones en los residuos aminoácidos de esta proteína puedan estar asociadas con cambios en la virulencia. De hecho, con una comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos de diversos aislados naturales que presentan mortalidad diferente en alevines de salmón atlántico, se han propuesto los motivos putativos implicados en la virulencia de las cepas del IPNV sp.

45 Normalmente, las cepas virulentas tienen residuos de treonina, alanina, treonina/alanina y tirosina/histidina en las posiciones 217, 221, 247 y 500 de la secuencia VP2. Estudios adicionales han demostrado que los aislados virulentos poseen residuos Thr₂₁₇ y Ala₂₂₁; las cepas con virulencia de moderada a baja tienen Pro₂₁₇ y Ala₂₂₁; y las cepas que contienen Thr₂₂₁ son casi siempre avirulentas, con independencia del residuo de la posición 217.

50 Desde hace tiempo, la inmunización activa de gallinas usando vacunas a base de virus avirulentos viene siendo el estándar industrial para proteger a los pollos contra una enfermedad inmunosupresora causada por el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV). Este virus es un birnavirus, como el IPNV, pero una diferencia importante entre el IBDV y el IPNV es que casi todos los peces que sobreviven a una infección de IPN se convierten en portadores a largo plazo del virus. El estado de portador de IPNV no tiene ningún impacto negativo directo en los individuos afectados. En peces persistentemente infectados, el virus se encuentra asociado con leucocitos en la sangre, el riñón cefálico y el bazo, presumiblemente en macrófagos. Los peces portadores desprendían virus en sus heces; sin embargo, los títulos fluctúan en el tiempo y es sabido que aumentan en periodos de estrés.

Los virus ARN, tales como el IPNV y el IBDV, son propensos a cambiar a través de diversos mecanismos; por ello, se ha supuesto que siempre hay riesgo de que el virus revierta en mayor virulencia durante su multiplicación en los peces vacunados. Tal estrategia requeriría vigilancia en la monitorización de virus naturales y de la historia natural de la enfermedad. Hasta la fecha, el desconocimiento de los factores que influyen en la virulencia y la estabilidad genética del IPNV ha impedido el uso de cepas avirulentas para fines de vacuna.

Una alternativa al uso de vacunas a base del IPNV avirulento vivo es el de vacunas de virus inactivados. Las vacunas de virus muertos se preparan cultivando virus en grandes cantidades en cultivos celulares. Luego, el virus es recolectado e inactivado con formol u otros agentes similares en condiciones que garanticen la retención de la actividad inmunogénica de los antígenos protectores y que en la vacuna no quede ningún virus virulento. Las actuales estrategias para una vacuna inactivada son costosas, requieren mucha mano de obra y están sujetas al riesgo de la presencia de virus no inactivados. La vacunación con virus inactivados ha sido probada en truchas arcoíris, administrado por vía oral, inmersión e inyección. La protección contra la prueba de provocación se obtuvo únicamente mediante inyección. Sin embargo, la inyección de gran número de alevines no resulta práctica en una situación de criadero.

Otra opción es usar vacunas subunitarias que estén compuestas de una parte de la partícula vírica responsable de inducir inmunidad protectora. Según se ha divulgado anteriormente, la VP2 es una proteína capsídica fundamental del IPNV y es responsable de la producción de anticuerpos monoclonales específicos al tipo. Esto hace de esta proteína particular una candidata muy interesante para ser usada en una vacuna subunitaria. De hecho, la vacunación de esguines en ciernes con VP2 recombinante (rVP2) incluida en una vacuna inyectable multivalente comercial con adyuvante de aceite/glucano dio como resultado la protección de los peces contra la IPN en brotes naturales en comparación con peces vacunados con la misma vacuna sino el componente del IPN. Esta vacuna recombinante contra el IPNV en esguines de salmón atlántico que han dejado de serlo ha sido autorizada para su uso comercial en Noruega. Sin embargo, aunque los peces más viejos pueden ser vacunados mediante inyección intraperitoneal, esta vía de administración no es una opción en alevines debido a su pequeño tamaño.

Algunos productores también han sugerido infectar a todos los pintos de salmón con IPNV de manera deliberada como forma de autovacunación de los supervivientes, pero se ha descubierto que, aparte de las implicaciones legales y de bienestar de tal estrategia, esto meramente transferiría las pérdidas de la fase de agua salada a dulce. Esta es claramente la situación cuando se considera la autovacunación con una cepa virulenta.

Según parece por el anterior resumen del estado de la técnica, hay una necesidad industrial de mejores medios de control de la infección del IPNV en peces, que no sean tóxicos para los peces y puedan ser administrados de manera industrialmente conveniente y que protejan a los peces durante un lapso prolongado después de su administración. Tal mejora proporcionada por la invención es el tratamiento de los peces para curar o impedir la infección de IPNV administrando, preferentemente por inmersión, un IPNV avirulento vivo que sea genéticamente estable, en el sentido de que no revierta en virulencia. Tal virus avirulento no ha sido usado anteriormente, ya que hasta la fecha no se ha considerado que sea una estrategia aceptable debido al riesgo de la que cepa avirulenta revierta en virulencia.

El documento WO99/50419 describe un sistema para la generación de virus vivos no patógenos de necrosis pancreática infecciosa (IPNV) usando transcritos sintéticos derivados de ADN clonado.

Orpetveit *et al.*, "Molecular epidemiology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Norway" (XP007921040), describen un estudio sobre la variación genética del IPNV y factores asociados de riesgo para brotes de la enfermedad.

Compendio de la invención

La presente invención es dada a conocer en las reivindicaciones adjuntas.

Un **primer aspecto** de la presente invención versa sobre un IPNV avirulento vivo que no revierte en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV; comprendiendo dicho virus un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 madura o una proteína VP2 precursora que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85% con la SEQ ID NO. 1, en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 252, 281, 282 y 319 de la proteína son Asn, Ser, Asp y Glu respectivamente.

Una realización versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C, hace que los alevines sean positivos al virus, medidos por el aislamiento en las células RTG-2.

Una realización versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C, proporciona a los alevines protección contra la enfermedad de la IPN en comparación con los alevines no infectados.

Una realización versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C, hace que los alevines no desarrollen ningún signo de la enfermedad de la IPN.

5 En una realización preferente, dicho IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 en la que el aminoácido en la posición 252 de la proteína VP2 no es Val.

En una realización preferente, dicho IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2, en la que el aminoácido en la posición 252 de la proteína VP2 se selecciona del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; se selecciona preferentemente del grupo constituido por Asn y Gln; y lo más preferible es que el residuo aminoácido en la posición 252 sea Asn.

10 Se describe un IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 1-442 de la SEQIDNO1, con la condición de que el residuo aminoácido en la posición 252 de la proteína se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; se seleccione preferentemente del grupo constituido por Asn y Gln; y lo más preferible es que el residuo aminoácido en la posición 252 sea Asn.

En una realización preferente, los residuos aminoácidos en las posiciones 281, 282 y 319 de la proteína no son Thr, Asn ni Ala, respectivamente.

En una realización preferente, los residuos aminoácidos en las posiciones 281, 282 y 319 de la proteína son Ser, Asp y Glu, respectivamente.

20 En una realización preferente, el residuo aminoácido en la posición 221 de la proteína es Thr.

En una realización preferente, el residuo aminoácido en la posición 217 de la proteína es Pro.

En una realización preferente, dicha proteína hace que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

25 En una realización particularmente preferente, el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención es el designado IPNV-G700 (depositado como ECACC-Nº 11 041201), o cepas estrechamente relacionadas del mismo, siendo dichas cepas estrechamente relacionadas cualquier cepa que comparta características genotípicas y/o fenotípicas similares con la cepa depositada.

30 Una realización preferente versa sobre el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C,

- hace que los alevines sean positivos al virus, medidos por el reaislamiento en las células RTG-2;
- hace que los alevines sean negativos al virus, medidos por inmunohistoquímica;
- proporciona a los alevines protección contra la enfermedad de la IPN en comparación con los alevines no infectados; y

35 – hace que los alevines no desarrollen ningún signo de la enfermedad de la IPN.

Un **segundo aspecto** de la presente invención versa sobre una vacuna que comprende el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención.

Un **tercer aspecto** de la presente invención versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención para ser usado como vacuna en la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de la IPN.

40 Un **cuarto aspecto** de la presente invención versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención o sobre una vacuna según el segundo aspecto de la presente invención para ser usados como vacuna en la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de la IPN en alevines.

45 Un **quinto aspecto** de la presente invención versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención o sobre una vacuna según el segundo aspecto de la presente invención para ser usados como vacuna en la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad de la IPN en los que la distribución es por inmersión o administración oral.

Las realizaciones preferentes de la presente invención están expuestas en las reivindicaciones dependientes y en la descripción detallada de la invención.

Descripción de las figuras

Ahora se ilustrarán con más detalle realizaciones preferentes de la presente invención con referencia a las figuras adjuntas.

- 5 La **Figura 1** ilustra la mortalidad acumulativa de alevines inmunizados/no inmunizados sometidos/no sometidos a una prueba de provocación con una cepa virulenta V-1244.

Eje Y

Porcentaje de alevines muertos en cada muestra (mortalidad acumulativa).

Eje X

Grupo	Preparación de la muestra
A	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 4 del experimento; sometidos a una prueba de provocación con la cepa virulenta V-1244 en el día 14 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
B	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 4 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
C	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 8 del experimento; sometidos a una prueba de provocación con la cepa virulenta V-1244 en el día 14 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
D	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 8 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
E	Alevines no inmunizados; sometidos a una prueba de provocación con la cepa virulenta V-1244 en el día 14 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
F	Alevines no inmunizados; muestreo en el día 28 del experimento
G	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 14 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento

- 10 La **Figura 2** ilustra la mortalidad acumulativa of alevines inmunizados/no inmunizados sometidos/no sometidos a una prueba de provocación con una cepa virulenta V-1244.

Eje Y

Porcentaje de alevines muertos en cada muestra (mortalidad acumulativa).

Eje X

Grupo	Preparación de la muestra
—	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 4 del experimento; sometidos a una prueba de provocación con la cepa virulenta V-1244 en el día 14 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
—◆—	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 4 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
—■—	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 8 del experimento; sometidos a una prueba de provocación con la cepa virulenta V-1244 en el día 14 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 8 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento
—×—	Alevines no inmunizados; sometidos a una prueba de provocación con la cepa virulenta V-1244 en el día 14 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento

Grupo	Preparación de la muestra
—*—	Alevines no inmunizados; muestreo en el día 28 del experimento
—●—	Alevines inmunizados con la cepa avirulenta G700 en el día 14 del experimento; muestreo en el día 28 del experimento

La **Figura 3** ilustra el número total de alevines que sobrevivieron después de ser sometidos/no sometidos a una prueba de provocación con la cepa avirulenta G700.

Eje Y

- 5 Número total (porcentaje) de alevines que sobrevivieron después de ser sometidos/no sometidos a una prueba de provocación con la cepa avirulenta G700.

Eje X

1 = control no sometido a una prueba de provocación

2 = sometido a una prueba de provocación con la cepa avirulenta G700

- 10 1-3 = representan datos de tres experimentos diferentes ejecutados en paralelo

La **Figura 4** ilustra el IPNV y la localización de VP1, VP2 y VP3.

La **Figura 5** ilustra la composición de aminoácidos en las posiciones 217 y 221 de una proteína VP2 aislada de una cepa avirulenta creada por genética inversa que ha revertido en virulencia seis meses después de la infección de los alevines. En la posición 217 hay una composición mixta de aminoácidos que dan un aminoácido Pro o Thr. Combinados con la posición 221 hay representantes de ProThr y ThrAla en el acervo de cuasiespecies.

