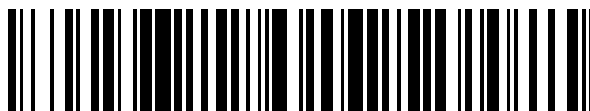


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 124**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2013** **PCT/US2013/061566**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014** **WO14052378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2013** **E 13776622 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020** **EP 2900258**

54 Título: **Vacunas de inmersión en subunidades para peces**

30 Prioridad:

26.09.2012 US 201261705704 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2020

73 Titular/es:

BENCHMARK ANIMAL HEALTH LIMITED (100.0%)
Benchmark House, 8 Smithy Wood Drive,
Sheffield
S35 1QN, GB

72 Inventor/es:

CRUMP, ELIZABETH MARY;
BURIAN, JAN;
BRICKER, JOSEPH MICHAEL;
KAY, WILLIAM WAYNE y
JOHNSON, NORMAN WILLIAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 792 124 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

Vacunas de inmersión en subunidades para peces

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de las vacunas de inmersión en subunidades para proteger a los peces de enfermedades causadas por patógenos infecciosos. En particular, la invención se refiere al campo de las vacunas de inmersión que comprenden antígenos recombinantes para proteger a los peces de enfermedades causadas por *Flavobacteriaceae*.

Antecedentes de la invención

10 El cultivo industrial de peces a través de acuicultura se está expandiendo espectacularmente. Las enfermedades infecciosas causadas por agentes patógenos constituyen un problema importante que los establecimientos acuáticos industriales deben superar. Para prevenir la aparición de estas enfermedades infecciosas, la estrategia recurrente es la aplicación de vacunas. Casi todas las vacunas actualmente en uso en acuicultura corresponden a cultivos vivos atenuados o inactivados del mismo organismo patógeno que produce la enfermedad. Las vacunas recombinantes están creciendo cada vez más en el ámbito de los laboratorios de investigación, pero la aplicación de campo sigue siendo casi exclusivamente a través de técnicas de inyección.

15 Existen dos formas de vacunar a los peces: las vacunas se pueden aplicar por inyección o por inmersión. En la actualidad, uno de los mayores problemas en la acuicultura es que las vacunas inyectables son difíciles y costosas de administrar, y generalmente no se pueden usar en crías de menos de 15-20 gramos debido al riesgo de producir adherencias intraperitoneales y a la producción de alta dispersión en los tamaños de los peces en la recolección. Además, el uso de vacunas inyectables causa estrés en los peces, alto coste de mano de obra y riesgo de accidentes por inyecciones involuntarias a los usuarios.

20 A pesar de las ventajas potenciales de las vacunas de inmersión, han sido las vacunas inyectables las que han tenido un mayor desarrollo en la acuicultura comercial. La inyección intraperitoneal de peces es actualmente el método más común para administrar vacunas, principalmente debido a su alta eficacia y dosificación meticulosa que garantiza niveles plasmáticos adecuados. Las vacunas de inmersión actuales a menudo se caracterizan por su absorción ineficaz a través de la piel del pez y pueden adolecer de una menor inmunogenicidad. Como resultado, generalmente se requieren composiciones altamente inmunogénicas tales como patógenos vivos atenuados o inactivados.

25 *Flavobacterium psychrophilum* es un patógeno bacteriano gram-negativo de peces que causa la enfermedad bacteriana del agua fría ("CWD en inglés") y se considera un patógeno importante que afecta a la acuicultura de salmónidos debido a su amplia distribución e impacto económico. En los Estados Unidos, se estima que las pérdidas anuales causadas por la CWD solo en el noroeste del Pacífico son aproximadamente 9,6 y 4 millones de dólares para la acuicultura comercial de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) y la acuicultura de conservación de especies de salmónidos, respectivamente.

30 *Flavobacterium columnare* es una bacteria acuática que es altamente infecciosa para especies de peces tanto de aguas cálidas como frías. En el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), es el agente causante de la enfermedad de columnaris. *Flavobacterium columnare* es un patógeno Gram negativo, en forma de bastón, que se ha aislado del bagre de canal en áreas del sureste de los Estados Unidos donde se cultiva esta especie. La enfermedad también afecta a los peces deportivos (es decir, lucioperca y lubina) y los peces de acuario. La alimentación medicada (antibióticos) se utiliza actualmente para tratar de controlar esta infección bacteriana. Sin embargo, estos tratamientos tienen una eficacia limitada y la mayoría de los productores han abandonado el uso de alimentos medicados. La prevención de la enfermedad de columnaris mediante la vacunación es un objetivo importante y una de las principales prioridades de los productores de bagre y otros peces en todo el mundo. Los ahorros estimados para estas industrias superarían los 100 millones de dólares anuales.

35 Las opciones de tratamiento para *Flavobacterium* son limitadas e incluyen la reducción de las concentraciones de patógenos, la eliminación de la propagación del patógeno y el uso de antibióticos. Sin embargo, la eficacia del tratamiento generalmente es desigual y existen riesgos potenciales de desarrollar cepas resistentes a los antibióticos. Por lo tanto, se desea una vacuna para prevenir la infección.

40 El virus de la necrosis pancreática infecciosa ("IPNV en inglés") es el agente causal de una enfermedad altamente contagiosa y destructiva para la trucha arco iris y la trucha Brook y el salmón del Atlántico. Las cepas altamente virulentas de IPNV pueden causar más de 90% de mortalidad en las reservas de criaderos de menos de cuatro meses.

45 Los sobrevivientes de infección pueden permanecer como portadores asintomáticos de por vida y servir como reservorios de infección, diseminando el virus en sus heces y productos reproductivos. Por lo tanto, el IPNV es un patógeno de gran importancia económica para la industria acuícola.

El IPNV es el prototipo de la familia del virus Birnaviridae. El IPNV contiene un genoma de ARNdh bisegmentado, que está rodeado por una cápside icosaédrica de una sola capa. El mayor de los dos segmentos del genoma, el segmento A (3097 bases), codifica una poliproteína precursora de 106 kDa que es procesada para producir proteínas estructurales virales maduras VP2 y VP3, y VP4 (también denominada NS) una proteína no estructural (Duncan et al. al. 1987). VP2 ha sido identificada como el principal antígeno protector del anfitrión del IPNV.

Una vacuna ideal para el IPNV debe inducir protección a una edad temprana, prevenir la formación de portadores y debe ser eficaz contra una gran cantidad de subtipos de IPNV. Se ha encontrado que las vacunas inactivadas de IPNV son eficaces mediante la inoculación intraperitoneal de IPNV (descrita en los documentos US2003072772 y US8168201); sin embargo, no son eficaces y dan como resultado una dosificación adicional a través de inyección. El documento US8168201 describe composiciones antigénicas que comprenden antígenos particulares como vacunas de subunidades en las que las vacunas pueden comprender adicionalmente epítopos de células T promiscuos adicionales.

Tenacibaculum maritimum (antes, *Cytophaga marina*, *Flexibacter marinus* y *F. maritimus*) es el agente causante de la flexibacteriosis en peces marinos y pertenece a la familia de bacterias *Flavobacteriaceae* (Wakabayashi et al., 1986; Bernardet y Grimont, 1989; Sukui et al, 2001). La flexibacteriosis marina está ampliamente distribuida en peces cultivados y salvajes en Europa, Japón, Norteamérica y Australia (Mc Vicar y White, 1979, 1982). Entre los peces cultivados, se ha informado sobre la enfermedad en rodaballo, lenguado, dorada, lubina, dorada roja, dorada negra (*Acanthopagrus schlegelii*), platija y salmónidos.

Aunque tanto los adultos como los juveniles pueden verse afectados por la flexibacteriosis marina, los peces más jóvenes sufren una forma más grave de la enfermedad. Se ha informado sobre una mayor prevalencia y gravedad de la enfermedad a temperaturas más altas. Además de la temperatura del agua, la enfermedad está influenciada por una multiplicidad de factores ambientales (estrés) y relacionados con el anfitrión (estado de la superficie de la piel). En general, los peces afectados tienen una boca erosionada y hemorrágica, lesiones cutáneas ulcerosas, aletas deshinchadas y pudrición de la cola. También se puede establecer una enfermedad sistémica que implica diferentes órganos internos. La pérdida de la superficie epitelial de los peces, típica de esta enfermedad, también es un portal de entrada para otros patógenos bacterianos o parasitarios.

Para que sea comercialmente útil, una vacuna para peces debe ser capaz de conferir inmunidad protectora contra un patógeno cuando la vacuna se administra por métodos prácticos, tales como sumergir el pez en agua que contiene la vacuna. Los protocolos de vacunación que requieren manejo individual de peces, tales como mediante inyección, no son prácticos para muchas operaciones comerciales de acuicultura.

La Publicación de Patente de Estados Unidos 2008/0317781 de Cain et al. establece que "se ha intentado la inmunización con bacterias muertas con *F. psychrophilum*, y la protección obtenida por inmersión o por inyección con las bacterias muertas ha sido mínima". En consecuencia, Cain et al. produjeron un nuevo procedimiento de atenuación in vivo para *F. psychrophilum* que supuestamente produjo una inmunización eficaz a través de técnicas de inmersión.

Shoemaker et al. (Fish and Shellfish Immunology 30: 304-308, 2011) se refieren a una vacuna de *Flavobacterium columnare* vivo modificado utilizada en bagre de canal.

Sin embargo, hasta la fecha, no existen vacunas comerciales de inmersión eficaces basadas en antígenos de subunidades, particularmente con antígenos recombinantes. En vista de los problemas planteados por Cain et al. referentes a la dificultad de producir vacunas de inmersión inmunogénicas con bacterias muertas, las vacunas de inmersión de subunidades presumiblemente enfrentarían desafíos aún mayores. En este contexto, los solicitantes abordaron la difícil tarea de desarrollar una vacuna de inmersión en subunidades.

Compendio de la invención

Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto que los antígenos de las subunidades pueden de hecho utilizarse en vacunas de inmersión para proteger a los peces contra infecciones bacterianas y virales. Por consiguiente, la presente invención proporciona una vacuna de inmersión para inmunizar a un pez contra infecciones por *Flavobacteriaceae* que comprenden al menos un antígeno aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Más concretamente, el antígeno es un antígeno recombinante.

En otra realización, la composición comprende adicionalmente al menos un segundo antígeno aislado diferente.

En otra realización, la vacuna consiste en antígenos recombinantes. En otra realización, la vacuna no contiene patógenos vivos atenuados o inactivados.

Otra realización de la invención proporciona al menos un agente adicional. Más particularmente, el al menos un agente adicional es una bacterina o un virus vivo atenuado o inactivado. En otra realización, al menos un agente adicional es un coadyuvante. En otra realización, el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, virus de la necrosis hemopoyética infecciosa ("IHNV en inglés"), virus de la anemia

infecciosa del salmón ("ISAV en inglés"), virus de la enfermedad del páncreas ("PDV en inglés") en particular, alfavirus del salmón ("SAV en inglés"), virus de la viruela del salmón y virus de la septicemia hemorrágica viral ("VHSV en inglés").

- 5 Otra realización proporciona una vacuna según la invención para su uso en la inmunización de un pez contra una infección por *Flavobacteriaceae*, en donde la inmunización comprende sumergir el pez en la vacuna.

Las realizaciones, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas que se exponen a continuación en la presente memoria. Se entiende que cada una de las realizaciones anteriores y siguientes se puede combinar en una sola realización.

Breve descripción de la lista de secuencias

- 10 **SEQ ID NO: 1** Es la secuencia de nucleótidos que codifica la Proteína Similar a Histona (HLP) de *T. maritimum*.
- SEQ ID NO: 2** Es la secuencia de aminoácidos para la Proteína Similar a Histona (HLP) de *T. maritimum* codificada en SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos se puede fusionar con un epítipo de células T para mejorar la inmunogenicidad.
- SEQ ID NO: 3** Es la secuencia de nucleótidos que codifica la Proteína Similar a Histona (HLP) de *F. columnare*.
- 15 **SEQ ID NO: 4** Es la secuencia de aminoácidos para la Proteína Similar a Histona (HLP) de *F. columnare* codificada en SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos se puede fusionar con un epítipo de células T para mejorar la inmunogenicidad.
- SEQ ID NO: 5** Es la secuencia de nucleótidos que codifica la Proteína Similar a Histona (HLP) de *F. psychrophilum*.
- 20 **SEQ ID NO: 6** Es la secuencia de aminoácidos para la Proteína Similar a Histona (HLP) de *F. psychrophilum* codificada en SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos se puede fusionar con un epítipo de células T para mejorar la inmunogenicidad.
- SEQ ID NO: 7** Es la secuencia de aminoácidos del antígeno CM8 de *F. psychrophilum* recombinante. El extremo N-terminal que guía el péptido C está seguido del epítipo de sarampión (M) y el extremo carboxi de la secuencia es la proteína de *F. psychrophilum*.
- 25 **SEQ ID NO: 8** Es la proteína expresada en el casete de expresión CTMVP2c que consiste en (secuencia amino-carboxi) la proteína C N-terminal, el epítipo de la proteína de Fusión del Virus del Sarampión inmunoestimulador y el epítipo de la proteína de la toxina del tétanos y el fragmento de secuencia VP2 utilizado en los Ejemplos descritos en la presente memoria.
- 30 **SEQ ID NO: 9** Es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión rHLP/VP2 de rIPNV utilizada en los ejemplos descritos en la presente memoria.

Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se aplican a esta descripción. Reemplazan cualquier definición contradictoria contenida en cada referencia individual. Las palabras no definidas tienen el significado comúnmente utilizado por un experto en la técnica.

- 35 "Alrededor de" o "aproximadamente", cuando se utiliza con relación a una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (p. ej., dentro del intervalo de confianza de 95% para la media), o dentro de 10% del valor indicado, el que sea mayor. Si se utiliza "alrededor de" en referencia a intervalos de tiempo en semanas, "alrededor de 3 semanas" es de 17 a 25 días, y "alrededor de 2 a alrededor de 4 semanas" es de 10 a 40 días.
- 40 "Coadyuvante", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia que sirve como un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria. Véase a continuación una descripción adicional de los coadyuvantes.
- "Aminoácido", como se emplea en la presente memoria, se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales.
- 45 Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican con posterioridad, por ejemplo, hidroxiprolina, carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tales como los aminoácidos α y α -disustituidos, los N-alquil aminoácidos y otros aminoácidos no convencionales, también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil lisina, ϵ -N-acetil lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares. Se puede hacer referencia a los aminoácidos en la presente memoria por sus símbolos de
- 50

tres letras comúnmente conocidos o por sus símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. "Anticuerpo", como se emplea en la presente memoria, es cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno independientemente de la fuente, método de producción u otras características. Se refiere a una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma que se une específicamente a un antígeno como resultado de una respuesta inmunitaria a ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas séricas compuestas de cadenas de polipéptidos "ligeras" y "pesadas" que tienen regiones "constantes" y "variables" y se dividen en clases (p. ej., IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) en función de la composición de las regiones constante. En mamíferos y aves, los isotipos de inmunoglobulina M (IgM), IgG e IgY tienen un papel predominante en las respuestas sistémicas, mientras que IgA es el participante clave en las superficies mucosas. Los peces teleósteos son los vertebrados óseos más primitivos que contienen inmunoglobulinas y, a diferencia de los mamíferos y las aves, la IgM sérica en la mayoría de los teleósteos se expresa como un tetrámero, aunque se han descrito monómeros de IgM. Además, los teleósteos carecen de IgA o un equivalente funcional de IgA, aunque investigaciones recientes han añadido dos nuevas moléculas de inmunoglobulina, IgD e IgT/IgZ, y se ha informado de que la IgT es una inmunoglobulina especializada en inmunidad de la mucosa intestinal. Un anticuerpo que es "específico" para un antígeno dado indica que las regiones variables del anticuerpo reconocen y se unen a un antígeno específico exclusivamente. El término incluye, pero no se limita a: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo poliespecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo con dominio suprimido, una proteína de fusión, una proteína de fusión ScFc, un anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo quimérico, anticuerpo sintético, anticuerpo recombinante, anticuerpo híbrido, anticuerpo mutado y anticuerpos injertados con CDR. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes, o pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Un "anticuerpo" se puede convertir en una proteína de unión a antígeno, que incluye pero no se limita a fragmentos de anticuerpos que incluyen pero no se limitan a: Fab, F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla (ScFv), un fragmento Fd, un fragmento dAb, diacuerpos, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un nanocuerpo, un nanocuerpo bivalente, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), y un minianticuerpo y cualquiera de los fragmentos mencionados anteriormente y sus contrapartes manipuladas química o genéticamente, así como otros fragmentos de anticuerpos que conservan la función de unión al antígeno. Típicamente, tales fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno. Como reconocerán los expertos en la técnica, cualquiera de tales moléculas puede ser modificada (por ejemplo, "sometida a mutación inversa de anticuerpo a la secuencia de la línea germinal") para disminuir su inmunogenicidad, aumentar su afinidad, alterar su especificidad o para otros fines.

"Antígeno" o "inmunógeno", como se emplean en la presente memoria, se refieren a una molécula que contiene uno o más epítopos (lineal, conformacional o ambos) que al exponerse a un sujeto inducirá una respuesta inmunitaria que es específica para ese antígeno. Un epítipo es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de células T o un anticuerpo específico, y típicamente comprende aproximadamente 3 residuos de aminoácido a aproximadamente 20 residuos de aminoácido. El término antígeno se refiere a antígenos de subunidades, antígenos separados y discretos de un organismo completo con el que el antígeno está asociado en la naturaleza, así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. El término antígeno también se refiere a anticuerpos, tales como anticuerpos anti-idiotipo o fragmentos de los mismos, y a mimotopos de péptidos sintéticos que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico (epítipo). El término antígeno también se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que expresan un antígeno o determinante antigénico in vivo, tal como en aplicaciones de inmunización de ADN.

"Antigenicidad", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido para unirse inmuno-específicamente a un anticuerpo producido contra la proteína o polipéptido.

"Tampón" significa un sistema químico que previene el cambio en la concentración de otra sustancia química. Los sistemas donadores y aceptores de protones sirven como tampones, evitando cambios marcados en la concentración de iones de hidrógeno (pH). Otro ejemplo de un tampón es una solución que contiene una mezcla de un ácido débil y su sal (base conjugada), o una base débil y su sal (ácido conjugado).

Los términos "línea celular" o "célula anfitriona", como se emplean en la presente memoria, significan una célula procariota o eucariota en la que un virus puede replicarse o mantenerse.

El término "cultivo", como se emplea en la presente memoria, significa una población de células o microorganismos que crecen en ausencia de otras especies o tipos.

"Dosis" se refiere a una vacuna o composición inmunogénica administrada a un sujeto. Una "primera dosis" o "dosis de cebado" se refiere a la dosis de dicha composición administrada el día 0. Una "segunda dosis" o una "tercera dosis" o una "dosis anual" se refieren a una cantidad de dicha composición administrada después de la primera dosis, que puede ser, pero no se requiere que sea la misma vacuna o composición inmunogénica que la primera dosis.

Un "epítopo" es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de células T o un anticuerpo específico, y típicamente comprende de aproximadamente 3 residuos de aminoácido a aproximadamente 20 residuos de aminoácido.

Excipiente, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un componente portador no reactivo de una vacuna o composición inmunogénica que no es un antígeno. Los excipientes preferidos son aquellos conocidos en la técnica para las vacunas de inmersión.

El término "pez" se refiere a peces tanto de aguas frías como cálidas que se pueden tratar mediante las composiciones de vacuna de la presente invención. Los peces que se pueden tratar mediante el método de la invención incluyen cualquier pez que sea susceptible de infección y enfermedad causadas por el organismo o patógeno concretos. El pez puede ser un pez marino o de agua salada. Los ejemplos de peces adecuados para el método de la invención incluyen salmónidos (*Oncorhynchus sp.* y *Salmo sp.*), anguilas americanas, europeas y japonesas (*Anguilla sp.*), tilapia (*Oreochromis sp.*), lubina blanca y lubina americana (*Morone chrysops* y *M. saxatilis*), platijas (*Seriola sp.*), besugo (*Spams sp.*), perca marina (*Lates calcarifer*), mero estuarino (*Epinephelus tawine*), lucioperca (*Stizostedion vitreum*), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), centráquidos (tales como la perca americana, *Micropterus salmoides*), siluros marrones (*Nebulosus sp.*), piscardo de cabeza gorda (*Pimephales promelas*), carpitas doradas (*Notemigonus crysoleucas*), carpa (*Cyprinus carpio*), todas las especies de atún, especies de peces de acuario, tales como Molly negros (*Poecilia sphenops*), platy (*Xiphosphorus maculatus*), lamprea marina (*Petromyzon marinus*), tenca (*Tinea tinea*), carpa cruciana (*Carassius carassius*), peces de colores (*Carassius auratus*), pez ayu (*Plecoglossus altivelis*), piscardo de agua dulce (*Zacco platypus*), así como la perca (*Perca fluviatilis*), rutilo (*Rutilus rutilus*) y cherna (*Serranidae sp.*). En una realización preferida, los peces se utilizan en acuicultura.

"Fragmento" se refiere a una porción truncada de una proteína o gen. "Fragmento funcional" y "fragmento biológicamente activo" se refieren a un fragmento que conserva las propiedades biológicas de la proteína o gen completos.

"Homología" o "porcentaje de homología" se refieren al porcentaje de nucleótidos o residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos o similares a los residuos en la secuencia o secuencias de comparación después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología de secuencia, y también considerando cualquier sustitución conservativa como parte de la homología de secuencia. En un aspecto preferido, los polinucleótidos o secuencias de aminoácidos proporcionados en la presente memoria tienen más de aproximadamente 60% de homología de secuencia, más de aproximadamente 70% de homología de secuencia, más de aproximadamente 80% de homología de secuencia, más de aproximadamente 90% de homología de secuencia, más de aproximadamente 95% de homología de secuencia, más de aproximadamente 96% de homología de secuencia, más de aproximadamente 97% de homología de secuencia, más de aproximadamente 98% de homología de secuencia, o más de aproximadamente 99% de homología de secuencia.

"Identidad" o "porcentaje de identidad" se refieren al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos en la secuencia de comparación después de alinear ambas secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. En un aspecto preferido, los polinucleótidos o las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria tienen, para la secuencia de referencia (p. ej., SEQ ID NO: 2, 4 o 6) más de aproximadamente 60% de identidad de secuencia, más de aproximadamente 70% de identidad de secuencia, más de aproximadamente 80% de identidad de secuencia, más de aproximadamente 90% de identidad de secuencia, más de aproximadamente 95% de identidad de secuencia, más de aproximadamente 96% de identidad de secuencia, más de aproximadamente 97% de identidad de secuencia, más de aproximadamente 98% de identidad de secuencia, o más de aproximadamente 99% de identidad de secuencia.

La "vacuna de inmersión" se refiere a una solución o una premezcla para una solución que rodea, abarca o recubre la superficie de un pez y da como resultado la vacunación contra un patógeno concreto. Las vacunas de inmersión incluyen las vacunas de inmersión en baño corto, donde los peces se sumergen brevemente en una solución, y las vacunas de inmersión en baño prolongado, donde los peces se sumergen en la solución durante un período de tiempo, tal como horas o incluso días.

"Respuesta inmunitaria", como se emplea en la presente memoria, en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o una respuesta inmunitaria humoral y celular a un antígeno. Una "respuesta inmunitaria humoral" se refiere a aquella que está mediada al menos en parte por anticuerpos. Una "respuesta inmunitaria celular" es aquella mediada por linfocitos T u otros glóbulos blancos o ambos, e incluye la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas similares producidas por células T activadas, glóbulos blancos o ambos. Las respuestas inmunitarias se pueden determinar utilizando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización, que son conocidos en la técnica.

La "inmunogenicidad", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la capacidad de una proteína o

polipéptido para provocar una respuesta inmunitaria dirigida contra una bacteria o virus que causa la enfermedad identificada.

Una "composición inmunogénica" es una preparación que contiene un inmunógeno, que incluye, por ejemplo, una proteína, un péptido, una célula completa, un virus inactivado, subunitario o atenuado, o un polisacárido, o una combinación de los mismos, administrada para estimular el sistema inmunitario humoral y celular del receptor contra uno o más de los antígenos presentes en la composición inmunogénica.

La "inmunización" es el procedimiento de administración de una composición inmunogénica y estimulación de una respuesta inmunitaria o inmunogénica contra un antígeno en un anfitrión. Los anfitriones preferidos son los peces, tales como los peces utilizados en acuicultura. Preferiblemente, la composición inmunogénica es una vacuna.