La **Figura 6a-b** ilustra secuencias alineadas de residuos aminoácidos representados como filas dentro de una matriz. Los residuos aminoácidos 1-508 y 1-442 representan la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 precursora y la proteína VP2 madura respectivamente. La secuencia de IPNV-VP2 PTA representa la secuencia VP2 de un virus avirulento que en el Ejemplo 3 se ha demostrado que revierte en un virus virulento después de pasajes seriados en alevines (inestable). La secuencia G700 representa la secuencia VP2 de un virus avirulento (depositado como ECACC-Nº 11 041201 que, en el ejemplo 2, se ha demostrado que no revierte en un virus virulento después de pasajes seriados en alevines (estable). La secuencia NVI-015-TA está incluida como ejemplo de referencia y representa la secuencia VP2 de un virus virulento. Los huecos en la fila de identidad indican posiciones de residuos aminoácidos no idénticos. En la Figura 7a se muestran símbolos de una y tres letras para los aminoácidos.

La **Figura 7a** muestra símbolos de una y tres letras para los aminoácidos.

La **Figura 7b** muestra el código genético estándar.

Descripción detallada de la invención

Una vacuna ideal para el IPNV debe inducir una protección duradera a una edad temprana, evitar la formación de portadores virulentos y ser eficaz contra un gran número de serotipos del IPNV. No puede usarse una inyección para peces pequeños; por lo tanto, las vías más preferentes para la vacunación temprana son la administración oral o la inmersión.

Anteriormente se ha supuesto que estos atributos de una vacuna ideal contra el IPNV deben ser satisfechos ya sea por una vacuna subunitaria recombinante o por una vacuna viral inactivada, ya que una vacuna avirulenta viva podría potencialmente llevar a la formación de portadores virulentos y a la enfermedad en caso de que el virus avirulento revierta en un virus virulento.

Pese al prejuicio técnico preponderante dentro de la especialidad, los inventores de la presente invención han identificado sorprendentemente una cepa de IPNV avirulento que induce una protección duradera a edad temprana, induce una protección duradera a una edad temprana, impide la formación de portadores virulentos, es eficaz contra gran número de serotipos de IPNV y puede ser administrada mediante administración oral o mediante inmersión, preferentemente lo último.

El sorprendente descubrimiento fue resultado de un proyecto en el que se hizo un seguimiento de dos emplazamientos de acuicultura de agua dulce en todo el ciclo de producción. Los emplazamientos elegidos bien tenían un historial de problemas de IPN recurrente en todo el ciclo de producción, o bien muy pocos problemas de IPN aunque los peces se mezclaran con el grupo con problemas de IPN de peces en el mar. Se hizo un seguimiento

de los peces continuamente desde el desove hasta la recolección mediante muestreos frecuentes y aislamiento del IPNV.

Cuando fue aislado, el IPNV fue sometido a secuenciación para una caracterización detallada a nivel genómico. Los resultados demostraron que ambas categorías de emplazamientos albergaban virus de IPN, pero de genotipos diferentes. El emplazamiento con una historia de problemas recurrentes de IPN tenía una cepa virulenta, mientras que el emplazamiento con pocos problemas de IPN tenía una cepa avirulenta, denominándose a dicha cepa avirulenta del presente documento cepa G700 (depositada como ECACC-N° 11 041201). Curiosamente, los peces infectados con la cepa G700 parecían estar protegidos de desarrollar IPN cuando se mezclaban con peces que portaban la cepa virulenta. Estos hallazgos revelaron un potencial para esta cepa natural como una vacuna avirulenta viva contra la IPN.

Para caracterizar adicionalmente el virus, se propagaron disoluciones seriadas de la cepa G700 en células CHSE-214 con gel de agarosa (SeaPlaque) como soporte sólido (Ejemplo 2). Tres placas fueron identificadas, recolectadas, purificadas y clonadas. Dos de estas fueron sometidas a caracterización adicional secuenciando el gen VP2. Los resultados obtenidos muestran que la secuencia VP2 de ambos clones era un 100% idéntica, tanto a escala de nucleótidos como de aminoácidos y también era idéntico a la cepa G700 original.

En la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:3 presentan, respectivamente, las secuencias de ADN y ARN del gen VP2 de G700; y las secuencias de aminoácidos de la precursora G700 y la proteína VP2 madura están representadas, respectivamente, por los residuos aminoácidos 1-508 y 1-442 de la SEQ ID NO:1. Como se verá, ambos clones tenían un Pro₂₁₇Thr₂₂₁ en el motivo de virulencia, coherente con los aislados avirulentos.

Para verificar que la cepa G700 es avirulenta y genéticamente estable es estudios biológicos, alevines de salmón atlántico que se sabe que son susceptibles al IPNV fueron expuestos a la cepa G700 en una concentración de 2×10^5 TCID₅₀/ml (Ejemplo 2). El virus fue sometido a pasaje tres veces antes del muestreo. Después del muestreo, algunos alevines fueron sometidos a estrés y luego observados durante 28 días más antes del muestreo final. Las mortalidades fueron registradas a diario. Como puede verse en la Figura 3, no hubo diferencia significativa entre mortalidades en el grupo sometido a prueba de provocación y el de control y no se observó ninguna diferencia estadística entre los grupos, ni siquiera después de someterlos a estrés. Histológicamente, no se observó ninguna lesión patológica en órganos internos, incluyendo el páncreas, de los alevines antes o después del estrés (datos no mostrados), lo que confirma que la cepa G700 es, de hecho, una cepa avirulenta.

Las secuencias VP2 de los virus reaislados fueron un 100% idénticas a las del aislado original (G700) al inicio y al fin del estudio, lo que indica que esta variante tiene una elevada estabilidad genética, incluso después de pasajes seriados en alevines. En cambio, se ha hallado que las cepas avirulentas Pro₂₁₇Ala₂₂₁Ala₂₄₇ y avirulentas Pro₂₁₇Thr₂₂₁Ala₂₄₇ creadas por genética inversa reversionan en variantes virulentas en una sola tanda de infección de alevines de salmón atlántico, haciendo así que las variantes creadas por genética inversa sean inadecuadas para una vacuna avirulenta viva.

En función de los hallazgos obtenidos para la cepa G700, se inició un proyecto centrado en identificar los residuos aminoácidos responsables de la estabilidad genética de la cepa avirulenta.

Comparando residuos aminoácidos diferentes del motivo de virulencia (véanse las Figuras 6a-b), se halló con sorpresa que, aunque las cepas avirulentas inestables (que reversionan fácilmente en variantes virulentas) tienen todas un residuo Val en la posición 252 de la proteína VP2, la cepa G700 tiene un residuo Asn en esa posición. Además, cada una de las cepas avirulentas inestables, y todas ellas, tienen un residuo Thr en la posición 281 de la proteína VP2 mientras que la cepa G700 tiene un residuo Ser en esta posición. Se halló que, aunque todas las cepas avirulentas inestables tienen un residuo Asn en la posición 282 y un residuo Ala en la posición 319 de la proteína VP2, la cepa G700 tiene un residuo Asp en la posición 282 y un residuo Glu en la posición 319 (véanse los Ejemplos 2 y 3).

En resumen, los anteriores hallazgos demuestran que la cepa G700 es estable y no reversiona en virulencia después de 3 pasajes en anfitriones susceptibles. También se ha identificado el motivo de estabilidad del virus IPN y consiste en los residuos 252, 281, 282 y 319, de los cuales Asn₂₅₂Ser₂₈₁Asp₂₈₂Glu₃₁₉ está asociado con la estabilidad genética (Ejemplo 2), mientras que Val₂₅₂Thr₂₈₁Asn₂₈₂Ala₃₁₉ está asociado con la inestabilidad (Ejemplo 3).

Se inició un estudio adicional para verificar el efecto protector de la cepa G700 en alevines de salmón atlántico (*Salmo salar* L.). Además, se examinó la virulencia de la cepa natural monitorizando la mortalidad de los alevines vacunados (expuestos a la cepa G700), pero no sometidos a prueba de provocación en la etapa de su desarrollo en que son más susceptibles a la IPN, para confirmar que no causan brotes clínicos de IPN (Ejemplo 1).

Cuatro días después de la alimentación inicial, un grupo de peces fue inmunizado mediante inmersión con una dosis de 2×10^5 TCID₅₀/ml de la cepa G700. Un segundo grupo fue vacunado con la misma dosis cuatro días después (8 días) tras la alimentación inicial. Ambos grupos vacunados, así como un grupo de control no vacunado, fueron sometidos a una prueba de provocación en el día 14 desde la alimentación inicial, mediante provocación por baño a

una dosis de 2×10^5 TCID₅₀/ml de una cepa virulenta. Para examinar la mortalidad como consecuencia de la inmunización usando la cepa G700, se dejó un tanque de cada grupo sin someterlo a prueba de provocación.

5 Se llevó a cabo un muestreo antes de la vacunación para garantizar que todos los peces estaban libres de IPN al inicio del estudio. El segundo muestreo se realizó a los 14 días de la alimentación inicial, inmediatamente antes del sometimiento a la prueba de provocación, para establecer si se había desarrollado el estado de portador en los peces vacunados. El muestreo se repitió dos y cuatro semanas después del sometimiento a la prueba de provocación. La mortalidad fue registrada a diario.

10 Los alevines inmunizados con la cepa G700 fueron infectados y siguieron estándolo en todo el transcurso del estudio. Según observaciones clínicas y de laboratorio (usando histología), los peces no mostraron ningún signo de enfermedad antes de su sometimiento a la prueba de provocación.

El grupo de inmunización 1 tenía una protección ligeramente mejor contra la provocación que el grupo de inmunización 2, confirmada por la tasa de mortalidad y la histología. La diferencia en mortalidad acumulativa fue de aproximadamente 1,5% entre los grupos 1 y 2, con correspondientes valores de supervivencia porcentual relativa (RPS) de 88 y 82, respectivamente, lo que confirma un nivel elevado de protección.

15 Los resultados de histología del muestreo 14 días después del sometimiento a la prueba de provocación del grupo 1 mostraron 1 pez con presentación patológica de un total de 6. En el grupo 2, cinco de cada 6 peces tuvieron cambios histopatológicos. Estos resultados sugieren que cuanto antes se efectúe la inmunización después de la alimentación inicial de los alevines, mejor será la protección.

20 Los grupos no vacunados, sometidos a una prueba de provocación con la cepa virulenta tuvieron una mortalidad acumulativa de más del 33% como promedio. Se confirmó mediante inmunohistoquímica (datos no mostrados) la presencia del virus en órganos internos y que los peces murieron de IPN.

En conclusión, la cepa viral usada como vacuna (la cepa G700) es claramente avirulenta, dado que los grupos inmunizados que no fueron sometidos a prueba de provocación tenían una mortalidad muy baja (mortalidad acumulativa inferior al 1,5%) y no tenían ningún signo de enfermedad por histología/inmunoquímica.

25 Así, un **primer aspecto** de la presente invención versa sobre un virus avirulento vivo de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) que, preferentemente, no revierte en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

Según se usa en la presente memoria, el término “vivo” aplicado a virus se refiere a un virus que mantiene la capacidad de infectar a un anfitrión apropiado (en contraposición de vacunas inactivadas o subunitarias).

30 Según se usa en la presente memoria, se entiende que el término “avirulento” aplicado a virus significa que una cepa viral que ha perdido sustancialmente, preferentemente perdido por completo, su capacidad de causar una enfermedad en peces infectados con la cepa, aunque su capacidad de invadir los peces —es decir, de penetrar en los peces por la vía usual del virus— y de reproducirse en el cuerpo de los peces permanezca sustancialmente intacta.

35 El término “infeccioso” aplicado a virus indica que el virus tiene la capacidad de reproducirse. El virus puede ser patógeno o no patógeno y seguir siendo infeccioso.

El término “virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)” se refiere al agente causativo de la IPN y es miembro del género *Aquabirnavirus*, familia *Birnaviridae*.

40 En la presente memoria, el término “virulento” aplicado a virus indica que el virus es patógeno, lo que significa que el virus causa enfermedad a su anfitrión.

La expresión “revertir en un virus virulento” aplicado a virus avirulentos se refiere al proceso en el que un virus avirulento revierte en un virus patógeno (lo que significa que los virus causan una enfermedad a su anfitrión) mediante procesos que se producen de forma natural (habitualmente una mutación en las posiciones 217 y/o 221 de la proteína VP2).