La "cantidad inmunológicamente protectora", como se emplea en la presente memoria, es una cantidad de un antígeno eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor que es adecuada para prevenir o mejorar los signos o síntomas de la enfermedad, incluidos los efectos adversos para la salud o sus complicaciones. Se puede inducir inmunidad humoral o inmunidad mediada por células o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal a una composición se puede evaluar, p. ej., indirectamente a través de la medición de títulos de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través del seguimiento de los signos y síntomas después de la sensibilización con la cepa de tipo salvaje. La inmunidad protectora conferida por una composición o vacuna se puede evaluar midiendo, p. ej., la reducción de la propagación de los organismos de sensibilización, la reducción de signos clínicos tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y condición física general, salud y rendimiento del sujeto. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. La cantidad de una composición o vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo del organismo concreto utilizado, o el estado del animal que está siendo tratado o vacunado, y puede ser determinada por un veterinario.

El término "aislada" se refiere a una sustancia que está en forma sustancialmente pura, por ejemplo, mayor que aproximadamente 95% de pureza; o purificado, enriquecido o eliminado de alguna manera de su entorno natural. La referencia a "aislado" indica un agente, tal como una proteína que se elimina de su entorno natural, tal como de un animal/pez anfitrión, en un medio de crecimiento, producido de forma recombinante o purificado a partir de una preparación bacteriana de células completas y posteriormente puede ser añadido de nuevo a una composición que comprende otros agentes activos o antígenos. El término "aislado" abarca inmunógenos que están en solución con otros agentes/diluyentes/excipientes/coadyuvantes/proteínas. Preferiblemente, las composiciones de vacuna descritas en la presente memoria están aisladas.

"Agente medicinal" se refiere a cualquier agente que sea útil en la prevención, cura o mejora de una afección médica, o la prevención de alguna afección o incidencia fisiológica.

"Anticuerpo monoclonal", como se emplea en la presente memoria, se refiere a anticuerpos producidos por una sola línea de células de hibridoma, todas dirigidas hacia un epítipo en un antígeno concreto. El antígeno utilizado para fabricar el anticuerpo monoclonal se puede proporcionar como una proteína aislada del patógeno o el patógeno completo. Un "hibridoma" es una línea celular clonal que consiste en células híbridas formadas por la fusión de una célula de mieloma y una célula específica productora de anticuerpos. En general, los anticuerpos monoclonales provienen de ratón. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal también se refiere a una población clonal de un anticuerpo preparado contra un epítipo concreto de un antígeno producido por la tecnología de presentación en fagos, o un método que es equivalente a la presentación en fagos, o células híbridas que no provienen de ratón.

La "administración parenteral", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una composición o vacuna, en el organismo de un sujeto a través de una ruta que no incluye el tracto digestivo. La administración parenteral incluye la administración subcutánea, intramuscular, intraarterial e intravenosa. Para los fines de esta descripción, la administración parenteral excluye las rutas de administración que implican principalmente el transporte de la sustancia a través del tejido de la mucosa en la boca, la nariz, la tráquea y los pulmones.

El término "patógeno" o "microorganismo patógeno", como se emplea en la presente memoria, significa un microorganismo, por ejemplo, *Flavobacterium columnare* (*F. columnare*), *Flavobacterium psychrophilum* (*F. psychrophilum*), *Tenacibaculum maritimum* (*T. maritimum*), y el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), que es capaz de inducir o causar una enfermedad, dolencia o estado anormal en su animal anfitrión, preferiblemente una enfermedad que afecta a los peces.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a sustancias que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de sujetos sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares indebidas, con una razón beneficio-riesgo razonable y eficaz para su uso previsto.

"Anticuerpo policlonal", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una población mixta de anticuerpos producidos contra un patógeno o antígeno concretos. En general, la población contiene una variedad de grupos de anticuerpos, cada grupo dirigido hacia un epítipo concreto del patógeno o antígeno. Para producir anticuerpos policlonales, todo el patógeno, o un antígeno aislado, se introducen por inoculación o infección en un anfitrión, lo que

induce al anfitrión a producir anticuerpos contra el patógeno o antígeno.

El término "polinucleótido", como se emplea en la presente memoria, significa una molécula de polímero orgánico compuesta de monómeros de nucleótidos unidos covalentemente en una cadena. El ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico) son ejemplos de polinucleótidos con función biológica distinta.

5 El término "polipéptido", como se emplea en la presente memoria, significa una molécula de polímero orgánico compuesta de dos o más aminoácidos unidos en una cadena.

"Prevenir la infección", como se emplea en la presente memoria, significa prevenir o inhibir la replicación de la bacteria o el virus que causa la enfermedad identificada, inhibir la transmisión de la bacteria o el virus, evitar que la bacteria o el virus se establezca en su anfitrión, o aliviar los síntomas de la enfermedad causada por la infección. El
10 tratamiento se considera terapéutico si hay una reducción en la carga bacteriana o viral.

"Protección", "proteger", "inmunidad protectora" y similares, como se emplean en la presente memoria con respecto a una vacuna u otra composición, significan que la vacuna o composición previenen o reducen los síntomas de la enfermedad causada por el organismo del cual se obtienen los antígenos utilizados en la vacuna o composición. Los
15 términos "protección", "proteger" y similares, también significan que la vacuna o composición se pueden utilizar para "tratar" la enfermedad, o uno o más síntomas de la enfermedad que ya existe en un sujeto.

La "supervivencia porcentual relativa" (SPR) se puede definir o calcular de la siguiente manera: $SPR = \{1 - (\% \text{ de mortalidad de vacunación} / \% \text{ de mortalidad de control})\} \times 100$.

La "administración respiratoria", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el organismo de un sujeto a través o por medio de inhalación
20 de una sustancia nebulizada (atomizada). En la administración respiratoria, el mecanismo de transporte primario implica la absorción de la sustancia atomizada a través de la mucosa en la tráquea, los bronquios y los pulmones y, por lo tanto, es diferente de la administración intranasal o peroral.

Los términos "unión específica", "se une específicamente" y similares, se definen como dos o más moléculas que forman un complejo que se puede medir en condiciones fisiológicas o de ensayo y es selectivo. Se dice que un anticuerpo u otro inhibidor "se unen específicamente" a una proteína si, en condiciones apropiadamente
25 seleccionadas, tal unión no se inhibe sustancialmente, mientras que al mismo tiempo se inhibe la unión no específica. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y es selectiva para el compuesto o proteína. La unión no específica generalmente tiene baja afinidad. La unión en anticuerpos IgG, por ejemplo, generalmente se caracteriza por una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M o superior, tal como al menos aproximadamente
30 10^{-8} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-9} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-10} o superior, o al menos aproximadamente 10^{-11} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-12} M o superior. El término también es aplicable cuando, p. ej., un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo concreto que no es transportado por numerosos antígenos, en cuyo caso el anticuerpo que porta el dominio de unión a antígeno generalmente no se unirá a otros antígenos.

35 "Fragmento inmunogénico específico", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una porción de una secuencia que es reconocible por un anticuerpo o célula T específica para esa secuencia.

"Sujeto", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier animal que tenga un sistema inmunitario, preferiblemente un pez.

40 "Sustancialmente idéntica", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%.

"Vacuna de subunidades" y "composición de subunidades", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un tipo de vacuna o composición que incluyen uno o más antígenos, pero no todos los antígenos, que se obtienen de, o son homólogos a, antígenos de un patógeno de interés, tales como un virus, bacteria, parásito, hongo u organismo
45 similar a un hongo. Tal composición o vacuna están sustancialmente libres de células del patógeno intactas o partículas patogénicas, o el producto lisado de tales células o partículas. Por lo tanto, una vacuna de subunidades o composiciones de subunidades se pueden preparar a partir de polipéptidos inmunogénicos al menos parcialmente purificados o sustancialmente purificados a partir del patógeno o sus análogos. Los métodos para obtener un antígeno o antígenos en la vacuna de subunidades o composición de subunidades incluyen técnicas de purificación,
50 producción recombinante o síntesis química convencionales. Por lo tanto, una "vacuna de subunidades" o "composición de subunidades" se refieren a una vacuna o composición que consisten en uno o varios componentes antigénicos definidos de un virus, bacteria u otro inmunógeno. El componente de subunidades de la presente invención se puede producir de forma recombinante y comprende antígeno de *F. psychrophilum*.

55 Un "epítipo de células T" como se emplea en la presente memoria se refiere a un antígeno o fragmento antigénico capaz de potenciar una respuesta de células T en un organismo diana. Los epítopos específicos de células T como se emplea en la presente memoria se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.168.201 (denominados

"epítomos promiscuos de células T" o "PTCE"). En particular, las secuencias de epítomos de células T de la Patente de Estados Unidos Núm. 8.168.201, se designan como SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Esas secuencias se pueden conjugar o fusionar con cualquiera de las secuencias de aminoácidos enumeradas en la presente solicitud para formar una composición inmunogénica o antígeno de la presente invención.

5 "DICT₅₀" se refiere a la "dosis infecciosa de cultivo de tejidos" y se define como la dilución de un virus requerida para infectar 50% de un lote dado de cultivos celulares inoculados. Se pueden utilizar varios métodos para calcular la DICT₅₀, incluido el método Spearman-Kärber, que se utiliza a lo largo de esta memoria descriptiva. Para obtener una descripción del método Spearman-Kärber, véase B. W. Mahy y H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).

10 "Agente terapéutico", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula, compuesto, virus o tratamiento, preferiblemente un virus atenuado o muerto, o subunidad o compuesto, que ayuda en el tratamiento de una infección, enfermedad o afección viral, bacteriana, parasitaria o fúngica causada de ese modo.

15 "Cantidad terapéuticamente eficaz", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una cantidad de un antígeno o vacuna o composición que induciría una respuesta inmunitaria en un sujeto (p. ej., un pez) que recibe el antígeno o vacuna o composición que son adecuados para prevenir o mejorar los signos o síntomas de la enfermedad, incluidos los efectos adversos para la salud o sus complicaciones, causados por la infección con un patógeno, como un virus, bacteria, parásito, hongo u organismo similar a los hongos. Se puede inducir inmunidad humoral o inmunidad mediada por células, o tanto inmunidad humoral como mediada por células. La respuesta inmunogénica de un animal a un antígeno, vacuna o composición se puede evaluar indirectamente a través de la medición de títulos de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través del seguimiento de signos y síntomas después de la exposición a la cepa de tipo salvaje. La inmunidad protectora conferida por una vacuna o composición se puede evaluar midiendo la reducción de la propagación del organismo de sensibilización y/o la reducción de los signos clínicos, tales como la mortalidad, la morbilidad, la temperatura y el estado físico general, la salud y el rendimiento del sujeto. La cantidad de una vacuna o composición que es terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo del inmunógeno concreto utilizado, o el estado del sujeto, y se puede ser determinada por un experto en la técnica.

"Tratar" o "tratando", como se emplea en la presente memoria, se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir un trastorno, afección o enfermedad a la que se aplica tal término, o para prevenir uno o más síntomas de tal trastorno, afección o enfermedad.

30 "Vacuna" o "composición de vacuna", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una composición inmunogénica seleccionada entre un virus o bacteria, preferiblemente en forma de subunidad aislada. La administración de la vacuna a un sujeto produce una respuesta inmunitaria. La vacuna se puede introducir directamente en el sujeto por cualquier vía de administración conocida, preferiblemente por inmersión. Los términos significan una composición que previene o reduce una infección, o que previene o reduce uno o más signos o síntomas de la infección. Los efectos protectores de una composición de vacuna contra un patógeno normalmente se logran induciendo en el sujeto una respuesta inmunitaria. En términos generales, las incidencias de infección abolidas o reducidas, la mejora de los signos o síntomas o la eliminación acelerada del microorganismo de los sujetos infectados son indicativos de los efectos protectores de una composición de vacuna.

Antígenos, composiciones inmunogénicas y vacunas.

40 La presente descripción se basa en el descubrimiento inesperado de que la inclusión de antígenos aislados en vacunas de inmersión da como resultado una eficacia, eficiencia y seguridad sustancialmente mejoradas. Es decir, cuando se administra a un pez antes de la sensibilización patogénica, la composición previene la aparición de la enfermedad y no produce efectos secundarios adversos.

45 Los virus abarcados por la presente invención se pueden propagar en células, líneas celulares y células anfitrionas. Dichas células, líneas celulares o células anfitrionas pueden ser, por ejemplo, pero sin limitación, células de mamífero y células que no sean de mamífero, incluidas células de insectos y plantas. Las células, líneas celulares y células anfitrionas en las que se pueden propagar los virus incluidos en la presente invención son fácilmente conocidas y accesibles para los expertos en la técnica.

50 Las bacterias abarcadas por la presente invención se pueden cultivar y propagar utilizando diversos medios de cultivo conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen medios de cultivo de caldo (líquido) y agar (sólido; semisólido). Algunas bacterias también se pueden cultivar y propagar en células de mamíferos o células que no sean de mamífero.

55 Los virus y bacterias abarcados por la presente invención se pueden atenuar o inactivar antes de su uso en una composición inmunogénica o vacuna. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de atenuación e inactivación. Los métodos para la atenuación incluyen, entre otros, el pase en serie en cultivo celular en una línea celular adecuada (virus y algunas bacterias), pase en serie en cultivo de caldo (bacterias), irradiación ultravioleta (virus y bacterias) y mutagénesis química (virus y bacterias). Los métodos para la inactivación viral o bacteriana incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con formalina, betapropiolactona (BPL) o etilenimina binaria (BEI), u otros

métodos conocidos por los expertos en la técnica.

La inactivación por formalina se puede realizar mezclando la suspensión que contiene el microorganismo con formaldehído al 37% hasta una concentración final de formaldehído de 0,5%. La mezcla de microorganismos y formaldehído se mezcla mediante agitación constante durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de microorganismos inactivados se analiza a continuación para detectar organismos vivos residuales mediante el ensayo de crecimiento en una línea celular o medio de caldo adecuados.

Para algunos antígenos, la inactivación por BEI se puede realizar mezclando la suspensión que contiene el microorganismo de la presente invención con BEI 0,1 M (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N) a una concentración final de BEI 1 mM. Para otros antígenos, la concentración final de BEI es 2 mM. Un experto en la técnica conocerá la concentración adecuada que se debe utilizar. La mezcla de virus-BEI se mezcla mediante agitación constante durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de tiosulfato de sodio 1,0 M a una concentración final 0,1 mM. La mezcla continúa durante dos horas adicionales. La mezcla que contiene el microorganismo inactivado se analiza para detectar virus vivos residuales analizando el crecimiento en una línea celular o medio de caldo adecuados.

Las composiciones inmunogénicas y las vacunas abarcadas por la presente invención pueden incluir uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, que incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, coadyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes de retraso de la adsorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros conocidos por los expertos en la técnica. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros conocidos por el experto en la técnica. Los conservantes incluyen mertiolato, entre otros conocidos por el experto en la técnica.

Los agentes específicos que se pueden añadir a las vacunas de inmersión descritas en la presente memoria incluyen *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, virus de la necrosis hemopoyética infecciosa (IHNV), virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus de la enfermedad del páncreas (PDV) en particular, alfavirus del salmón (SAV), virus de la viruela del salmón y virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV).

Los coadyuvantes, que se pueden incluir en las vacunas descritas en la presente memoria, pueden metabolizarse, refiriéndose a coadyuvantes que consisten en componentes que pueden ser metabolizados por las especies diana, tales como coadyuvantes basados en aceites vegetales. Un coadyuvante metabolizable puede ser un aceite metabolizable. Los aceites metabolizables son grasas y aceites que generalmente se producen en plantas y animales, y generalmente consisten en mezclas de triacilglicerolos, también conocidos como triglicéridos o grasas neutras. Estas sustancias no polares insolubles en agua son triésteres de glicerol de ácidos grasos. Los triacilglicerolos difieren según la identidad y la ubicación de sus tres residuos de ácidos grasos o cadenas laterales.

El coadyuvante también puede ser no metabolizable, en referencia a coadyuvantes que consisten en componentes que no pueden ser metabolizados por el organismo del animal sujeto al que se administra la emulsión. Los aceites no metabolizables adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen alcanos, alquenos, alquinos y sus correspondientes ácidos y alcoholes, sus éteres y ésteres, y sus mezclas. Preferiblemente, los compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarbonados ligeros, es decir, tales componentes tienen de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite se puede preparar sintéticamente o purificar a partir de productos derivados del petróleo. Los aceites no metabolizables preferidos para su uso en las composiciones descritas en la presente memoria incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas, por ejemplo. El término "aceite mineral" se refiere a un aceite coadyuvante no metabolizable que es una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos a partir de vaselina mediante una técnica de destilación. El término es sinónimo de "parafina licuada", "vaselina líquida" y "aceite mineral blanco". También se pretende que el término incluya "aceite mineral ligero", es decir, aceite que se obtiene de manera similar por destilación de vaselina, pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que el aceite mineral blanco. El aceite mineral se puede obtener a partir de varias fuentes comerciales, por ejemplo, J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). El aceite mineral ligero está disponible comercialmente con el nombre DRAKEOL®.

Los coadyuvantes incluyen, pero no se limitan a, el sistema coadyuvante Emulsigen (MVP Laboratories; Ralston, NE), el sistema coadyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, p. ej., coadyuvantes completos e incompletos de Freund, copolímero en bloque (CytRx; Atlanta, GA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), coadyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc.; Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, coadyuvante lípido-amina avridina, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (recombinante o no), toxina del cólera, muramildipéptido, copolímero en bloque de escualeno/plurónico/tensioactivo (aceite SP), sulfolipobeta-ciclodextrina (SL-CD), liposomas que contienen un inmunomodulador (p. ej., CpG o poli I:C), muramildipéptido (MDP), Iscomatrix (Quil A/fosfotidilcolina), CpG/DEAE-dextrano/aceite mineral (TXO), CpG, triterpenoides (p. ej., Quil A u otra preparación de saponina purificada o parcialmente purificada), esteroides (p. ej., colesterol), agentes inmunomoduladores (p. ej., bromuro de dimetil

dioctadecil amonio - DDA), polímeros (p. ej., poli(ácido acrílico) tal como CARBOPOL®) y estimulantes Th2 (p. ej., glucolípidos tales como Bay R1005®), y combinaciones de los mismos, entre muchos otros coadyuvantes conocidos a los expertos en la técnica.

Los ejemplos no limitantes de varias combinaciones que se pueden utilizar incluyen un triterpenoide más un esteroide (p. ej., Quil A/colesterol, también conocido como QAC), un triterpenoide más un esteroide, un agente inmunomodulador y un polímero (p. ej., Quil A/colesterol/DDA/CARBOPOL®, también conocido como QCDC), y un triterpenoide más un esteroide, un agente inmunomodulador, un polímero y un estimulante Th2 (por ejemplo, Quil A/colesterol/DDA/CARBOPOL®, y Bay R1005®, también conocido como QCDCR).

El experto en la técnica puede determinar fácilmente las cantidades y concentraciones de coadyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención. En una realización, la presente invención contempla composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 2000 µg de coadyuvante. En otra realización, el coadyuvante se incluye en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1500 µg, o de aproximadamente 250 µg a aproximadamente 1000 µg, o de aproximadamente 350 µg a aproximadamente 750 µg. En otra realización, el coadyuvante se incluye en una cantidad de aproximadamente 500 µg/2 ml de dosis de la composición inmunogénica o vacuna.

Las composiciones inmunogénicas y las vacunas también pueden incluir antibióticos. Tales antibióticos incluyen, entre otros, los de las clases de aminoglucósidos, carbapenemos, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. En una realización, la presente invención contempla composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibiótico. En otra realización, las composiciones inmunogénicas y las vacunas comprenden de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 55 µg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 15 µg/ml a aproximadamente 45 µg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 25 µg/ml a aproximadamente 35 µg/ml de antibiótico. En otra realización más, las composiciones inmunogénicas y las vacunas comprenden menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibiótico.

Las composiciones inmunogénicas y las vacunas abarcadas por la presente invención pueden incluir una o más moléculas polinucleotídicas que codifican un virus o bacteria, o una proteína viral o bacteriana. Las moléculas de ADN o ARN se pueden utilizar en composiciones inmunogénicas o vacunas. La molécula de ADN o ARN se puede administrar en ausencia de otros agentes, o se puede administrar junto con un agente que facilite la absorción celular (p. ej., liposomas o lípidos catiónicos). El polinucleótido total en la composición inmunogénica o vacuna estará generalmente entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 5,0 mg/ml. En otra realización, el polinucleótido total en la composición inmunogénica o vacuna será de aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 4,0 mg/ml, o de aproximadamente 10 µg/ml y aproximadamente 3,0 mg/ml, o de aproximadamente 100 µg/ml y aproximadamente 2,0 mg/ml. Las vacunas y los procedimientos de vacunación que utilizan ácidos nucleicos (ADN o ARNm) se han descrito bien en la técnica, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Núm. 5.703.055, Patente de Estados Unidos Núm. 5.580.859, Patente de Estados Unidos Núm. 5.589.466.

Además de los virus o bacterias descritos anteriormente, las composiciones inmunogénicas y las vacunas incluidas en la presente invención pueden incluir otros antígenos adicionales. Los antígenos pueden estar en forma de una preparación parcial o total inactivada del microorganismo, o en forma de moléculas antigénicas obtenidas por técnicas de ingeniería genética o síntesis química. Otros antígenos apropiados para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de virus patógenos tales como IPNV.

Administración

En una realización preferida de la invención, una vacuna para su uso en la vacunación de peces se utiliza con una cantidad de un antígeno recombinante que es eficaz para proporcionar protección contra la enfermedad causada por la misma especie que el patógeno a partir del cual se obtiene el antígeno, en donde la inmersión del pez en el agua que contiene el antígeno produce una respuesta inmunitaria en el pez, preferiblemente proporcionando protección contra el patógeno. El epitelio de la piel y las branquias de los peces tienen mecanismos para proteger a los peces de una manera amplia y específica, lo que les permite reconocer de manera eficaz los patógenos con los que han estado en contacto. Cuando los peces se sumergen en agua que contiene una vacuna diluida, la piel y las branquias pueden adsorber los antígenos suspendidos de la vacuna. A continuación, las células especializadas, como las células secretoras de anticuerpos, presentes en la piel y el epitelio branquial, se activarán y protegerán a los peces cuando se expongan al patógeno vivo en una etapa posterior. Otras células ubicadas en el epitelio de la piel y las branquias, tales como las células presentadoras de antígenos (macrófagos), también absorben los antígenos de las vacunas y los transportan a tejidos especializados donde se acumula la respuesta inmunitaria sistémica.

En la vacunación por inmersión, existen varios métodos de aplicación que incluyen inmersión en baño corto e inmersión en baño prolongado. En la vacunación por inmersión en baño corto, los peces se sumergen durante una muy corta duración, generalmente 30 segundos, en una solución de vacuna altamente concentrada, generalmente 1 parte del producto de la vacuna por 9 partes de agua. Con la vacunación por inmersión en baño prolongado, los peces están expuestos durante un período más largo, generalmente de una a varias horas, en una concentración

más baja de vacuna. La presente invención contempla metodologías de inmersión en baño corto e inmersión en baño prolongado para las vacunas de inmersión. Además, el pez se puede exponer a la composición de la vacuna mediante mecanismos de pulverización conocidos por los expertos en la técnica.

Las técnicas para el uso y la administración de vacunas de inmersión se describen en las siguientes patentes. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.518.252 se refiere a un método de inmersión y baño prolongado para reducir la carga de infección de un animal acuático. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.893.667 se refiere a un método para el suministro de una preparación de moléculas de ácido nucleico en polvo en tejido de vertebrados para la transformación de células en el tejido utilizando técnicas de inyección sin aguja. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.872.386 se refiere a una vacuna oral que incluye un organismo multicelular para su uso como alimento para el animal acuático que se vaya a vacunar, y un organismo unicelular administrado como alimento y, como resultado, bioencapsulado por el organismo multicelular. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.855.372 se refiere a un método y aparato para recubrir microproyecciones perforantes de la piel. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.673.374 se refiere a una composición antimicrobiana para el tratamiento de la piel humana afectada por dermatitis de diferentes etiologías, fabricada a partir de peróxido de hidrógeno, uno o más agentes humectantes y un agente antiinflamatorio; e incluyendo opcionalmente un agente exfoliante; las composiciones se pueden incorporar a las vacunas de inmersión descritas en la presente memoria. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.699.907 se refiere a una composición de acción antimicrobiana fabricada a partir de un disolvente lipófilo polar y ácidos grasos con 8 a 14 carbonos. La Patente de Estados Unidos Núm. 4.009.259 se refiere a un método para tratar peces y aumentar la eficacia de vacunas o desinfectantes, en donde los peces se sumergen en soluciones hiperosmóticas durante 2 a 3 minutos, y a continuación se sumergen en otra solución de la vacuna de inmersión o soluciones quimioterapéuticas. Estas soluciones están fabricadas a partir de sales de sodio, potasio, calcio y magnesio en forma de sulfatos, cloruros o fosfatos. La Patente de Estados Unidos Núm. 4.282.828 se refiere a un aparato para aplicar vacunas de inmersión por aspersión directa de la vacuna en una pulverización. Los peces están confinados en un recipiente rectangular donde están expuestos a tal procedimiento de baño. La Patente de Estados Unidos Núm. 4.287.179 se refiere a un procedimiento para aplicar una vacuna de inmersión para la enfermedad de la boca roja (yersiniosis) simplemente aplicando la vacuna en forma de inmersión no presurizada. La Patente de Estados Unidos Núm. 4.363.290 se refiere a un aparato automático para aplicar una o más vacunas de inmersión, que consiste en un medio para llevar a los peces a un compartimento que contiene la solución vacunal y más tarde, una vez que se completa el tiempo de contacto de inmersión requerido, desviar a los peces hacia su hábitat exterior.