45 Preferentemente, dicho virus no revierte en un virus virulento después de 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 50 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV. Más preferentemente, dicho virus no revierte en un virus virulento después de al menos 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 50 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV. Lo más preferible es que dicho virus no revierta en un virus virulento. En una realización según el primer aspecto de la presente invención, el anfitrión es el alevín de salmón atlántico (*Salmo salar* L.),
50 preferentemente de la variedad AquaGen.

Si el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C, hace que los alevines sean positivos al virus, medidos por el reaislamiento en las células RTG-2. Sin embargo, los

alevines resultaron negativos al virus cuando fueron medidos por inmunohistoquímica, lo que sugiere que el virus está presente en los alevines únicamente a niveles subclínicos.

El término "TCID₅₀" usado en la presente memoria se refiere a la cantidad de virus requerida para producir un efecto citopático en el 50% de las células de cultivos tisulares inoculados. La infección viral en las células es compleja y da como resultado muchos cambios en la célula anfitriona, denominados colectivamente efecto citopático (ECP). Tales cambios incluyen forma alterada, desprendimiento del sustrato, lisis, fusión de membranas, permeabilidad alterada de las membranas, cuerpos de inclusión y apoptosis. El método usado para determinar el valor TCID₅₀ es muy conocido para un experto en la técnica (Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche, Kärber G., vol. 162, 1931).

Aunque el virus estaba presente en los alevines solo a niveles subclínicos, se ha demostrado que el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención proporcionaba a los alevines protección contra la enfermedad de la IPN, en particular en comparación con los alevines que no han sido expuestos al IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención.

Además, si el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C, hace que los alevines no desarrollen ningún signo de la enfermedad de la IPN; en particular, no se ha observado (histológicamente) ninguna lesión patológica en los órganos internos, incluyendo el páncreas de los alevines.

Según se ha dado a conocer anteriormente, normalmente el IPNV tiene dos proteínas estructurales que forman la cápside del IPNV. La proteína viral 2 (VP2) del IPNV es una de estas dos proteínas estructurales, y se ha demostrado que es responsable de la producción de anticuerpos monoclonales específicos al tipo. Anteriormente se ha sugerido que la secuencia de la proteína VP2 decide si el virus es virulento o avirulento, y, en este último caso, ahora se ha demostrado que ciertos aminoácidos de la proteína VP2 son determinantes importantes de si el virus avirulento puede revertir en un virus virulento.

En consecuencia, en una realización según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína estructural madura (por ejemplo, la VP2 madura), o una precursora de la misma (por ejemplo, la VP2 precursora), haciendo preferentemente dicha proteína estructural que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

La expresión "ácido nucleico" usado en la presente memoria se refiere a un ácido ribonucleico (ARN) o un ácido desoxirribonucleico (ADN), preferentemente ARN.

La expresión "proteína estructural", aplicada a virus, se refiere a una proteína viral que es un componente estructural (normalmente un componente capsídico) del virus maduro.

La expresión "proteína precursora" usada en la presente memoria se refiere a una proteína que es modificada de forma posterior y/o coetánea con la traducción a su forma madura (por ejemplo, VP2 precursora → VP2 madura).

Dicha proteína estructural madura es preferentemente una de las dos proteínas estructurales que forman la cápside del IPNV; más preferentemente la proteína forma la parte más externa de la cápside del IPNV. En una realización preferente, dicha proteína estructural madura es la proteína que es responsable de la producción de anticuerpos monoclonales específicos al tipo en anfitriones que han sido infectados con el virus. En la realización más preferente, dicha proteína estructural es la proteína VP2.

Además, según se ha expuesto con anterioridad, se halló con sorpresa que, aunque todas las cepas avirulentas inestables tienen un residuo Val en la posición 252 de la proteína VP2, la cepa G700 tiene un residuo Asn en esa posición.

En consecuencia, en una realización según el primer aspecto de la presente invención, dicho virus comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2, en la que el aminoácido en la posición 252 de la proteína VP2 no es Val.

En otra realización según el primer aspecto de la presente invención, dicho virus comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2, seleccionándose el residuo aminoácido en la posición 252 de la proteína VP2 del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; seleccionándose preferentemente del grupo constituido por Asn y Gln; y siendo lo más preferible que el residuo aminoácido en la posición 252 sea Asn.

Además, cada una de las cepas avirulentas inestables, y todas ellas, tiene un residuo Thr en la posición 281 de la proteína VP2, mientras que la cepa G700 tiene un residuo Ser en esta posición.

Así, otra realización preferente según la presente invención versa sobre un IPNV avirulento vivo que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 madura y/o una VP2 precursora, haciendo preferentemente dicha

proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV; seleccionándose el aminoácido en la posición 281 de la proteína VP2 madura y/o la VP2 precursora del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; seleccionándose preferentemente del grupo constituido por Ser y Cys; y siendo lo más preferible que el aminoácido de la posición 281 sea un residuo Ser.

- 5 En una realización según el primer aspecto de la presente invención, dicho virus comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2, en la que el aminoácido en la posición 281 de la proteína VP2 no es Thr.

También se halló que, aunque todas las cepas avirulentas inestables tienen un residuo Asn en la posición 282 y un residuo Ala en la posición 319 de la proteína VP2, la cepa G700 tiene un residuo Asp en la posición 282 y un residuo Glu en la posición 319.

- 10 En consecuencia, otra realización preferente según la presente invención versa sobre un IPNV avirulento vivo que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 madura y/o una VP2 precursora, haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV; seleccionándose el aminoácido en la posición 282 de la proteína VP2 madura y/o la VP2 precursora del grupo constituido por Gln, Asp y Glu; siendo lo más preferible que el aminoácido de la posición 282 de la proteína VP2 madura y/o la VP2 precursora sea un residuo Asp.

En una realización según el primer aspecto de la presente invención, dicho virus comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2, en la que el aminoácido en la posición 282 de la proteína VP2 no es Asn.

- 20 Otra realización preferente según la presente invención versa sobre un IPNV avirulento vivo que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 madura y/o una VP2 precursora, haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV; seleccionándose el aminoácido en la posición 319 de la proteína VP2 madura y/o la VP2 precursora del grupo constituido por Glu y Asp; siendo lo más preferible que el aminoácido de la posición 319 de la proteína VP2 madura y/o la VP2 precursora sea un residuo Glu.

- 25 En una realización según el primer aspecto de la presente invención, dicho virus comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2, en la que el aminoácido en la posición 319 de la proteína VP2 no es Ala.

- 30 Una realización particularmente preferente versa sobre un IPNV avirulento vivo que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 madura y/o una VP2 precursora, haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV; en la que dicha proteína VP2 madura y/o dicha VP2 precursora tiene un residuo Pro en la posición 217, un residuo Thr en la posición 221, un residuo Asn en la posición 252, un residuo Ser en la posición 281, un residuo Asp en la posición 282 y un residuo Glu en la posición 319.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP2 precursora y madura de G700 están representadas, respectivamente, por los residuos aminoácidos 1-508 y 1-442 de la SEQ ID NO:1.

- 35 En consecuencia, en una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 252-282 de la SEQ ID NO:1;

- preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o
- 40 – preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o
- 45 – preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

- 50 La expresión "identidad de secuencia" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos de igual longitud o entre dos secuencias de nucleótidos de igual longitud. Las dos secuencias que han de compararse deben alinearse con el mejor ajuste posible con los huecos de inserción o, alternativamente, con los truncamientos en los extremos de las secuencias proteínicas. La identidad de secuencia puede calcularse como

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$$

, siendo N_{dif} el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias, cuando están alineadas, y siendo N_{ref} el número de residuos en una de las secuencias. Un hueco se cuenta como una no identidad del residuo o los residuos específicos. Alternativamente, la identidad de secuencia puede ser calculada por el programa BLAST; por ejemplo, el programa BLASTP (Pearson y Lipman 1988) (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST).

En una realización de la invención, el alineamiento se lleva a cabo con el método de alineamiento de secuencias ClustalW, con los parámetros por defecto descritos por Thompson J., et al 1994, disponibles en <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>.

En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 252-319 de la SEQIDNO1;

– preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 200-319 de la SEQIDNO1;

– preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o

– preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 150-319 de la SEQIDNO1;

– preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o

- preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o
- 5 – preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

10 haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 100-319 de la SEQIDNO1;

- 15 – preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o
- 20 – preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

25 haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 100-350 de la SEQIDNO1;

- 30 – preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o
- 35 – preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp; más preferentemente Glu; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o
- 40 – preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

45 En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 50-350 de la SEQIDNO1;

- preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o
- 5 – preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o
- 10 – preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

- En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 que comprende una secuencia de aminoácidos que
- 15 tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 50-400 de la SEQIDNO1;
- preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o
 - preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o
 - 20 – preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o
 - preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible; y/o
 - 25 – preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o
 - preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

- En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que
- 30 tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 1-442 de la SEQIDNO 1;
- preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o
 - 35 – preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o
 - preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o
 - preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible; y/o
 - 40 – preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o
 - preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

- 45 En una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que

tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 1-508 de la SEQIDNO 1;

- preferentemente con la condición de que el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o
- 5 – preferentemente con la condición de que el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y/o
- 10 – preferentemente con la condición de que el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 217 sea Pro; y/o
- preferentemente con la condición de que el residuo 221 sea Thr;

haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.

- 15 En una realización preferente según el primer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo comprende un ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 1-442 de la SEQIDNO 1 o la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 1-508 de la SEQIDNO1; con la condición de que:
- 20 – el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys, siendo Asn lo más preferible;
- el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys, siendo Ser lo más preferible;
- el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu, siendo Asp lo más preferible; y
- 25 – el residuo 221 sea Thr.

Además, se prefiere que al aminoácido en la posición 252 no sea valina.

Como se ha expuesto previamente, las cepas de virulencia moderada a baja tienen Pro₂₁₇ y Ala₂₂₁ en la proteína VP2 madura; y las cepas que contienen Thr₂₂₁ son casi siempre avirulentas, con independencia del residuo de la posición 217.

- 30 En consecuencia, una realización según el primer aspecto de la presente invención versa sobre un virus avirulento vivo de la necrosis pancreática infecciosa; comprendiendo dicho virus un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 precursora y/o una VP2 madura; haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV; teniendo preferentemente dicha proteína VP2 precursora y/o dicha proteína VP2 madura un residuo Pro en la posición 217
- 35 y/o un residuo Thr en la posición 221, más preferentemente al menos un residuo Thr en la posición 221.

En una realización, el aminoácido en la posición 217 de la proteína VP2 madura y/o de la proteína VP2 precursora no es un residuo Thr y/o el aminoácido en la posición 221 de la proteína VP2 madura y/o la VP2 precursora no es un residuo Ala.