El agua en la que se sumergen los peces puede ser de agua dulce, salada o salobre, según la variedad de peces que se vaya a tratar y el hábitat natural de los peces. La cantidad de antígeno que se suministra a los peces es una cantidad eficaz para proporcionar protección contra la enfermedad causada por el patógeno. Por ejemplo, la cantidad de antígeno en el agua en la que se sumergen los peces es eficaz para proporcionar protección. Los peces se sumergen en el agua o se rocían con un líquido que contiene el antígeno durante un tiempo suficiente para el desarrollo de protección contra la enfermedad causada por el patógeno de tipo salvaje. Generalmente, los tiempos de inmersión entre 15 segundos y varias horas son adecuados para el método de la invención. Preferiblemente, el tiempo de inmersión es entre 1 minuto y dos horas. Más preferiblemente, el tiempo de inmersión es entre 15 minutos y 2 horas. El tiempo de inmersión más preferido es entre 30 minutos y 1 hora.

Para los fines de esta invención, se considera que la protección contra la enfermedad debida a la vacuna de la invención se ha obtenido cuando se ha obtenido inmunidad completa o parcial contra la enfermedad. Se considera que la inmunidad se ha obtenido en una población de peces tratados cuando el nivel de protección para la población, evidenciado por una disminución en el número de peces infectados o en la gravedad de la enfermedad, es mayor en los peces que han sido tratados de acuerdo con la invención que la de un grupo de control no vacunado. Preferiblemente, la vacuna para uso de acuerdo con la invención dará como resultado una disminución de 20% en la mortalidad debido a la enfermedad o en el número de individuos que muestran signos clínicos de la enfermedad en comparación con los controles no vacunados.

Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los microorganismos descritos anteriormente. Los virus y/o bacterias purificados se pueden utilizar directamente en una composición o vacuna inmunogénica, o se pueden atenuar o inactivar adicionalmente. Típicamente, una composición inmunogénica o vacuna contiene entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^{12} partículas virales o bacterianas, o entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^{11} partículas, o entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^{10} partículas, o entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 partículas, o entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 partículas. Un experto en la técnica puede determinar la cantidad precisa de un microorganismo en una composición inmunogénica o vacuna eficaz para proporcionar un efecto protector.

Se puede administrar una dosis única a los animales, o, alternativamente, se pueden realizar dos o más inoculaciones con intervalos de aproximadamente dos a aproximadamente diez semanas. Se pueden requerir regímenes de refuerzo, y el régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar una inmunización óptima. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente el régimen de administración óptimo.

La solubilidad de los materiales utilizados en la preparación de soluciones parenterales se puede aumentar mediante el uso de mecanismos de formulación apropiados conocidos por el experto en la técnica, tales como la incorporación

de agentes potenciadores de la solubilidad, incluidos tampones, sales, tensioactivos, liposomas, ciclodextrinas y similares.

- 5 El alcance y la naturaleza de las respuestas inmunitarias inducidas en el animal se pueden evaluar utilizando una variedad de técnicas. Por ejemplo, los sueros se pueden recoger de los animales inoculados y analizar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para los inmunógenos. La detección de linfocitos T citotóxicos (CTL) que responden en tejidos linfoides, indicativos de la inducción de una respuesta inmunitaria celular, se puede lograr mediante ensayos tales como la proliferación de células T. Los mecanismos relevantes están bien descritos en la técnica.

Kits

- 10 En la medida en que sea deseable administrar una composición o vacuna inmunogénica combinada con composiciones o compuestos adicionales, por ejemplo, con el fin de tratar una enfermedad o afección concretas, está dentro del alcance de la presente descripción que una composición inmunogénica o vacuna pueda incluirse convenientemente o combinarse en forma de un kit adecuado para la administración o administración conjunta de las composiciones.

- 15 Por lo tanto, los kits abarcados por la presente descripción pueden comprender una o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales es una composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la presente invención, y un medio para retener por separado dichas composiciones, tales como un recipiente, botella dividida o paquete de aluminio dividido. Un ejemplo de tal kit es una jeringa y aguja, y similares. Un kit de la presente descripción es particularmente adecuado para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral o parenteral, para administrar las composiciones separadas a diferentes intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas entre sí. Para ayudar a administrar una composición abarcada por la presente invención, el kit típicamente comprende instrucciones para la administración.

- 25 Otro kit incluido en la presente descripción puede comprender uno o más reactivos útiles para la detección de un animal infectado. El kit puede incluir reactivos para analizar una muestra en busca de microorganismos completos, polipéptidos, epítomos o secuencias de polinucleótidos. La presencia de virus, bacterias, polipéptidos o secuencias de polinucleótidos se puede determinar utilizando anticuerpos, PCR, hibridación y otros métodos de detección conocidos por los expertos en la técnica.

- 30 Otro kit incluido en la presente descripción puede proporcionar reactivos para la detección de anticuerpos contra epítomos particulares. Tales reactivos son útiles para analizar una muestra para detectar la presencia de anticuerpos, y son fácilmente conocidos y están disponibles para un experto en la técnica. La presencia de anticuerpos se puede determinar utilizando métodos de detección convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los kits pueden incluir un conjunto de instrucciones impresas, o una etiqueta que indica que el kit es útil para la detección de animales infectados.

Estrategias generales de clonación y construcciones de vacunas/antígenos

- 35 **F. Antígeno CM8 (SEC ID NO: 7) de *F. psychrophilum***

El gen donador era una secuencia génica de 276 pb (Fp91), que codificaba una forma truncada de 86 aa de la proteína de unión a ADN similar a histona de 91 aa (denominada 8) de *F. psychrophilum* (Núm. Acceso GenBank™ AAR29587).

- 40 Aguas arriba del gen de la Proteína Similar a Histona hay una secuencia líder, denominada C. La secuencia C codifica un fragmento de 90 aminoácidos del precursor de la proteína de unión a celulosa de *Clostridium cellulovorans*; el precursor de la proteína de unión a celulosa del cual deriva C consiste en 1848 aminoácidos (Núm. de Acceso GenBank™ P38038). La secuencia C está seguida por 6 aminoácidos adicionales derivados de una secuencia de ADN que contiene los sitios de restricción *Bam* HI y *Nde* I con un espaciador corto entre ellos. El fragmento de péptido de 90 aminoácidos C se utiliza para facilitar la expresión de alto nivel y asegurar la insolubilidad de la proteína diana como cuerpos de inclusión en *E. coli*.

Inmediatamente después de la secuencia líder C está el fragmento M, que codifica un péptido inmunoestimulador de 15 aminoácidos del péptido de fusión del virus del sarampión (MVF) (GenBank™ M81903) (L S E I K G V I V H R L E G V). El segmento de ADN M (que representa un epítipo de células T) se optimizó para la expresión de alto nivel en *E. coli* (Kuzyk, Burian et al. 2001).

- 50 Ninguno de los fragmentos de ADN tenía elementos reguladores. Las señales transcripcionales y traduccionales específicas para *E. coli* fueron proporcionadas por los plásmidos de expresión.

El casete de expresión consiste en una secuencia del sitio de unión al ribosoma, una secuencia líder del péptido C, el epítipo de células T "M" y el gen (Fp91) de *F. psychrophilum* que codifica el antígeno proteico "8" y se construyó de la siguiente manera:

El péptido de fusión N-terminal se fusionó con el gen donador en un esfuerzo por facilitar altos niveles de expresión en *E. coli*. El fragmento "C", que codifica el péptido líder C y un sitio de unión al ribosoma (RBS), se clonó entre los sitios *Xba*I y *Bam* HI de pET21a(+) (Novagen) que dan como resultado el plásmido pETC. El fragmento relevante "C" se sintetizó utilizando cuatro oligonucleótidos solapantes y la técnica de PCR. El resultado de la reacción de PCR fue un fragmento de ADN 5'-*Xba*I-RBS-C-*Hind* III-3'.

El gen del antígeno diana de *F. psychrophilum* fue identificado como una Proteína Similar a Histona. La técnica de PCR se utilizó para crear el gen de *F. psychrophilum* de interés con sitios de enzimas de restricción flanqueantes. El ADN amplificado por PCR se clonó en el plásmido pBCKS-V como fragmentos *Bam* HI-*Hind* III que daban como resultado pBCKS-V-8. El fragmento 8 fue clonado a continuación a partir de pBCKS-V-8 como un fragmento *Bam* HI-Ase I en el plásmido pETC digerido con *Bam* HI y *Nde* I dando como resultado pETC8.

El epítipo del virus del sarampión (M) se clonó en pETC8 entre el péptido C y el gen "8" de *F. psychrophilum* como sigue: la región codificante M se eliminó de pBCKS-VM por digestión con *Bam* HI y Ase I y se subclonó en el sitio *Bam* HI y *Nde* I de pETC8, dando como resultado pETCM8 (Ase I y *Nde* I producen extremos de ADN cohesivos, que pueden ser ligados con la ADN ligasa). El plásmido pETCM8 es un vector de expresión T7 basado en pET21a(+).

La expresión del casete de proteína recombinante CM8 se verificó tras la inducción del promotor T7.

La proteína resultante se designó antígeno "rHLP de *F. psychrophilum* " o "rHLP" que se utilizó en los ejemplos siguientes y se describe en SEQ ID NO: 7.

CONSTRUCCIÓN de IPNV

El segmento genómico A de IPNV contiene tres genes dispuestos en el orden 5'-VP2-NS-VP3-3'. VP2 codifica la glicoproteína de superficie de IPNV. El segmento designado VP2', que consiste en 1-257 aminoácidos de VP2 fue seleccionado para el desarrollo de una vacuna.

La secuencia de ADN que incluía VP2c y las secuencias de epítipos de células T seleccionadas se sintetizó utilizando un método de solapamiento de oligonucleótidos y se verificó por métodos de secuenciación de ADN.

Casete de antígeno VP2c:

La secuencia de ADN que codifica el casete de antígeno de rIPNV designado "VP2c" se diseñó de la siguiente manera: secuencia de ADN que contiene sitios de restricción *Bam* HI y *Nde* I seguido por el fragmento VP2c que codifica 1-257 aminoácidos de la proteína viral VP2 más la secuencia de aminoácidos "KKKAKKQL"; y finalmente secuencia de ADN que contiene los sitios de restricción *Vsp* I y *Hind* III.

Casete de expresión CTMVP2c en el plásmido de producción pKLPR-CTMVP2c:

La secuencia de ADN que codifica la proteína recombinante diana CTMVP2c se diseñó de la siguiente manera: la secuencia C líder codifica 90 aminoácidos derivados del precursor de la proteína A de unión a celulosa de *Clostridium cellulovorans* (Núm. de Acceso GenBank™ P38038); está seguida por 6 aminoácidos adicionales derivados de una secuencia de ADN que contiene los sitios de restricción *Bam* HI y *Nde* I; esto está seguido de la secuencia de ADN que codifica el epítipo promiscuo de células T del epítipo P2 (830-844) de la toxina tetánica (tt) de *Clostridium tetani* (GenBank™ AA037454) designado "T" (Q Y I K A N S K F I G I T E L); seguido del epítipo promiscuo de células T del virus del sarampión (288-302) (GenBank™ M81903), designado "M" (L S E I K G V I V H R L E G V); esto está seguido de la secuencia de ADN que codifica VP2c y finalmente la secuencia de ADN que contiene los sitios de restricción *Vsp* I y *Hind* III.

El organismo receptor *Escherichia coli* BL21 contenía un solo plásmido, pKLPR-CTMVP2c, que contenía el casete de expresión CTMVP2c que expresaba la proteína recombinante de la vacuna IPNV. Este casete de expresión consiste en una secuencia del sitio de unión al ribosoma, una secuencia líder de la proteína C, una secuencia VP2c del antígeno IPNV precedida de secuencias inmunoestimuladoras de la proteína de fusión del virus del sarampión y la toxina tetánica. Los detalles de la construcción se describen a continuación.

El casete de antígeno VP2c fue sintetizado por TOP Gene Technologies, Quebec, Canadá, basándose en una secuencia de ADN diseñada por Microtek Research and Development Ltd. La secuencia relevante es una secuencia consenso de un fragmento del gen VP2 de varios productos aislados recientes de serotipos SP de IPNV de Chile y Noruega. La secuencia de ADN sintético administrada se clonó como un fragmento *Bam* HI - *Hind* III en el plásmido pBCKS-V (plásmido utilizado para transportar casetes de clonación/expresión) para las siguientes etapas de construcción que dan como resultado el plásmido pBCKS-VP2c.

Para crear un casete de expresión, VP2c se movió de pBCKS-VP2c a pETC como un fragmento *Bam* HI- *Hind* III resultante del plásmido pETC-VP2c. Los casetes que portaban epítipos de células T promiscuas M y T, escindidos de pBCKS-V-M y pBCKS-V-T como fragmentos *Bam* HI - *Vsp* I, fueron insertados con posterioridad secuencialmente en pET-VP2c digerido con *Bam* HI y *Nde* I dando como resultado el plásmido pETC-MVP2c y finalmente el plásmido

pETC-TMVP2c.

En la etapa final de construcción, el casete de expresión de ADN que codifica la proteína de fusión CTMVP2c con el sitio de unión al ribosoma apropiado se escindió de pETC-TMVP2c como un fragmento de restricción *Xba* I - *Xho* I y se clonó en los sitios *Xba* I y *Sal* I del plásmido de expresión de producción pKLPR-8 (vector de expresión del plásmido patentado de Microtek R&D Ltd.) que da como resultado el plásmido de producción final pKLPR-CTMVP2c.

Como en SEQ ID NO: 8, el casete de expresión CTMVP2c expresaba una secuencia de aminoácidos que consistía en la proteína C N-terminal, el epítipo de la proteína de fusión del virus del sarampión inmunoestimulador, el epítipo de la proteína de la toxina del tétanos, la secuencia VP2 como se describió anteriormente.

La proteína resultante se designó antígeno "rVP2 de IPNV" que se usó en los ejemplos a continuación y se describe en SEQ ID NO: 8.

La proteína de fusión entre las composiciones inmunogénicas rVP2 y rHLP se construyó y expresó utilizando materiales y métodos similares a los utilizados en las construcciones de vacunas de inmersión individuales y se recuperó como cuerpos de inclusión de *E. coli*. La secuencia de la proteína de fusión como se emplea en los presentes ejemplos se muestra en SEQ ID NO: 9.

Ejemplos

Ejemplo 1. Vacunación por inmersión de alevines de salmón atlántico (*Salmo salar*) con vacunas de IPNV monovalentes (rVP2 de IPNV) y vacunas de *Flavobacterium psychrophilum* (antígeno vacunal rHLP)-antígeno vacunal VP2 de IPNV.

El objetivo principal de este estudio fue determinar si una vacuna de IPNV monovalente y una vacuna de Proteína Similar a Histona (HLP) de *F. psychrophilum*:VP2 de IPNV bivalente, cuando se administraban por inmersión a alevines de salmón del Atlántico, podrían inducir una protección significativa contra una sensibilización letal con IPNV. En este estudio, se probaron 2 dosis de una vacuna monovalente por inmersión de IPNV. Además, también se evaluaron dos tipos de formulaciones bivalentes, para investigar si la inclusión de un componente vacunal de *F. psychrophilum* interferiría en la protección contra IPNV. Los peces se adquirieron de Australis S.A. Farmed (Peñaflor, Chile), se probó que no tenían patógenos antes de su uso, y tenían un peso medio de aproximadamente 0,5 g en el momento de la sensibilización. Los peces fueron alojados en tanques de 21 L hasta la selección aleatoria para la vacunación. Después de 1 semana de aclimatación, todos los peces se transfirieron a matraces de 1 L y se vacunaron con las vacunas como se describe en la Tabla 1, durante 2 minutos. Los vacunados fueron devueltos a tanques de 21 L hasta la sensibilización. La sensibilización se produjo a 400 grados día (un "grado día" = °C x número de días en espera; 400 grados día = 12°C x ~34 días), y se realizó por inmersión en un tanque de 9 L durante 2 horas. La cepa de sensibilización fue la cepa Sp de IPNV, recientemente aislada de Chile; se utilizaron 10⁵ ufp/ml de IPNV. Los grupos de control se sometieron a las mismas condiciones que los vacunados (es decir, vacunación en matraces de 1 L durante 2 minutos; sensibilización en tanques de 9 L durante 2 horas). Después de la sensibilización, los peces fueron devueltos a tanques de 21 L, donde la temperatura del agua se mantuvo a 12 ± 2°C. A los peces se les ofreció hasta 1% de peso corporal diariamente de forma manual de alimento apropiado para peces.

Las vacunas (Tabla 1) se prepararon como sigue:

1) La proteína similar a histona de *F. psychrophilum* recombinante (rHLP) se expresó como cuerpos de inclusión insolubles en células de *Escherichia coli* BL21, que a continuación se hicieron pasar a través de un microfluidificador, y la proteína insoluble se purificó parcialmente por centrifugación. La suspensión de proteínas se almacenó a 4-6°C en EDTA 0,5 mM. Se calculó que la concentración de HLP en la suspensión de cuerpos de inclusión (mediante SDS PAGE, densitometría de barrido y comparación con los estándares BSA) era de 1,76 µg/µl.

2) La rHLP de *F. psychrophilum* recombinante tratada con ácido se expresó como cuerpos de inclusión insolubles, en 3 rondas de fermentador separadas. La suspensión lavada final de los cuerpos de inclusión se trató para variar el pH con HCl concentrado, seguido de NaOH 10 N, para devolver el pH a 7. Las células se lisaron con timol/EDTA y se hicieron pasar a través de un microfluidificador. Para concentrar la preparación insoluble de los cuerpos de inclusión y eliminar el timol, se filtró la suspensión de proteínas y se hicieron pasar 10 volúmenes de agua estéril a través de la unidad de filtración. Se calculó que la concentración de HLP en la suspensión de los cuerpos de inclusión era de 0,72 µg/µl.

3) Una proteína de fusión recombinante, que consistía en HLP de *F. psychrophilum* fusionada a VP2 de IPNV, se expresó como cuerpos de inclusión insolubles en células *E. coli* BL21. Las células se lisaron con timol/EDTA y se hicieron pasar a través de un microfluidificador. La proteína insoluble se purificó parcialmente por centrifugación y se resuspendió en solución de timol/EDTA. La preparación de los cuerpos de inclusión se lavó a continuación seis veces por centrifugación para eliminar el timol, se resuspendió en EDTA estéril 0,05 mM y se almacenó a 4-6°C. Se calculó que la concentración de la proteína de fusión era de 10,02 µg/µl.

4) VP2 de IPNV recombinante se expresó como cuerpos de inclusión insolubles en células *E. coli* BL21. Las

células se lisaron con timol/EDTA y se hicieron pasar a través de un microfluidificador. La proteína insoluble se purificó parcialmente por centrifugación y se resuspendió en solución de timol/EDTA. La preparación de los cuerpos de inclusión se lavó a continuación seis veces por centrifugación para eliminar el timol, se resuspendió en EDTA estéril 0,05 mM y se almacenó a 4-6°C. Se calculó que la concentración de la proteína VP2 de IPNV era de 10,90 µg/µl.

Tabla 1. Formulación de vacunas.

Vacuna	Composición
A	rVP2 de IPNV; 100 µg
B	rVP2 de IPNV; 200 µg
C	rVP2 de IPNV; 100 µg + rHLP de <i>F. psychrophilum</i> ; 50 µg
D	<i>F. psychrophilum</i> rHLTPNV rVP2 (proteína de fusión); 124 µg
	(equivalente molar a 100 µg de rVP2, 50 µg de rHLP) (SEQ ID NO: 9)

Para la construcción de las composiciones de vacuna de cuerpos de inclusión descritas anteriormente, un experto en la técnica comprenderá fácilmente que ciertas características se pueden reemplazar sin apartarse del espíritu de la invención. Por ejemplo, se pueden insertar secuencias líder alternativas y se pueden proporcionar epítomos de células T adicionales o diferentes con los antígenos rHLP y/o rVP2.

Las formulaciones de vacuna en el Ejemplo 1 se administraron a concentraciones de la misma manera que se describe a continuación para el Ejemplo 2. Después de la sensibilización, se realizó un seguimiento de todos los grupos durante 28 días, momento en el que no hubo mortalidad durante 3 días consecutivos en ninguno de los grupos de sensibilización. Cada mortalidad se examinó externamente para detectar indicaciones de la enfermedad. Después de la observación externa, los peces fueron necropsiados y examinados internamente. La confirmación en el cultivo de tejidos de la infección por IPNV se realizó en un grupo de 5 peces de cada tanque al final del estudio.

El mismo día de la sensibilización, se recogió y agrupó sangre de 20 peces por grupo, para aislar el suero. Los ensayos de seroneutralización se llevaron a cabo en los sueros recogidos, para evaluar la respuesta de anticuerpos.

Este experimento se habría considerado nulo si se hubiera producido cualquiera de los siguientes supuestos:

(1) Si hubiera habido cualquier fallo en la instalación de prueba que diera como resultado una mortalidad significativa en los grupos de vacuna o en los grupos de control.

(2) Si se hubiera determinado que se habían producido desviaciones significativas del protocolo.

No se produjeron tales fallos.

Se calculó el porcentaje de mortalidad, a partir de aquellas mortalidades que se determinó que se habían producido como resultado del organismo de sensibilización, de la siguiente manera:

$$\% \text{ Mortalidad} = \{1 - (\text{mortalidad debida a la sensibilización}) / (\text{total de peces sensibilizados})\} \times 100$$

El porcentaje relativo de supervivencia (PRS) se calculó al final del ensayo, cuando la mortalidad de control en los peces infectados alcanzó >70%, utilizando la fórmula descrita anteriormente.

$$\text{PRS} = \{1 - (\% \text{ mortalidad de los vacunados} / \% \text{ mortalidad de control})\} \times 100$$

Resultados

Ochenta y cinco peces por grupo fueron vacunados con cuatro vacunas diferentes por duplicado: 2 de una vacuna VP2 de IPNV monovalente y 2 de una vacuna de *F. psychrophilum* rHLTPNV rVP2 bivalente. No se observó mortalidad durante la vacunación. Todos los grupos de peces estaban sanos en el punto de sensibilización. Se observó que los grupos de control eran más activos y se alimentaban mejor, en comparación con los grupos vacunados.

El mismo día de la sensibilización, se recogió y agrupó sangre y de 20 peces por grupo, y se aisló el suero. Las respuestas de anticuerpos, evaluadas mediante ensayos de seroneutralización, mostraron que las vacunas de

inmersión no provocaban una respuesta de anticuerpos detectable en alevines de salmón atlántico.

Se sensibilizaron grupos de 65 peces por grupo de vacuna por duplicado con IPNV, con la excepción de los grupos de control negativo. Todos los peces fueron necropsiados. Todas las mortalidades por tanque se agruparon (agrupamientos de hasta 5) y se analizaron para detectar IPNV. Todos los grupos sensibilizados por inmersión dieron positivo para IPNV. La mortalidad acumulada y el porcentaje relativo de supervivencia (PRS) de cada grupo de peces se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Mortalidad y PRS en grupos de 65 alevines de salmón atlántico (0,5 g) sensibilizados con IPNV

Vacuna	% de Mortalidad Cumulativa	% de Mortalidad Promedio	%PRS	% Mortalidad (-) control	%PRS (-) control
A	29	36	53	18	70
A	43				
B	44	51	34	33	44
B	57				
C	31	42	45	24	59
C	53				
D	59	55	29	37	37
D	51				
(-) control	(15)*	18	77	0	100
(-) control	(21)*				
(+) control	(74)*	77	-	59	-
(+) control	(79)*				

* Mortalidades en el grupo de control infectado (-) que dieron negativo a la presencia de IPNV

Los resultados del aislamiento del IPNV a partir de los agrupamientos de 5 peces por tanque al final del ensayo confirmaron que los peces estaban infectados con el virus. Lo mismo se observó en las necropsias.