- 40 En una realización preferente según la presente invención, dicha proteína VP2 madura y/o dicha proteína VP2 precursora comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80% con la identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por los residuos 200-319 de la SEQIDNO1; los residuos 150-319 de la SEQIDNO1; los residuos 100-319 de la SEQIDNO1; los residuos 100-350 de la SEQIDNO1; los residuos 50-300 de la SEQIDNO1; los residuos 50-350 de la SEQIDNO1; los residuos 50-400 de la SEQIDNO1; los residuos 1-442 de la SEQIDNO1; o los residuos 1-508 de la SEQIDNO1,

- 45 preferentemente con la condición de que:
- el residuo 252 se seleccione del grupo constituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Asn o Gln, y siendo Asn lo más preferible; y/o
- el residuo 281 se seleccione del grupo constituido por Ser, Asn, Gln, Tyr y Cys; más preferentemente Ser o Cys, y siendo Ser lo más preferible; y/o

- el residuo 282 se seleccione del grupo constituido por Gln, Asp y Glu; más preferentemente Asp; y/o
 - el residuo 319 se seleccione entre Glu y Asp, siendo Glu lo más preferible; y/o
 - el residuo 217 sea Pro; y/o
 - el residuo 221 sea Thr;
- 5 haciendo preferentemente dicha proteína que el virus avirulento no revierta en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV.
- En una realización preferente, dicha identidad de secuencia se selecciona del grupo constituido por una identidad de secuencia de al menos el 85%, una identidad de secuencia de al menos el 90%, una identidad de secuencia de al menos el 95% y una % identidad de secuencia del 100.
- 10 En una realización particularmente preferente, dicha proteína VP2 madura y/o dicha proteína VP2 precursora comprenden una secuencia de aminoácidos representada por el residuo 1-442 de la SEQIDNO1.
- En otra realización particularmente preferente, dicha proteína VP2 madura consiste en una secuencia de aminoácidos representada por el residuo 1-442 de la SEQIDNO1 y dicha proteína VP2 precursora consiste en una secuencia de aminoácidos representada por el residuo 1-508 de la SEQIDNO1.
- 15 La secuencia de aminoácidos de la VP2 precursora y la VP2 madura de la cepa G700 está representada, respectivamente, por los residuos aminoácidos 1-508 y 1-442 de la SEQ ID NO:1; y proporciona una referencia conveniente para la numeración de los aminoácidos usados en la presente memoria. Se cree que los expertos en la técnica identificarán inmediatamente las posiciones correspondientes en otras proteínas VP2 precursoras y VP2 maduras.
- 20 Según se ha expuesto anteriormente, el segmento genómico A del IPNV codifica una poliproteína precursora de 106 kDa compuesta de pVP2-VP4-VP3 en ese orden. Cuando se hace referencia a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína, debería entenderse que también se pretende que esté incluida una molécula de ácido nucleico que codifique una poliproteína, siendo dicha proteína parte de la poliproteína.
- 25 En caso de que el ácido nucleico codifique la proteína en forma de una poliproteína, se prefiere que el virus también comprenda medios para separar la poliproteína en proteínas separadas. Así, en una realización según la presente invención, el virus IPNV comprende, además, un ácido nucleico que codifica una NS-proteasa; por ejemplo, un ácido nucleico que codifique la proteína VP4. Opcionalmente, en el anfitrión pueden estar presentes los medios para separar la poliproteína en las proteínas separadas.
- 30 Además, en caso de que el ácido nucleico codifique una proteína precursora (por ejemplo, pVP2), se prefiere que el virus también comprenda medios para transformar la precursora en su forma madura (por ejemplo, mVP2). Opcionalmente, los medios para transformar la precursora en su forma madura pueden estar presentes en el anfitrión.
- 35 Una realización particularmente preferente según el primer aspecto de la presente invención versa sobre la cepa G700 (IPNV-G700) depositada con el nº de acceso ECACC 11 041201, o cepas estrechamente relacionadas de la misma. Con “cepas estrechamente relacionadas” queremos decir cualquier cepa que comparta características genotípicas y/o fenotípicas similares a la cepa depositada. En particular, esta frase abarca formas ligeramente modificadas del virus que retienen sustancialmente las mismas actividades funcionales. Así, por ejemplo, algunas adiciones, deleciones o alteraciones aminoácidos o nucleótidos tienen muy poco efecto, en caso de que lo tengan, en las actividades funcionales del virus.
- 40 La realización más preferente según el primer aspecto de la presente invención versa sobre la cepa G700 (IPNV-G700), depositada con el nº de acceso ECACC 11 041201.
- Otra realización particularmente preferente versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C,
- 45
- hace que los alevines sean positivos al virus, medidos por reaislamiento en las células RTG-2;
 - hace que los alevines sean negativos al virus, medidos por inmunohistoquímica;
 - proporciona a los alevines protección contra la enfermedad de la IPN, preferiblemente en comparación con alevines no infectados; y
 - hace que los alevines no desarrollen ningún signo de la enfermedad de la IPN.

Otra realización particularmente preferente versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C,

— hace que los alevines sean positivos al virus, medidos por reaislamiento en las células RTG-2;

5 — hace que los alevines sean negativos al virus, medidos por inmunohistoquímica;

— proporciona a los alevines protección contra la enfermedad de la IPN, preferiblemente en comparación con alevines que no han sido expuestos al IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención; y

— hace que los alevines no desarrollen ningún signo de la enfermedad de la IPN.

10 Según se ha expuesto con anterioridad, los peces infectados con la cepa G700 parecían estar protegidos de desarrollar la enfermedad de la IPN cuando se mezclan con peces que portan una cepa virulenta. Estos hallazgos revelaron un potencial para esta cepa natural como vacuna avirulenta viva contra la IPN.

Así, un **segundo aspecto** de la presente invención versa sobre una vacuna que comprende el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención.

15 Un **tercer aspecto** de la presente invención versa sobre el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención para ser usado como vacuna.

En una realización preferente según el tercer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención es para ser usado como vacuna contra la enfermedad de la IPN en alevines y/o esguines y/o peces; más preferentemente, para ser usado como vacuna contra la enfermedad de la IPN en alevines.

20 En una realización particularmente preferente según el tercer aspecto de la presente invención, el IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención es para la vacunación de alevines contra la enfermedad de la IPN.

En una realización preferente según el tercer aspecto de la presente invención, la vacuna es distribuida por inmersión o administración oral; más preferentemente, distribuida a los alevines por inmersión o administración oral.

25 En otra realización preferente según el tercer aspecto de la presente invención, dichos alevines son mantenidos en un entorno que está libre del IPNV virulento durante al menos 10 días después de la vacunación con dicho IPNV avirulento.

30 En otra realización preferente según el tercer aspecto de la presente invención, dicho virus o vacuna es distribuido no después del día 4 después de la alimentación inicial de los alevines. En otra realización preferente según el tercer aspecto de la presente invención, la distribución es por inmersión usando una dosificación del virus en el intervalo de 1×10^4 TCID₅₀/ml a 1×10^6 TCID₅₀/ml; más preferentemente 5×10^4 TCID₅₀/ml a 5×10^5 TCID₅₀/ml; aún más preferentemente 1×10^5 TCID₅₀/ml a 5×10^5 TCID₅₀/ml; y lo más preferible es que sea de aproximadamente 2×10^5 TCID₅₀/ml.

35 La presente invención también versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención, o sobre una vacuna según el segundo aspecto de la presente invención, para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de la IPN.

40 La presente invención también versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención, o sobre una vacuna según el segundo aspecto de la presente invención, para la profilaxis o tratamiento de la IPN, siendo la distribución por inyección, inmersión o como aditivo alimenticio, preferentemente inmersión o como aditivo alimenticio, siendo lo más preferible por inmersión.

La presente invención también versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención, o sobre una vacuna según el segundo aspecto de la presente invención, para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de la IPN en peces y/o alevines, preferiblemente alevines.

45 La presente invención también versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención, o sobre una vacuna según el segundo aspecto de la presente invención, para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de la IPN en alevines, manteniéndose dichos alevines en un entorno que está libre del IPNV virulento durante al menos 10 días después de la vacunación con dicho IPNV avirulento.

50 La presente invención también versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención, o sobre una vacuna según el segundo aspecto de la presente invención, para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de la IPN en alevines, administrándose dicho virus o vacuna no después del día 4 desde la alimentación inicial de los alevines.

La presente invención también versa sobre un IPNV avirulento vivo según el primer aspecto de la presente invención, o sobre una vacuna según el segundo aspecto de la presente invención, para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de la IPN, siendo la distribución por inmersión usando una dosificación del virus en el intervalo de 1×10^4 TCID₅₀/ml a 1×10^6 TCID₅₀/ml; más preferentemente 5×10^4 TCID₅₀/ml a 5×10^5 TCID₅₀/ml; aún más preferentemente 1×10^5 TCID₅₀/ml a 5×10^5 TCID₅₀/ml; y siendo lo más preferible aproximadamente 2×10^5 TCID₅₀/ml.

Habiendo descrito ahora completamente la presente invención con cierto detalle a título de ilustración y ejemplo con el fin de la claridad de comprensión, será obvio para una persona con un dominio normal de la técnica que la misma puede realizarse o modificando o cambiando la invención con una gama amplia y equivalente de condiciones, formulaciones y otros parámetros de la misma, y se pretende que tales modificaciones o cambios estén abarcados dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos están pensados para ilustrar cómo realizar y usar la invención. No se pretende que limiten el alcance de la invención de cualquier manera o en ningún grado.

Ejemplo 1

“Efecto de la vacunación contra la IPN”

Cepa de la vacuna

La cepa de la vacuna, denominada en la presente memoria cepa G700, fue un aislado natural del IPNV recogido en peces marinos de un año de edad. El pez del que se aisló el virus estaba clínicamente sano y no padecía IPN. La cepa de la vacuna se propagó en células RTG-2 y titulada en células CHSE-214. (Título: $2,0 \times 10^8$ TCID₅₀/ml, dosis por tanque: 2,0 ml, diluidos hasta 10 ml usando medio L-15).

Material de IPNV para la prueba de provocación

La cepa de provocación del IPNV fue la cepa virulenta V-1244. Esta cepa se propagó en células RTG-2 y titulada en células CHSE. (Título: $9,8 \times 10^6$ TCID₅₀/ml, dosis por tanque: 20 ml.)

Sujeto de prueba

Los peces usados fueron alevines salvajes de salmón, aproximadamente 1560 en total, originarios del río Rauma. Los huevos provenían de peces de desove mantenidos en el banco vivo de genes de Haukvik, S-Trøndelag durante más de 10 años. Los huevos eclosionaron en el criadero de VESO Viken, y transferidos al centro de investigaciones cuando estuvieron listos para la alimentación inicial. Los peces fueron alimentados según S-2002.

Parámetros ambientales durante el experimento

Calidad del agua: Agua dulce

Temperatura: $12 \pm 1^\circ\text{C}$

Nivel de oxígeno: Mínimo de 8 mg/L a la salida

Caudal: El caudal debería mantenerse a un nivel para garantizar suficiente pO₂ (0,1 L por tanque por minuto)

Procedimiento experimental

Tarea	Actividad	Día exp.
Desinfección	Trece tanques, teniendo cada uno un volumen total de agua de 8L, fueron desinfectados según procedimientos estándar antes del inicio del experimento.	0
Comienzo de la alimentación inicial	1560 alevines fueron distribuidos en trece tanques separados de 120 peces cada uno (grupos 1 _{A-D} , 2 _{A-D} y 3 _{A-E}).	0
Muestreo	20 alevines fueron pesados y luego congelados a -20°C .	1
Grupo de inmunización 1	Los peces de cuatro tanques paralelos (1 _{A-D}) fueron inmunizados interrumpiendo el flujo de agua y añadiendo al agua 2×10^5 TCID ₅₀ /ml de la cepa G700. El caudal normal se reanudó después de tres horas.	4

Tarea	Actividad	Día exp.
Grupo de inmunización 2	Los peces de cuatro tanques paralelos (2 _{A-D}) fueron inmunizados interrumpiendo el flujo de agua y añadiendo al agua 2×10^5 TCID ₅₀ /ml de la cepa G700. El caudal normal se reanudó después de tres horas.	8
Muestreo	Seis peces fueron recogidos de todos los paralelos en los grupos 1, 2 y 3, y congelados a -20°C. Seis peces de todos los paralelos en los grupos 1, 2 y 3 fueron sometidos a muestreo mediante inmersión en formol para un examen histopatológico.	14
Provocación	Los peces en el grupo de inmunización 1 _{A-C} , en el grupo de inmunización 2 _{A-C} y en el grupo no inmunizado 3 _{A-C} fueron sometidos a una prueba de provocación interrumpiendo el flujo de agua y añadiendo al agua 2×10^5 TCID ₅₀ /ml de la cepa V-1244. El flujo de agua también fue interrumpido en los tanques de control (1 _D , 2 _D y 3 _{D-E}), y el caudal normal se reanudó después de tres horas.	14
Muestreo	Seis peces fueron recogidos de todos los paralelos en los grupos 1, 2 y 3, y congelados a -20°C. Seis peces de todos los paralelos en los grupos 1, 2 y 3 fueron sometidos a muestreo mediante inmersión en formol para un examen histopatológico.	28
Muestreo	Seis peces fueron recogidos de todos los paralelos en los grupos 1, 2 y 3, y congelados a -20°C. Seis peces de todos los paralelos en los grupos 1, 2 y 3 fueron sometidos a muestreo mediante inmersión en formol para un examen histopatológico.	42
Fin del experimento	Cualquier pez remanente fue muerto y congelado a -70°C.	43

Resultados, reaislamiento del virus mediante cultivo celular y RT-PCR

Los grupos de inmunización 1_{A-D} y 2_{A-D}, así como los grupos no inmunizados (3_{A-E}) fueron sometidos a muestreo antes de su sometimiento a la prueba de provocación en el día 14 del experimento. Los grupos inmunizados resultaron positivos al IPNV después del reaislamiento en células RTG-2. Esto se confirmó con resultados positivos de RT-PCR. Los grupos no inmunizados fueron negativos tanto en el cultivo celular como en RT-PCR (Tabla 1).