Los peces control (-) (no vacunados y no sensibilizados) alcanzaron niveles de mortalidad de 15% y de 21% al final del ensayo (promedio = 18%). En estudios en peces más grandes, la mortalidad normal de fondo alcanza aproximadamente 5%. Se realizaron necropsias en todas las mortalidades, y no se confirmó infección bacteriana o viral en las mortalidades de control (-). Por lo tanto, se cree que este nivel de mortalidad de fondo se debe a una compilación de estrés durante el manejo y al pequeño tamaño del pez (0,5 g). Por lo tanto, esta mortalidad de fondo se restó de todos los grupos con el fin del cálculo de PRS, a pesar de que todos los demás grupos dieron positivo para IPNV.

Conclusiones

La vacunación por inmersión condujo a una disminución de la mortalidad en todos los grupos de alevines de salmón atlántico. En grupos duplicados, la vacuna A (rVP2 de IPNV) proporcionó el nivel más alto de protección en los alevines de salmón atlántico, con un PRS promedio de 70%. La vacuna C (rVP2 de IPNV + rHLP de *F. psychrophilum*) proporcionó los segundos mejores resultados en general, con un PRS promedio de 59%. Los dos niveles de dosis diferentes de la vacuna monovalente (rVP2 de IPNV) proporcionaron diferentes niveles de protección, y el nivel de dosis más bajo (Vacuna A) proporcionó una mejor protección que el nivel de dosis más alto (Vacuna B). Las dos formulaciones bivalentes diferentes (Vacuna C; Vacuna D), administradas al mismo nivel de dosis relativa, proporcionaron diferentes niveles de protección, ofreciendo la Vacuna C niveles de protección más altos que la Vacuna D.

Ejemplo 2 Vacunación por inmersión de alevines de trucha arcoíris contra *Flavobacterium psychrophilum*.

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la eficacia de una vacuna de proteína similar a histona (HLP) de *F. psychrophilum* recombinante (rHLP) en varias dosificaciones, así como diferentes formulaciones bivalentes de un Vacuna de HLP de *F. psychrophilum* recombinante (rHLP) y rVP2 de IPNV, todas como vacunas de inmersión en

trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los peces se adquirieron de Spring Valley Trout Farm (Langley, B.C.) y tenían pesos medios de 0,4 g, 0,6 g y 1,0 g en el momento de la vacunación. Se alojaron en un tanque exterior de 390 L durante 1 mes, hasta la selección aleatoria para la pre-sensibilización y vacunación. Las vacunas (Tabla 1) se prepararon como sigue:

1) La proteína similar a histona de *F. psychrophilum* recombinante (rHLP) se expresó como cuerpos de inclusión insolubles en células *Escherichia coli* BL21, que a continuación se hicieron pasar a través de un microfluidificador, y la proteína insoluble se purificó parcialmente por centrifugación. La suspensión de proteínas se almacenó a 4-6°C en EDTA 0,5 mM. Se calculó que la concentración de HLP en la suspensión de los cuerpos de inclusión (mediante SDS PAGE, densitometría de barrido y comparación con los patrones de BSA) era de 1,76 µg/µl.

2) La rHLP recombinante de *F. psychrophilum* tratada con ácido se expresó como cuerpos de inclusión insolubles, en 3 rondas de fermentador separadas. La suspensión lavada final de los cuerpos de inclusión se trató para variar el pH con HCl concentrado, seguido de NaOH 10 N, para devolver el pH a 7. Las células se lisaron con timol/EDTA y se hicieron pasar a través de un microfluidificador. Para concentrar la preparación insoluble de los cuerpos de inclusión y eliminar el timol, se filtró la suspensión de proteínas y se hicieron pasar 10 volúmenes de agua estéril a través de la unidad de filtración. Se calculó que la concentración de HLP en la suspensión de los cuerpos de inclusión era de 0,72 µg/µl.

3) Una proteína de fusión recombinante, que consistía en HLP de *F. psychrophilum* fusionada a VP2 de IPNV, se expresó como cuerpos de inclusión insolubles en células *E. coli* BL21. Las células se lisaron con timol/EDTA y se hicieron pasar a través de un microfluidificador. La proteína insoluble se purificó parcialmente por centrifugación y se resuspendió en solución de timol/EDTA. La preparación de los cuerpos de inclusión se lavó a continuación seis veces por centrifugación para eliminar el timol, se resuspendió en EDTA estéril 0,05 mM y se almacenó a 4-6°C. Se calculó que la concentración de la proteína de fusión era de 10,02 µg/µl.

4) VP2 de IPNV recombinante se expresó como cuerpos de inclusión insolubles en células *E. coli* BL21. Las células se lisaron con timol/EDTA y se hicieron pasar a través de un microfluidificador. La proteína insoluble se purificó parcialmente por centrifugación y se resuspendió en solución de timol/EDTA. La preparación de los cuerpos de inclusión se lavó a continuación seis veces por centrifugación para eliminar el timol, se resuspendió en EDTA estéril 0,05 mM y se almacenó a 4-6°C. Se calculó que la concentración de la proteína VP2 de IPNV era de 10,90 µg/µl.

Tabla 3

Vacuna	Descripción
1	rHLP de <i>F. psychrophilum</i> ; 50 µg/ml (dosis baja)
2	rHLP de <i>F. psychrophilum</i> ; 50 µg/ml (dosis baja) + 103 µg rVP2 de IPNV
3	rHLP de <i>F. psychrophilum</i> : rVP2 de IPNV (proteína de fusión); 124 µg/ml (dosis baja)
4	rHLP de <i>F. psychrophilum</i> , tratada con ácido; 50 µg/ml (dosis baja)
5	rHLP de <i>F. psychrophilum</i> ; 200 µg/ml (dosis alta)
6	rHLP de <i>F. psychrophilum</i> ; 50 µg/ml (dosis baja); alevines pequeños
7	rHLP de <i>F. psychrophilum</i> ; 50 µg/ml (dosis baja); alevines grandes
8	Control no tratado; alevines medianos

Los peces (120/grupo) se transfirieron a continuación a tanques de 32,5 L. Los peces (30 a la vez) se vacunaron por inmersión durante 2 minutos en 1 litro de agua sin cloro que contenía preparaciones de vacuna recombinante de cuerpos de inclusión. Durante las vacunas estuvieron presentes piedras difusoras. Las concentraciones de las preparaciones de cuerpos de inclusión se midieron barriendo un gel SDS-PAGE y comparándolo con los patrones de BSA. Los peces fueron devueltos a los tanques de 32,5 L, y permanecieron allí hasta que fueron sensibilizados. La temperatura del agua se mantuvo constante a 12 ± 1°C, y el flujo continuo de agua a 1,0 lpm.

Los peces fueron sensibilizados por inmersión después de -408 grados día ("dd"; grados día = °C multiplicado por el número de días en espera); se realizó una sensibilización repetida a -588 dd. La cepa de sensibilización de *F. psychrophilum* (cepa C594) se cultivó a partir de material congelado en agar a 15°C. Después de 6 días de incubación a 15°C, las células se rasparon de las placas y se resuspendieron en solución salina estéril a 15°C. Las células fueron resuspendidas a una DO₆₀₀ final de 8,4, y mantenidas a 15°C. Antes de la sensibilización, los peces se anestesiaron y se transfirieron a una mesa, colocándolos sobre su lado derecho, cabeza hacia la izquierda, con el lado izquierdo hacia arriba. Se limpió la mucosidad del área del pedúnculo con una cuchilla de bisturí limpia que se mantuvo a 45°, limpiando 3 veces de izquierda a derecha desde debajo de la aleta adiposa hasta la base de la cola. Después de este tratamiento, se transfirieron al tanque de inmersión de 1L. Una vez que todos los peces por grupo estaban en el tanque de inmersión, se añadió *F. psychrophilum* a una OD₆₀₀ final de 0,1. Se suministró aire al tanque, y los peces permanecieron en la suspensión que contenía *F. psychrophilum* durante 1 hora, después de lo cual se transfirieron a tanques de sensibilización de 14,3 litros.

Se realizó un seguimiento de los peces durante 14 días, hasta que no se observó mortalidad en ninguno de los grupos durante 3 días consecutivos. A los peces se les ofreció 1% de su peso corporal al día (excepto 24 horas antes y después de moverlos, y durante la sensibilización) de BioClark Fry Feed (Longview, WA). Se realizaron necropsias en aproximadamente 70% de las mortalidades que se produjeron. El tejido renal de la mortalidad se extendió sobre agar para cultivar el organismo de sensibilización. El porcentaje relativo de supervivencia (PRS) se calculó de la siguiente manera:

$$PRS = \{1 - (\% \text{ mortalidad de los vacunados} / \% \text{ mortalidad de control})\} \times 100$$

Resultados

La vacunación de alevines pequeños (0,4 g) dio como resultado un PRS negativo, mientras que la vacunación de alevines medianos (0,6 g) y grandes (1,0 g) dio como resultado protección (Tabla 4). La dosis alta de vacuna monovalente en alevines de tamaño mediano produjo una mortalidad promedio de 12% (10% y 13%), en comparación con la mortalidad de 35% (23% y 47%) en el grupo de dosis baja. Los alevines grandes (1 g en la vacunación) parecieron funcionar muy bien con la vacuna de dosis baja. Sin embargo, se necesita un gran control de alevines para descartar el efecto del tamaño sobre la sensibilización. Se utilizaron peces de tamaño mediano para calcular el PRS, ya que este era el tamaño del único grupo de control.

Discusión

Los alevines grandes recibieron solo la vacuna de dosis baja, pero parecieron tener el mejor rendimiento general. Dos posibles explicaciones son que: (1) Los peces vacunados de 1 g son capaces de generar una respuesta inmunitaria más eficaz que los peces vacunados de 0,6 g, y por lo tanto responden mucho mejor a la vacuna de dosis baja; o (2) A los alevines más grandes les va mejor durante la sensibilización en comparación con los controles de tamaño mediano. En el momento de la sensibilización, los alevines grandes tenían un tamaño mucho más cercano a los controles no sometidos a tratamiento previo de tamaño mediano (2,3 g frente a 2,1 g a 588 dd, 10% más grandes; 1,9 g frente a 1,6 g a 408 dd, 19% más grandes) de lo que eran en el momento de la vacunación (1 g frente a 0,6 g, 67% más grandes). Los peces de tamaño mediano se vacunaron con la vacuna de rHLP de dosis baja (50 ug/ml) o alta (200 ug/ml). Cuando fueron sensibilizados a 408 dd, los grupos de dosis altas funcionaron mucho mejor, con valores de PRS de 77% y 69%, en comparación con 46% y -8%.

No se observó interferencia negativa cuando se mezcló un segundo antígeno (rVP2 de IPNV) con el antígeno rHLP de *Flavobacterium*. De hecho, la mezcla, que contenía más proteína en general, pero la misma dosis de rHLP, parecía proporcionar una mayor protección que la rHLP monovalente sola, con valores de PRS de 69% y 46% para la mezcla, en comparación con 46% y 53% de PRS para la monovalente a 408 dd. Sin embargo, los resultados para la proteína de fusión fueron desiguales, con valores de PRS de 62% y 8% a 408 dd.

Tabla 4. Efecto de la vacunación sobre % de mortalidad y PRS.

Vacuna	Tamaño de vacunación (g)	Sensibilización a 408 dd*			Sensibilización a 538 dd		
		Tamaño de la sensibilización (g)	% Mortalidad	PRS	Tamaño de la sensibilización (g)	% Mortalidad	PRS
(pre-sensibilización)	-	1,7	50	-			
8	0,6	1,6	50	-	2,1	16	-
8	0,6	1,6	37	-	2,1	28	-

		Sensibilización a 408 dd*			Sensibilización a 538 dd		
Vacuna	Tamaño de vacunación (g)	Tamaño de la sensibilización (g)	% Mortalidad	PRS	Tamaño de la sensibilización (g)	% Mortalidad	PRS
7	1	1,9	3	92	2,3	4	82
7	1	1,9	0	100	2,3	4	82
1	0,6	1,6	23	46	1,8	32	-45
1	0,6	1,6	47	53	1,8	16	27
6	0,4	1,2	60	-38	1,5	68	-209
6	0,4	1,2	63	-46	1,5	64	-191
4	0,6	1,6	7	85	1,9	32	-45
4	0,6	1,6	33	23	1,9	8	64
5	0,6	1,6	10	77	2,0	0	100
5	0,6	1,6	13	69	2,0	16	27
2	0,6	1,6	13	69	1,8	12	45
2	0,6	1,6	23	46	1,8	24	-9
3	0,6	1,6	17	62	1,7	48	-118
3	0,6	1,6	40	8	1,7	24	-9
* Tamaño de la sensibilización a 408 dd medido a partir de alevines sobrantes en el mismo grupo 4 días después de la sensibilización							

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Zoetis LLC Zoetis LLC

<120> VACUNAS DE INMERSIÓN EN SUBUNIDADES PARA PECES

5 <130> PC71932

<150> US 61/705,704

10 <151> 26-09-2012

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1

<211> 270

<212> DNA

<213> Flavobacterium sp.