El muestreo se repitió después de la prueba de provocación en el día 28 del experimento. Los resultados demuestran que todos los grupos que fueron inmunizados y/o sometidos a la prueba de provocación (grupos 1_{A-D}, 2_{A-D} y 3_{A-C}) fueron positivos al virus. Los grupos no inmunizados ni sometidos a la prueba de provocación (3_{D-E}) fueron negativos según cultivo celular. Sin embargo, 2 de 12 muestras resultaron positivas según PCR (Tabla 1).

El último muestreo, en el día 42 del experimento, presenta resultados positivos en los grupos 1 y 2 de inmunización (1_{A-C} y 2_{A-C}), pero se encontró que 7 de las muestras del grupo 2 eran positivas según PCR. Asimismo, se halló 4 de 18 muestras en los grupos no inmunizados ni sometidos a la prueba de provocación (3_{A-C}) también eran positivos según PCR, aunque no según el reaislamiento del virus. Los controles negativos (3_{D-E}) fueron todos negativos según el cultivo celular y RT-PCR (Tabla 1).

Tabla 1

Grupo	Tanque	Previo a la provocación- día 14 del exp.			Posterior a la provocación- día 28 del exp.			Posterior a la provocación- día 42 del exp.		
		Total	+	-	Total	+	-	Total	+	-
1	A,B,C	18	18	0	18	18	0	18	18	0
2	A,B,C	18	18	0	18	18	0	18	15	(3)
3	A,B,C	18	0	18	18	18	0	18	14	(4)
1	D	6	6	0	6	6	0	6	6	0
2	D	6	6	0	6	6	0	6	2	(4)
3	D,E	12	0	12	12	2	10	12	0	12

Resultados del reaislamiento del virus en los alevines sometidos a muestreo en diferentes momentos. Los homogenatos fueron sometidos a ensayo mediante inoculación en cultivo celular (RTG-2) y observación del ECP

seguido por verificación mediante RT-PCR. Los números entre paréntesis representan resultados positivos únicamente según RT-PCR (la PCR tiene una sensibilidad más elevada que el cultivo celular).

Resultados, mortalidad

- 5 La mortalidad fue registrada diariamente y los peces muertos (si los había) eran retirados de los tanques diariamente. Los resultados están representados en la Figura 1 y la Figura 2.

Ejemplo 2

“Avirulencia y estabilidad genética”

- 10 La purificación de placas de las placas de IPNV de la cepa de la vacuna se obtuvo propagando disoluciones seriadas de la cepa G700 en células CHSE-214, con gel de agarosa (SeaPlaque) como soporte sólido. Tres placas fueron identificadas, recolectadas, purificadas y clonadas. Dos de estas fueron sometidas a caracterización adicional secuenciando el gen VP2.

- 15 Los resultados obtenidos muestran que la secuencia VP2 de ambos clones era un 100% idéntica, tanto a escala de nucleótidos como de aminoácidos y también era idéntico a la cepa G700 original. Los clones tenían Pro₂₁₇Thr₂₂₁ en el motivo de virulencia, coherente con los aislados de baja virulencia. Sin embargo, solo se usó uno de los dos clones en los experimentos subsiguientes de provocación.

La secuencia de nucleótidos del gen VP2 de G700 está presentada en la SEQ ID NO:2, y la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 madura de G700 está representada por el residuo aminoácido 1-442 de la SEQ ID NO:1.

Avirulencia y estabilidad genética

- 20 La prueba de provocación de los alevines se efectuó en Veso-Vikan, acreditada instalación experimental que satisface los requisitos de las normativas existentes (basadas en monografías de la Farmacopea General Europea para la documentación de vacunas de virus vivos). Se usaron alevines de salmón atlántico de la variedad AquaGen, que se sabe que son susceptibles al IPNV. Los alevines fueron expuestos (provocados) a la solución de virus en el momento de la alimentación inicial. Aunque el objetivo inicial era someter al virus a 6 pasajes en alevines, solo fue posible acometer 3 pasajes, debido a la estacionalidad en la disponibilidad de alevines. El estudio se realizó como bloques experimentales discontinuos, uno detrás de otro, con trabajo de laboratorio (reaislamiento y propagación de virus para su uso en el experimento siguiente) entre medias. Cada experimento comprendió tres paralelos, con 100 alevines en cada cubo. También se incluyó un cuarto cubo que contenía 100 alevines como control contra la mortalidad incidental. La dosificación del virus fue de aproximadamente 2×10^5 TCID₅₀/ml y fue administrado mediante baño aproximadamente 6 días después de la alimentación inicial. El primer muestreo se realizó el día 21 tras la exposición al virus. Después del muestreo, los alevines fueron sometidos a estrés (disminuyendo el contenido de agua en los cubos combinado con movimiento de un salabre en los cubos durante un periodo de 10 min; este procedimiento se repitió diariamente durante 1 semana) en los bloques experimentales 1º y 3º. Estos alevines fueron observados durante 28 días más antes del muestreo final. Las mortalidades se registraron a diario.

- 35 La Figura 3 muestra las mortalidades totales al final de cada bloque experimental. En el primer experimento, hubo ligeramente más mortalidad incidental en los grupos tanto de control como inmunizado tanto antes como después del estrés. Después del estrés, no obstante, morían 5 alevines más de promedia en el grupo sometido a la prueba de provocación con respecto al control, aunque, en último término, sobrevivió aproximadamente el 90% de los alevines y no hubo ninguna diferencia significativa ($p=0,05$) entre el grupo sometido a la prueba de provocación y el de control. En los experimentos segundo y tercero, muy pocos peces murieron en cualquiera de los dos grupos, sin que se observara diferencia estadística entre los grupos, ni siquiera después de someterlos a estrés (3º experimento).

- 45 Histológicamente, no se observó ninguna lesión patológica en órganos internos, incluyendo el páncreas de los alevines antes o después del estrés. Además, no se detectó mediante inmunohistoquímica ningún virus de IPN en ninguno de los alevines inmunizados, aunque el virus fuera reaislado de ellos. Esto sugiere que el virus estaba presente en los alevines únicamente en niveles subclínicos. Las secuencias de VP2 de los virus reaislados fueron idénticas en un 100% al aislado original (G700) al comienzo y al fin del estudio. Sin embargo, en los pasajes 2º y 3º anteriores al estrés se observó una mutación de leucina a fenilalanina en la posición 336. Esta es una mutación conservada y no tiene ninguna influencia en la virulencia del virus, dado que cae fuera de los motivos críticos. Esto está apoyado por las bajas mortalidades asociadas con los aislados. También es digno de mención que la mutación revirtió tras el estrés de los alevines en el 3º experimento.

Ejemplo 3

“Avirulencia e inestabilidad genética”

Células y virus

Se mantuvieron embriones de salmón Chinock (células CHSE-214; ATCC CCL-1681) a 20°C en medio L-15 (Sigma-Aldrich) complementado con suero fetal bovino al 5% (FBS, Medprobe), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 50 µg ml⁻¹ de gentamicina (Sigma-Aldrich). Se cultivaron células de gónadas (RTG-2; ATCC CCL-55) de trucha arcoíris a 20°C en medio L-15 complementado con suero fetal bovino al 10%, 2 mM de L-glutamina y 50 µg ml⁻¹ de gentamicina.

Los aislados virales fueron propagados en células RTG-2 mediante inoculación de 100µl de solución viral madre (almacenada a -20°C en glicerol al 30%, título ~ 10⁷ TCID₅₀/ml) en matraces de cultivo celular confluentes en T de 162 cm² al 70%. Los sobrenadantes fueron recolectados cuando era visible de forma generalizada el efecto citopático, 5-7 días después de la infección. Los sobrenadantes del cultivo celular fueron obtenidos después de una centrifugación a 2500 × g durante 10 minutos, y de filtrado estéril (0,22µl). El título infeccioso se determinó mediante disolución límite en células CHSE-214, y la TCID₅₀ fue estimada mediante el método de Kärber (1931. Beitrage zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol 162:480-483).

Construcción de clones de ADNc de longitud máxima

La generación de clones de ADNc de longitud máxima de todas las regiones codificantes y no codificantes de los segmentos A y B de ARN de NVI-015 se llevó a cabo según procedimientos descritos por Yao y Vakharia (1998. Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. J Virol. 72:8913-8920). El aislado recombinante rNVI-15PA (también denominado rNVI15VP2) de IPNV Sp fue generado según ha sido descrito anteriormente por Song y colaboradores (2005. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. Journal of Virology 79: 10289-10299). Este aislado recombinante se origina a partir de rNVI-15TA (también denominado rNVI15) y el terminal 5' de Sp103. Esto dio como resultado la recuperación de la progenie viral con un motivo de virulencia similar Pro₂₁₇Ala₂₂₁Ala₂₄₇ al del aislado progenitor Sp103 (2005. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. Journal of Virology 79:10289- 10299). La Sp103 es un aislado del IPNV obtenido de un brote natural de IPN, y provoca tasas de mortalidad de moderadas a bajas (2005. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. Virology 342:13-25; 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 322:31-40). El virus recombinante rNVI-15PA fue sometido a dos tandas de purificación de placas en células CHSE-214 antes de su propagación de células RTG-2 para obtener una reserva. El ácido nucleico del virus fue secuenciado completamente para garantizar que no se produjera ninguna mutación adversa debido a la adaptación celular.

Las cepas de virus creadas por ingeniería genética se propagaron en monocapas de RTG-2. Los sobrenadantes fueron recolectados tras una centrifugación a 2500 × g durante 10 minutos, y de filtrado estéril (0,22µl). La extracción de ARN usando el mini kit viral QIAamp (Qiagen) se llevó a cabo según la recomendación del fabricante. Para garantizar que los clones generados tenían los residuos correctos, los genomas de los segmentos A y B fueron secuenciados según describen Yao y Vakharia (1998. Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. J Virol. 72:8913-8920) y los cromatogramas fueron analizados.

Ensayo de purificación en placas

Para generar el virus mutante final en el residuo 221 de VP2, los inventores efectuaron 10 veces (pasajes) el pasaje del virus recombinante ProAlaAla obtenido en células CHSE-214 (2005. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. Journal of Virology 79:10289-10299). A continuación, el aislado fue purificado en placas inoculando monocapas de RTG-2 en placas de seis pocillos con una disolución en potencias de diez (10⁻³ a 10⁻⁶) de sobrenadantes del cultivo celular. Después de 1 hora de adsorción a temperatura ambiente, se retiró el inóculo y las células fueron cubiertas con agarosa SeaPlaque al 0,8% (BioWhittaker) en medio 2×L-15 (Sigma) que contenía un 5% de FBS y un 1% de L-glutamina. Las células fueron incubadas a 15°C durante 4 días, y las placas formadas por el efecto citopático (ECP) fueron cogidas mediante la inserción de unas pinzas de biopsia de 3 mm (Miltex), llegando a la placa atravesando el agar. Posteriormente, las placas fueron inoculadas sobre monocapas de RTG-2 e incubadas a 15°C hasta que se observó un ECP completo. Después el sobrenadante fue recogido tras una centrifugación a 2500 × g durante 10 minutos y filtrado estéril (0,22µl). Se extrajo ARN usando el mini kit de ARN viral QIAamp según las recomendaciones del fabricante. Se determinaron secuencias completas de nucleótidos de los segmentos A y B de cada virus según se ha descrito antes. Los cromatogramas fueron revisados para garantizar que en el estudio se usaba un codón ATT "limpio" que codificaba Thr₂₂₁. No se encontró ninguna otra mutación en todo el genoma del virus en comparación con rNVI-15PA. Antes del sometimiento a la prueba de provocación, los aislados fueron propagados por un pasaje en células RTG-2.

Establecimiento de una población de alevines de salmón atlántico infectados persistentemente

La prueba de provocación se realizó en el centro de investigación de VESO Vikan, Namsos, Noruega. Esto formó parte de un estudio mayor que incluía en total 1020 alevines de salmón atlántico (*Salmo salar* L.) de la variedad AquaGen eclosionados en el criadero VESO Vikan incluidos en el experimento. Los alevines habían comenzado recientemente a alimentarse (Micro 015, Ewos) y tenían un peso medio de 0,2 gramos (n=20). Los peces fueron divididos en 4 cubos, cada uno de 250 alevines. Después de un periodo de aclimatación de una semana, los alevines pasaron hambre un día antes de ser sometidos a la prueba de provocación.

Los peces fueron sometidos a la prueba de provocación mediante inmersión con rNVI-15PT a una dosis de 5×10^4 TCID₅₀/ml en un volumen total de 4 litros (Tanque 1). Un tanque de control fue infectado de forma simulada añadiendo medio de cultivo celular (Tanque 2). El agua fue removida durante la prueba de provocación para su aireación. Después de un periodo de 3 horas, el volumen de agua fue reducido a 2 litros y se reanudó el caudal normal. Se registró la mortalidad y los peces muertos fueron recogidos y congelados diariamente a -70°C. Se llevó a cabo un muestreo de diez peces de cada tanque diez días después de la prueba de provocación y, después de este primer muestreo, diez peces fueron objeto de muestreo de cada tanque una vez al mes, hasta seis meses después de la prueba de provocación.

Reaislamiento del virus a partir de peces persistentemente infectados

A las muestras de alevines almacenados a -70°C sin conservantes se añadió suero fisiológico con tampón de fosfato (PBS) (1:5, peso/volumen) y fueron homogeneizadas usando un homogeneizador peristáltico. Se transfirieron 100µl de este homogenato a 600µl de tampón de RLT que contenía 2-mercaptoetanol (mini kit RNeasy, Qiagen) y fueron almacenados a -70°C. El resto del homogenato fue diluido 1:2 en medio L-15 complementado con 2 mM de L-glutamina y 50µg ml⁻¹ de gentamicina. Después de una breve centrifugación a 2500 × g durante 10 minutos, el sobrenadante fue inoculado en células RTG-2 cultivadas en placas de 24 pocillos en disoluciones finales del 1% y el 0,1%, e incubado durante una semana a 15°C. El medio de cultivo celular del primer pasaje fue usado para infectar nuevas monocapas. Las muestras fueron consideradas negativas cuando no se observaba ningún ECP después de una incubación de 1 semana del segundo pasaje. Se aisló ARN del homogenato de peces para todas las muestras negativas en el cultivo celular usando el mini kit RNeasy (Qiagen) según el protocolo del proveedor, y se efectuó una RT-PCR para amplificar un fragmento de ADN específico al IPNV, de 224 bp, según describen Santi *et al.* (2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 322:31-40) con modificaciones menores. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados mediante tincionado con tinción de gel de ADN SYBR® Safe (Invitrogen).

Secuenciación

Se aisló ARN a partir del homogenato almacenado en tampón de RLT que contenía 2-mercaptoetanol (mini kit RNeasy, Qiagen) almacenado a -70°C después de la homogenización. Se llevó a cabo RT-PCR para amplificar un fragmento de ADN específico al IPNV, de 400 bp, usando el kit de RT-PCR OneStep de Qiagen según las instrucciones del fabricante, con 0,5 µg de ARN y 15 pmol de cada uno de los cebadores A-Sp500F y A-Sp1689R (2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 322:31-40) en un volumen total de reacción de 25 µl. Las condiciones de ciclado fueron 50°C durante 30 min., 95°C durante 15 min., seguido por 40 ciclos a 94°C durante 45 s, 57°C durante 45s, 72°C durante 2 min. 15s, y, por último, 72°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y analizados mediante tincionado con tinción de gel de ADN SYBR® Safe (Invitrogen).

Para purificar los fragmentos de ADN del gel de agarosa, se usó la columna de centrifugación de extracción de gel de ADN Quantum Prep Freeze N' Squeeze (BIO-RAD) según las instrucciones del fabricante. El ADN recuperado fue secuenciado por un servicio comercial de secuenciación (operón de Eurofins MWG) usando el cebador A-Sp500F (2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 322:31-40). Los datos de la secuencia fueron analizados usando el soporte lógico VectorNTI (Invitrogen).

Clonación y secuenciación de nucleótidos

Se tomaron cuatro muestras con diferentes mezclas de bases en las posiciones 217 y 221 para su clonación y secuenciación. Los productos de PCR amplificados por polimerasa *Taq* derivados de la etapa de secuenciación fueron clonados en un Vector TOPO® usando TOPO TA Cloning® según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las células One Shot® de *E. coli* químicamente competentes fueron transformadas según el protocolo y se distribuyeron 50 µl sobre placas de agar precalentadas que contenían 50 µg/ml de ampicilina y fueron preincubadas durante 30 min a 37°C con 40 µl 40 mg/ml X-gal (Invitrogen) en dimetilformamida para la selección blanca/azul. Se cogieron 80-96 colonias blancas de cada placa de Petri y se puso una en cada pocillo de una placa de agar de 96 pocillos con 150 mg de ampicilina (GATC Biotech). Los plásmidos fueron aislados y secuenciados por una empresa comercial de secuenciación, GATC Biotech. Los datos de secuencia fueron analizados usando el soporte lógico VectorNTI.

Resultados

Construcción de virus de la cepa IPNV Sp de baja virulencia

El aislado usado para la prueba de provocación tenía las siguientes combinaciones de aminoácidos en las posiciones 217, 221 y 247: ProThrAla. Los aminoácidos en las posiciones 252, 281, 282 y 319 fueron ValThrAsnAla.

En detalle, los constructores que incluían combinaciones de los constructos originales pUC19NVI15VP2 y pUC19NVI15B dieron como resultado la recuperación de NVI-15PA (2005. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. Journal of Virology 79:10289-10299), que

subsiguientemente fue sometido a pasaje 10 veces, resultando en una mutación en la posición 221 en VP2 (Ala₂₂₁ Thr), y, después de la purificación de la placa, se recuperó el aislado rNVI-15PT con la combinación de aminoácidos ProThrAla.

- 5 Los ARN genómicos de los virus recuperados fueron analizados después de su amplificación mediante RT-PCR, y el análisis de secuencias de los productos de RT-PCR confirmó las mutaciones previstas en las regiones VP2 y VP1. Además, se determinaron las secuencias completas de nucleótidos del segmento A de ambos virus, que no presentaba ninguna otra sustitución no deseada de nucleótidos.

Infección persistente de los alevines

- 10 La dosis de la prueba de provocación usada en este estudio fue menor que la acostumbrada en estudios estándar de provocación (2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 322:31-40), pensados para establecer una infección persistente en alevines y para retener un gran número de peces supervivientes (>95%). De todos los peces muestreados durante el experimento, el 94% estaba persistentemente infectado.

Reaislamiento y caracterización del IPNV a partir de los alevines infectados

- 15 Para documentar que los peces estaban infectados y permanecían permanentemente infectados, los inventores recogieron alevines una vez cada 30 días en los meses 1-6 después de la infección. En cada punto temporal, fueron examinados 10 peces usando cultivo celular y RT-PCR. En general, los IPNV fueron reaislados por cultivo o detectados mediante RT-PCR en un 94% de los tres grupos. Ya fuera por reaislamiento del virus o RT-PCR, todos los peces eran positivos a los 6 meses posteriores a la prueba de provocación.
- 20 El avance de infección aguda a persistencia ha sido asociado con el aumento en la complejidad genómica de regiones hipervariables de los virus, documentada en particular para el VHC (2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. Science 288:339-344. doi:8445 [pii]) y da como resultado de cuasispecies. Con el fin de determinar la complejidad de los genomas virales de la región hipervariable de la proteína VP2 (posiciones de aminoácidos 180-360) y de cualquier mutación en peces individuales durante el periodo
- 25 de persistencia, el ARN aislado de cada uno de 5 peces de cada grupo en todos los puntos de muestreo fue amplificado mediante RT-PCR, y los productos de PCR fueron purificados mediante electroforesis en gel y enviados para su secuenciación. Esto demostró que la cepa con ProThrAla tenía mutaciones en el genoma que producían una combinación de ProThrAla (aislado de la prueba de provocación) y a nueva variante ThrAlaThr, que representa una cepa revertida muy virulenta del IPNV (Figura 5).

30

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Norwegian School of Veterinary Science

5 <120> Vacuna contra la IPN

<130> P61003001PCT00

<150> NO20110650

10 <151> 02-05-2011

<150> NO20110402

<151> 16-03-2011

15 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 508

<212> PRT

<213> Virus de la necrosis pancreática infecciosa

<220>

25 <221> PROPEP

<222> (1)..(508)

<223> VP2 precursor

<220>

30 <221> péptido maduro

<222> (1)..(442)

<223> VP2 maduro

<400> 1

Met Asn Thr Asn Lys Ala Thr Ala Thr Tyr Leu Lys Ser Ile Met Leu
1 5 10 15

Pro Glu Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr Thr Glu Arg His
20 25 30

Ile Leu Lys Gln Glu Thr Ser Ser Tyr Asn Leu Glu Val Ser Glu Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ile Leu Val Cys Phe Pro Gly Ala Pro Gly Ser Arg Val
50 55 60

Gly Ala His Tyr Arg Trp Asn Ala Asn Gln Thr Gly Leu Glu Phe Asp
65 70 75 80

Gln Trp Leu Glu Thr Ser Gln Asp Leu Lys Lys Ala Phe Asn Tyr Gly
85 90 95

Arg Leu Ile Ser Arg Lys Tyr Asp Ile Gln Ser Ser Thr Leu Pro Ala
100 105 110

35

ES 2 647 073 T3

Gly Leu Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Leu Asn Ala Ala Thr Phe Glu Gly
 115 120 125
 Ser Leu Ser Glu Val Glu Ser Leu Ala Tyr Asn Ser Leu Met Ser Leu
 130 135 140
 Thr Thr Asn Pro Gln Asp Lys Val Asn Asn Gln Leu Val Thr Lys Gly
 145 150 155 160
 Val Thr Val Leu Asn Leu Pro Thr Gly Phe Asp Lys Pro Tyr Val Arg
 165 170 175
 Leu Glu Asp Glu Thr Pro Gln Gly Ile Gln Ser Met Asn Gly Ala Lys
 180 185 190
 Met Arg Cys Thr Ala Ala Ile Ala Pro Arg Arg Tyr Glu Ile Asp Leu
 195 200 205
 Pro Ser Gln Arg Leu Pro Pro Val Pro Ala Thr Gly Thr Leu Thr Thr
 210 215 220
 Leu Tyr Glu Gly Asn Ala Asp Ile Val Asn Ser Thr Thr Val Thr Gly
 225 230 235 240
 Asp Ile Asn Phe Ser Leu Ala Glu Gln Pro Ala Asn Glu Thr Lys Phe
 245 250 255
 Asp Phe Gln Leu Asp Phe Met Gly Leu Asp Asn Asp Val Pro Val Val
 260 265 270
 Thr Val Val Ser Ser Val Leu Ala Ser Asp Asp Asn Tyr Arg Gly Val
 275 280 285
 Ser Ala Lys Met Thr Gln Ser Ile Pro Thr Glu Asn Ile Thr Lys Pro
 290 295 300
 Ile Thr Arg Val Lys Leu Ser Tyr Lys Ile Asn Gln Gln Thr Glu Ile
 305 310 315 320
 Gly Asn Val Ala Thr Leu Gly Thr Met Gly Pro Ala Ser Val Ser Phe
 325 330 335
 Ser Ser Gly Asn Gly Asn Val Pro Gly Val Leu Arg Pro Ile Thr Leu
 340 345 350
 Val Ala Tyr Glu Lys Met Thr Pro Leu Ser Ile Leu Thr Val Ala Gly
 355 360 365

ES 2 647 073 T3

Val Ser Asn Tyr Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Leu Lys Asn Met
370 375 380

Val Thr Arg Tyr Gly Lys Tyr Asp Pro Glu Gly Leu Asn Tyr Ala Lys
385 390 395 400

Met Ile Leu Ser His Arg Glu Glu Leu Asp Ile Arg Thr Val Trp Arg
405 410 415

Thr Glu Glu Tyr Lys Glu Arg Thr Arg Val Phe Asn Glu Ile Thr Asp
420 425 430

Phe Ser Ser Asp Leu Pro Thr Ser Lys Ala Trp Gly Trp Arg Asp Ile
435 440 445

Val Arg Gly Ile Arg Lys Val Ala Ala Pro Val Leu Ser Thr Leu Phe
450 455 460

Pro Met Ala Ala Pro Leu Ile Gly Met Ala Asp Gln Phe Ile Gly Asp
465 470 475 480

Leu Thr Lys Thr Asn Ala Ala Gly Gly Arg Tyr His Ser Met Ala Ala
485 490 495

Gly Gly Arg Tyr Lys Asp Val Leu Glu Ser Trp Ala
500 505

<210> 2

<211> 1524

<212> DNA

<213> Virus de la necrosis pancreática infecciosa

<400> 2

atgaacacaa acaaggcaac cgcgacctac ctgaaatcca ttatgcttcc agagactgga	60
ccagcaagca tcccggacga cataacggag agacacatct taaaacaaga gacctcgtca	120
tacaacctag aggtctccga atcaggaagt ggcattcttg ttgtttccc tggggcacca	180
ggctcacggg tcggtgcaca ctacagatgg aatgcgaacc agacggggct ggagttcgac	240
cagtggctgg agacgtcgca ggacctgaag aaagccttca attacgggag gctgatctca	300
aggaaatacg acatccaaag ctccacacta ccggccggtc tctacgtctt gaacgggacg	360
ctcaacgctg ccaccttcga gggcagctcg tccgaggtgg agagcctggc ctacaacagc	420
ctgatgtccc taacaacgaa ccccaggac aaagtcaaca accagctggg gacaaaagga	480
gtcacagtcc tgaatctacc aacagggttc gacaaaccat acgtccgcct agaggacgag	540
acaccccagg gtctccagtc aatgaacggg gccaaagatga ggtgcacagc tgcaattgca	600

ES 2 647 073 T3

ccgcggaggt	acgagatcga	cctcccatcc	caacgcctac	cccccgttcc	tgcgacagga	660
accctcacca	ctctctacga	gggaaacgcc	gacatcgtca	actccacaac	agtgacggga	720
gacataaact	tcagtctggc	agaacaaccc	gcaaacgaga	ccaagttcga	cttcagctg	780
gacttcatgg	gccttgacaa	cgacgtccca	gttgtcacag	tggtcagctc	cgtgctggcc	840
tcagatgaca	actacagagg	agtctcagcc	aagatgaccc	agtccatccc	gaccgagaac	900
atcacaagc	cgatcaccag	ggtcaagctg	tcatacaaga	tcaaccagca	gacagaaatc	960
ggcaacgtcg	ccaccctggg	cacaatgggt	ccagcatccg	tctccttctc	atcagggaac	1020
ggaaatgtcc	ccggcgtgct	cagaccaatc	acactgggtg	cctatgagaa	gatgacaccg	1080
ctgtccatcc	tgaccgtagc	tggagtgtcc	aactacgagc	tgatcccaa	cccagaactc	1140
ctcaagaaca	tggtgacacg	ctatggcaag	tacgaccccg	aaggtctcaa	ctatgccaa	1200
atgatcctgt	cccacaggga	agagctggac	atcaggacag	tgtggaggac	agaggagtac	1260
aaggagagga	ccagagtctt	caacgagatc	acggacttct	ccagtgcact	gccacgtca	1320
aaggcatggg	gctggagaga	catagtcaga	ggaattcgga	aagtcgcagc	tcctgtactg	1380
tccacgtgt	ttccaatggc	agcaccactc	ataggaatgg	cagaccaact	cattggagat	1440
ctcactaaga	ccaatgcagc	aggcgggaag	taccactcca	tggccgcag	agggcgctac	1500
aaagacgtgc	tcgagtcctg	ggca				1524

<210> 3

<211> 1524

<212> RNA

<213> Virus de la necrosis pancreática infecciosa

<400> 3

augaacacaa	acaaggcaac	cgcgaccuac	cugaaaacca	uuauuguucc	agagacugga	60
ccagcaagca	ucccgagcga	cauaacggag	agacacauuc	uaaaacaaga	gaccucguca	120
uacaaccuag	aggucuccga	aucaggaagu	ggcauucuu	uuuguuuccc	uggggcacca	180
ggcucacggg	ucggugcaca	cuacagaugg	aaugcgaacc	agacggggcu	ggaguucgac	240
caguggcugg	agacgucgca	ggaccugaag	aaagccuuc	auuacgggag	gcugaucuca	300
aggaaaucg	acauccaaag	cuccacacua	ccggccgguc	ucuacgcucu	gaacgggacg	360
cucaacgcug	ccaccuucga	gggcagucug	uccgaggugg	agagccuggc	cuacaacagc	420
cugauguccc	uaacaacgaa	cccccaggac	aaagucaaca	accagcuggu	gacaaaagga	480
gucacagucc	ugaauacuac	aacaggguuc	gacaaaccu	acguccgccu	agaggacgag	540
acaccccagg	gucuccaguc	aaugaacggg	gccaaauga	ggugcacagc	ugcaauugca	600
ccgcggaggu	acgagaucga	ccucccaucc	caacgccuac	cccccgucc	ugcgacagga	660
accucaccca	cucucuacga	gggaaacgcc	gacauuguca	acuccacaac	agugacggga	720

gacauaaacu ucagucuggc agaacaaccc gcaaacgaga ccaaguucga cuuccagcug	780
gacuucaugg gccuugacaa cgacguccca guugucacag uggucagcuc cgugcuggcc	840
ucagaugaca acuacagagg agucucagcc aagaugaccc aguccauccc gaccgagaac	900
aucacaaagc cgaucaccag ggucaagcug ucauacaaga ucaaccagca gacagaaauc	960
ggcaacgucg ccaccuggg cacaaugggu ccagcauccg ucuccuucuc aucagggaac	1020
ggaaaugucc ccggcgugcu cagaccaauc acacuggugg ccuaugagaa gaugacaccg	1080
cuguccaucc ugaccguagc uggagugucc aacuacgagc ugaucccaa cccagaacuc	1140
cucaagaaca uggugacacg cuauggcaag uacgaccccg aaggucucua cuaugccaag	1200
augauccugu cccacagggg agagcuggac aucaggacag uguggaggac agaggaguac	1260
aaggagagga ccagagucuu caacgagauc acggacuucu ccagugaccu gcccacguca	1320
aaggcauggg gcuggagaga cauagucaga ggaauucgga aagucgcagc uccuguacug	1380
uccacgcugu uuccaauggc agcaccacuc auaggaaugg cagaccaacu cauuggagau	1440
cucacuaaga ccaaugcagc aggcggaagg uaccacucca uggccgcagg agggcgcuac	1500
aaagacgugc ucgaguccug ggca	1524

REIVINDICACIONES

1. Un virus avirulento vivo de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) que no revierte en un virus virulento después de al menos 3 pasajes en anfitriones que se sabe que son susceptibles al IPNV, comprendiendo dicho virus un ácido nucleico que codifica una proteína VP2 madura o una proteína VP2 precursora que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 85% con la SEQ ID NO. 1, en la que los residuos aminoácidos en las posiciones 252, 281, 282 y 319 de la proteína son Asn, Ser, Asp y Glu respectivamente.
2. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C, hace que los alevines sean positivos al virus, medidos por el reaislamiento en las células RTG-2.
3. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C, proporciona a los alevines protección contra la enfermedad de la IPN en comparación con los alevines no infectados.
4. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C, hace que los alevines no desarrollen ningún signo de la enfermedad de la IPN.
5. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 en el que el residuo aminoácido en la posición 221 de la proteína es Thr.
6. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 o 5 en el que el residuo aminoácido en la posición 217 de la proteína es Pro.
7. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1, designado IPNV-G700 y depositado como ECACC-Nº 11 041201.
8. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 que, cuando es administrado por inmersión con un título de 2×10^5 TCID₅₀/ml a alevines de salmón atlántico mantenidos en agua dulce a una temperatura de 12°C,
 - hace que los alevines sean positivos al virus, medidos por el reaislamiento en las células RTG-2;
 - hace que los alevines sean negativos al virus, medidos por inmunohistoquímica;
 - proporciona a los alevines protección contra la enfermedad de la IPN en comparación con los alevines no infectados; y
 - hace que los alevines no desarrollen ningún signo de la enfermedad de la IPN.
9. Una vacuna que comprende el IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1.
10. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 para ser usado como vacuna en la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad de la IPN.
11. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 para ser usado como vacuna en la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad de la IPN en alevines.
12. Un IPNV avirulento vivo según la reivindicación 1 para ser usado como vacuna en la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad de la IPN, siendo la distribución por inmersión o administración oral.

Figura 1

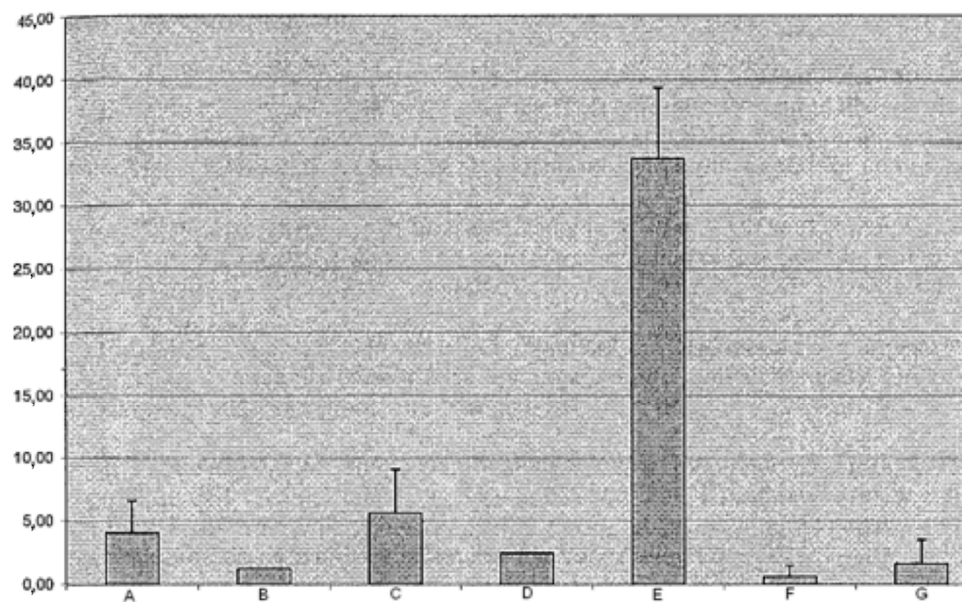


Figura 2

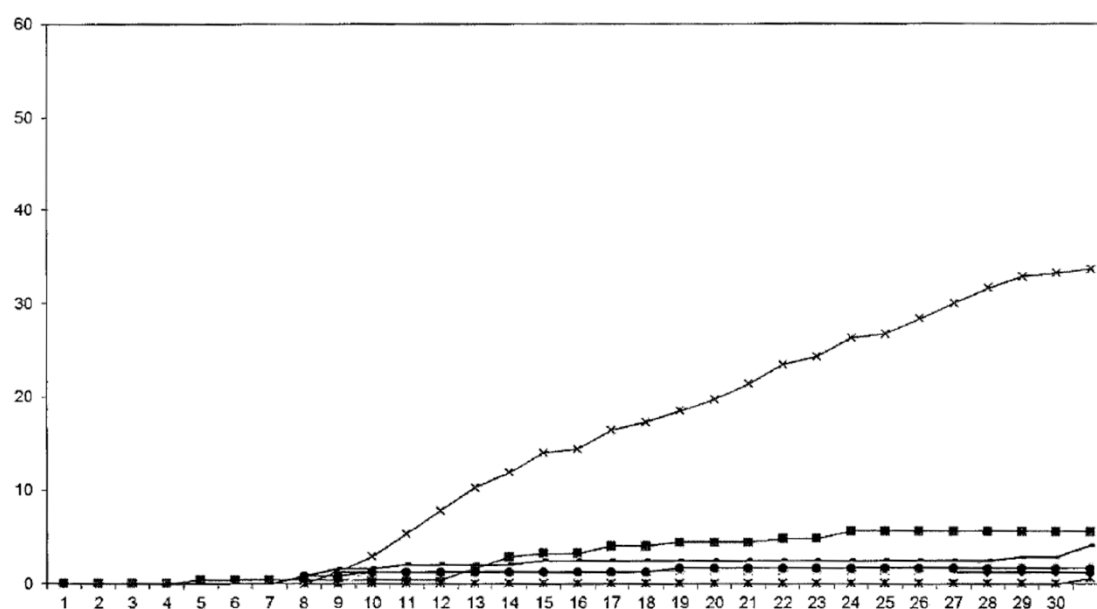


Figura 3

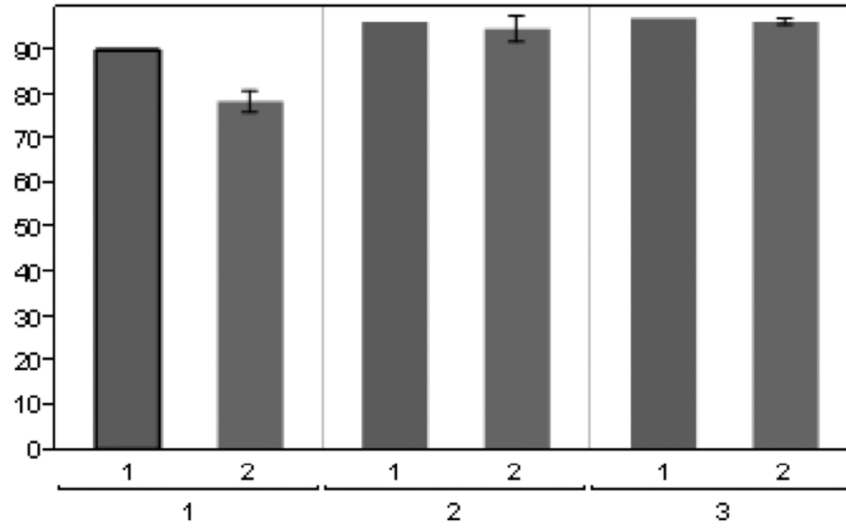


Figura 4

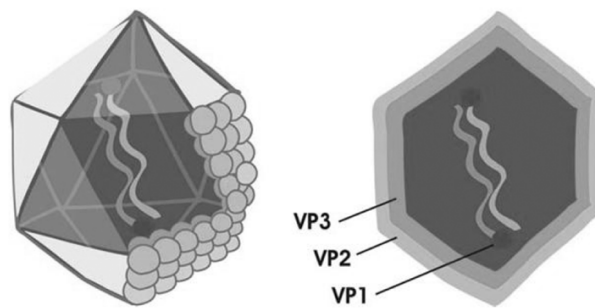


Figura 5

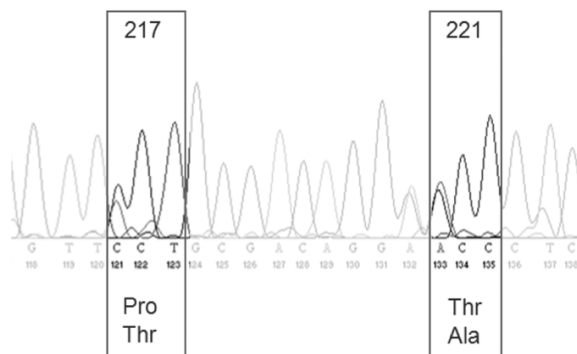


Figura 6a

Identidad consensuada	1. IPNV-VP2 PTA	MNTN	■ A T A T Y	■ S I M P L P E T G	P A S I P P D D I T E	■ H I L Q E T S S	M N L E V S E S G S	G I L V C E P G A P
	2. G700	MNTN	■ A T A T Y	■ S I M P L P E T G	P A S I P P D D I T E	■ H I L Q E T S S	M N L E V S E S G S	G I L V C E P G A P
	3. NV4-015-TA	MNTN	■ A T A T Y	■ S I M P L P E T G	P A S I P P D D I T E	■ H I L Q E T S S	M N L E V S E S G S	G I L V C E P G A P
Identidad consensuada	1. IPNV-VP2 PTA	G S I G A	Y P W	N A N Q T G L E E D	Q W L E T S Q D L K	■ A E N Y G G L I S	■ Y D I Q S S T L	P A G L Y A L N G T
	2. G700	G S I G A	Y P W	N A N Q T G L E E D	Q W L E T S Q D L K	■ A E N Y G G L I S	■ Y D I Q S S T L	P A G L Y A L N G T
	3. NV4-015-TA	G S I G A	Y P W	N A N Q T G L E E D	Q W L E T S Q D L K	■ A E N Y G G L I S	■ Y D I Q S S T L	P A G L Y A L N G T
Identidad consensuada	1. IPNV-VP2 PTA	L N A A T	E E G S L	S E V E S L T V N S	L M S L T T N P Q D	■ V N N Q L V T G	M T V L N L P T G E	D P P V V L E D E
	2. G700	L N A A T	E E G S L	S E V E S L T V N S	L M S L T T N P Q D	■ V N N Q L V T G	M T V L N L P T G E	D P P V V L E D E
	3. NV4-015-TA	L N A A T	E E G S L	S E V E S L T V N S	L M S L T T N P Q D	■ V N N Q L V T G	M T V L N L P T G E	D P P V V L E D E
Identidad consensuada	1. IPNV-VP2 PTA	T P Q G L	Q S M N G	A A M M C T A A A	P E R Y E E D L P S	Q L P P P V P A T G	T L T T L Y E G N A	D I V N S T T V T G
	2. G700	T P Q G L	Q S M N G	A A M M C T A A A	P E R Y E E D L P S	Q L P P P V P A T G	T L T T L Y E G N A	D I V N S T T V T G
	3. NV4-015-TA	T P Q G L	Q S M N G	A A M M C T A A A	P E R Y E E D L P S	Q L P P P V P A T G	T L T T L Y E G N A	D I V N S T T V T G
Identidad consensuada	1. IPNV-VP2 PTA	D I N E S L A	E Q P	A V E T E F D E Q L	D F M G L D N D V P	V V T V V S S V L A	T I N D N Y G V S A	■ N T Q S I P T E N
	2. G700	D I N E S L A	E Q P	A V E T E F D E Q L	D F M G L D N D V P	V V T V V S S V L A	T I N D N Y G V S A	■ N T Q S I P T E N
	3. NV4-015-TA	D I N E S L A	E Q P	A V E T E F D E Q L	D F M G L D N D V P	V V T V V S S V L A	T I N D N Y G V S A	■ N T Q S I P T E N

Figura 6b

Identidad consensuada	310	ITPTITVVL	320	SYINQQTAL	330	GNVATLGTMG	340	PASVSFSSGN	350	GNVPGVLPPI	360	TLVAEENTP
	1. IPNV-VP2 PTA	ITPTITVVL	320	SYINQQTAL	330	GNVATLGTMG	340	PASVSFSSGN	350	GNVPGVLPPI	360	TLVAEENTP
	2. G700	ITPTITVVL	320	SYINQQTAL	330	GNVATLGTMG	340	PASVSFSSGN	350	GNVPGVLPPI	360	TLVAEENTP
	3. NVI-015-TA	ITPTITVVL	320	SYINQQTAL	330	GNVATLGTMG	340	PASVSFSSGN	350	GNVPGVLPPI	360	TLVAEENTP
Identidad consensuada	370	LSLLTVAGVS	380	NYELLPNPEL	390	LNMMVTYGG	400	YDPEGLNYA	410	MILSREELD	420	ITTVWRTEEV
	1. IPNV-VP2 PTA	LSLLTVAGVS	380	NYELLPNPEL	390	LNMMVTYGG	400	YDPEGLNYA	410	MILSREELD	420	ITTVWRTEEV
	2. G700	LSLLTVAGVS	380	NYELLPNPEL	390	LNMMVTYGG	400	YDPEGLNYA	410	MILSREELD	420	ITTVWRTEEV
	3. NVI-015-TA	LSLLTVAGVS	380	NYELLPNPEL	390	LNMMVTYGG	400	YDPEGLNYA	410	MILSREELD	420	ITTVWRTEEV
Identidad consensuada	430	EEETRVFNEI	440	TDSSDLPPTS	450	SAWGWRDIVR	460	GIRKVAAPVL	470	STLFPMAAPL	480	IGMADQFIGD
	1. IPNV-VP2 PTA	EEETRVFNEI	440	TDSSDLPPTS	450	SAWGWRDIVR	460	GIRKVAAPVL	470	STLFPMAAPL	480	IGMADQFIGD
	2. G700	EEETRVFNEI	440	TDSSDLPPTS	450	SAWGWRDIVR	460	GIRKVAAPVL	470	STLFPMAAPL	480	IGMADQFIGD
	3. NVI-015-TA	EEETRVFNEI	440	TDSSDLPPTS	450	SAWGWRDIVR	460	GIRKVAAPVL	470	STLFPMAAPL	480	IGMADQFIGD
Identidad consensuada	490	LTNTNAAAGG	500	YYSMAAGGNY	508	DDVLESWA						
	1. IPNV-VP2 PTA	LTNTNAAAGG	500	YYSMAAGGNY	508	DDVLESWA						
	2. G700	LTNTNAAAGG	500	YYSMAAGGNY	508	DDVLESWA						
	3. NVI-015-TA	LTNTNAAAGG	500	YYSMAAGGNY	508	DDVLESWA						

Figura 7a**SÍMBOLOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS^a**

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
B	Asx	Asparagina o ácido aspártico	N	Asn	Asparagina
C	Cys	Cisteína	P	Pro	Prolina
D	Asp	Ácido aspártico	Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico	R	Arg	Arginina
F	Phe	Fenilalanina	S	Ser	Serina
G	Gly	Glicina	T	Thr	Treonina
H	His	Histidina	V	Val	Valina
I	Ile	Isoleucina	W	Trp	Triptófano
K	Lys	Lisina	Y	Tyr	Tirosina
L	Leu	Leucina	Z	Glx	Glutamina o ácido glutámico

^a El símbolo de una sola letra para un aminoácido indeterminado o no estándar es X.

Figura 7b**CÓDIGO GENÉTICO ESTÁNDAR**

Primera posición (terminal 5')	Segunda posición				Tercera posición (terminal 3')
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met ^a	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

^a AUG forma parte de la señal de iniciación, así como de la codificación para residuos internos de Met.