20 <400> 1

atgaacaaat cagatttaat cgatgcaatg gctgctgatg caggaatttc aaaggctgct 60

gctaaagctg ctttagactc ttttaacgaat aatattaccg ctactttaaa gaaaggatgat 120

aaagttgctt tagttggatg gggaacttgg tctgtatcac aaagagctgc taggactggt 180

agaaatccac aaacaggagc cgaaattaat attgctgcta aaaatgtagt taagtttaaa 240

gctggagctg gattaagtga tgctgtaaac 270

<210> 2

25 <211> 90

<212> PRT

<213> Flavobacterium sp.

<400> 2

Met Asn Lys Ser Asp Leu Ile Asp Ala Met Ala Ala Asp Ala Gly Ile

1 5 10 15

Ser Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Leu Asp Ser Leu Thr Asn Asn Ile

20 25 30

Thr Ala Thr Leu Lys Lys Gly Asp Lys Val Ala Leu Val Gly Trp Gly

35 40 45

Thr Trp Ser Val Ser Gln Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln

50 55 60

Thr Gly Ala Glu Ile Asn Ile Ala Ala Lys Asn Val Val Lys Phe Lys

65 70 75 80

Ala Gly Ala Gly Leu Ser Asp Ala Val Asn

85 90

30 <210> 3

<211> 273

<212> DNA

<213> Flavobacterium sp.

35 <400> 3

ES 2 792 124 T3

atgaacaaat cagatttaat cgatgctatg gctgctgatg caggaattac taaagctgct 60
gcaaaggctg cattagagtc atttttaagt aatgttgaag gaactttaag taaagggtgg 120
aaagttgctt tagtaggatt cggatcatgg tcagtatcta caagagcggc tagagaagga 180
agaaatcccc aaacagggaa cactattaaa attgaagcta aaaacgtagt aaaatttaaa 240
gcaggtgctg aattagaaat agcagtaaat aaa 273

<210> 4
<211> 91
<212> PRT
<213> Flavobacterium sp.

<400> 4
Met Asn Lys Ser Asp Leu Ile Asp Ala Met Ala Ala Asp Ala Gly Ile
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ser Phe Leu Ser Asn Val
20 25 30

Glu Gly Thr Leu Ser Lys Gly Gly Lys Val Ala Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Ser Trp Ser Val Ser Thr Arg Ala Ala Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Asn Thr Ile Lys Ile Glu Ala Lys Asn Val Val Lys Phe Lys
65 70 75 80

Ala Gly Ala Glu Leu Glu Ile Ala Val Asn Lys
85 90

<210> 5
<211> 258
<212> DNA
<213> Flavobacterium sp.

<400> 5
atgaacaaat cagatttaat cgatgcaatg tcagcttcag ctggaattac aaaagctgct 60
gccaaattag ccttagaatc attttttaggc aatattgaag aaactttgca aaaagggtgga 120
agagtttctc tagttggatt tggatcttgg tctgtatcta acagagctgc aagagacgga 180
agaaaccac aaacaggagc aacaattaaa attgctgcta aaaacgtagt gaaatttaaa 240
gcaggtgctg aattagaa 258

<210> 6
<211> 86
<212> PRT
<213> Flavobacterium sp.

<400> 6

ES 2 792 124 T3

Met Asn Lys Ser Asp Leu Ile Asp Ala Met Ser Ala Ser Ala Gly Ile
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Ala Lys Leu Ala Leu Glu Ser Phe Leu Gly Asn Ile
20 25 30

Glu Glu Thr Leu Gln Lys Gly Gly Arg Val Ser Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Ser Trp Ser Val Ser Asn Arg Ala Ala Arg Asp Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Ala Thr Ile Lys Ile Ala Ala Lys Asn Val Val Lys Phe Lys
65 70 75 80

Ala Gly Ala Glu Leu Glu
85

<210> 7

<211> 198

<212> PRT

<213> flavobacterium psychrophilum

<400> 7

Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser
1 5 10 15

Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn
20 25 30

Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln
35 40 45

Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser
50 55 60

Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr
65 70 75 80

Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Leu Asp Pro Ser His Met
85 90 95

10

ES 2 792 124 T3

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val Ile
100 105 110

Met Asn Lys Ser Asp Leu Ile Asp Ala Met Ser Ala Ser Ala Gly Ile
115 120 125

Thr Lys Ala Ala Ala Lys Leu Ala Leu Glu Ser Phe Leu Gly Asn Ile
130 135 140

Glu Glu Thr Leu Gln Lys Gly Gly Arg Val Ser Leu Val Gly Phe Gly
145 150 155 160

Ser Trp Ser Val Ser Asn Arg Ala Ala Arg Asp Gly Arg Asn Pro Gln
165 170 175

Thr Gly Ala Thr Ile Lys Ile Ala Ala Lys Asn Val Val Lys Phe Lys
180 185 190

Ala Gly Ala Glu Leu Glu
195

<210> 8
<211> 397
<212> PRT
<213> sintético

<400> 8
Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser
1 5 10 15

Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn
20 25 30

Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln
35 40 45

Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser
50 55 60

Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr
65 70 75 80

Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Leu Asp Pro Ser His Met
85 90 95

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Ile
100 105 110

ES 2 792 124 T3

Met Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
115 120 125

Ile Met Asn Thr Asn Lys Ala Thr Ala Thr Tyr Leu Lys Ser Ile Met
130 135 140

Leu Pro Glu Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Ile Thr Glu Arg
145 150 155 160

His Ile Leu Lys Gln Glu Thr Ser Ser Tyr Asn Leu Glu Val Ser Glu
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ile Leu Val Ser Phe Pro Gly Ala Pro Gly Ser Arg
180 185 190

Ile Gly Ala His Tyr Arg Trp Asn Ala Asn Gln Thr Gly Leu Glu Phe
195 200 205

Asp Gln Trp Leu Glu Thr Ser Gln Asp Leu Lys Lys Ala Phe Asn Tyr
210 215 220

Gly Arg Leu Ile Ser Arg Lys Tyr Asp Ile Gln Ser Ser Thr Leu Pro
225 230 235 240

Ala Gly Leu Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Leu Asn Ala Ala Thr Phe Glu
245 250 255

Gly Ser Leu Ser Glu Val Glu Ser Leu Thr Tyr Asn Ser Leu Met Ser
260 265 270

Leu Thr Thr Asn Pro Gln Asp Lys Val Asn Asn Gln Leu Val Thr Lys
275 280 285

Gly Val Thr Val Leu Asn Leu Pro Thr Gly Phe Asp Lys Pro Tyr Val
290 295 300

Arg Leu Glu Asp Glu Thr Pro Gln Gly Leu Gln Ser Met Asn Gly Ala
305 310 315 320

Lys Met Arg Ser Thr Ala Ala Ile Ala Pro Arg Arg Tyr Glu Ile Asp
325 330 335

Leu Pro Ser Gln Arg Leu Pro Pro Val Thr Ala Thr Gly Ala Leu Thr
340 345 350

Thr Leu Tyr Glu Gly Asn Ala Asp Ile Val Asn Ser Thr Thr Val Thr
355 360 365

Gly Asp Ile Asn Phe Ser Leu Ala Glu Gln Pro Ala Val Glu Thr Lys
370 375 380

Phe Asp Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gln Leu Ile Asn
385 390 395

<211> 482
<212> PRT
<213> sintético

5

<400> 9

```

Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln Thr Asn Ser
1          5          10          15

Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu Asn
          20          25          30

Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln
          35          40          45

Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser
50          55          60

Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr
65          70          75          80

Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Leu Asp Pro Ser His Met
          85          90          95

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Ile
          100          105          110

Met Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
          115          120          125

Ile Met Asn Thr Asn Lys Ala Thr Ala Thr Tyr Leu Lys Ser Ile Met
          130          135          140

Leu Pro Glu Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Ile Thr Glu Arg
145          150          155          160

His Ile Leu Lys Gln Glu Thr Ser Ser Tyr Asn Leu Glu Val Ser Glu
          165          170          175

Ser Gly Ser Gly Ile Leu Val Ser Phe Pro Gly Ala Pro Gly Ser Arg

```

ES 2 792 124 T3

180					185					190					
Ile	Gly	Ala	His	Tyr	Arg	Trp	Asn	Ala	Asn	Gln	Thr	Gly	Leu	Glu	Phe
		195					200					205			
Asp	Gln	Trp	Leu	Glu	Thr	Ser	Gln	Asp	Leu	Lys	Lys	Ala	Phe	Asn	Tyr
	210					215					220				
Gly	Arg	Leu	Ile	Ser	Arg	Lys	Tyr	Asp	Ile	Gln	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro
225					230					235					240
Ala	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Asn	Gly	Thr	Leu	Asn	Ala	Ala	Thr	Phe	Glu
				245					250					255	
Gly	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Glu	Ser	Leu	Thr	Tyr	Asn	Ser	Leu	Met	Ser
			260					265					270		
Leu	Thr	Thr	Asn	Pro	Gln	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Thr	Lys
		275					280					285			
Gly	Val	Thr	Val	Leu	Asn	Leu	Pro	Thr	Gly	Phe	Asp	Lys	Pro	Tyr	Val
	290					295					300				
Arg	Leu	Glu	Asp	Glu	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Gln	Ser	Met	Asn	Gly	Ala
305					310					315					320
Lys	Met	Arg	Ser	Thr	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro	Arg	Arg	Tyr	Glu	Ile	Asp
				325					330					335	
Leu	Pro	Ser	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Val	Thr	Ala	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr
			340					345					350		
Thr	Leu	Tyr	Glu	Gly	Asn	Ala	Asp	Ile	Val	Asn	Ser	Thr	Thr	Val	Thr
		355					360					365			
Gly	Asp	Ile	Asn	Phe	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	Pro	Ala	Val	Glu	Thr	Lys
	370					375					380				
Phe	Asp	Lys	Lys	Lys	Ala	Lys	Lys	Lys	Gln	Leu	Ile	Met	Asn	Lys	Ser
385					390					395					400
Asp	Leu	Ile	Asp	Ala	Met	Ser	Ala	Ser	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	Ala	Ala
				405					410					415	
Ala	Lys	Leu	Ala	Leu	Glu	Ser	Phe	Leu	Gly	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Leu
			420					425				430			

ES 2 792 124 T3

Gln Lys Gly Gly Arg Val Ser Leu Val Gly Phe Gly Ser Trp Ser Val
 435 440 445

Ser Asn Arg Ala Ala Arg Asp Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly Ala Thr
 450 455 460

Ile Lys Ile Ala Ala Lys Asn Val Val Lys Phe Lys Ala Gly Ala Glu
 465 470 475 480

Leu Glu

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna de inmersión para inmunizar un pez contra infecciones por *Flavobacteriaceae* que comprende al menos un antígeno aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
2. La vacuna de inmersión de la reivindicación 1, en donde el antígeno es un antígeno recombinante.
- 5 3. La vacuna de inmersión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la composición comprende adicionalmente al menos un segundo antígeno aislado diferente.
4. La vacuna de inmersión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la vacuna consiste en antígenos recombinantes.
- 10 5. La vacuna de inmersión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la vacuna no contiene patógenos vivos atenuados o inactivados.
6. La vacuna de inmersión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente al menos un agente adicional.
7. La vacuna de inmersión de la reivindicación 6, en donde el al menos un agente adicional es una bacterina o un virus vivo atenuado o inactivado.
- 15 8. La vacuna de inmersión de la reivindicación 6, en donde el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, virus de la necrosis hemopoyética infecciosa (IHNV), virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus de la enfermedad del páncreas (PDV) en particular, alfavirus del salmón (SAV), virus de la viruela del salmón y virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV).
- 20 9. Una vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la inmunización de un pez contra una infección por *Flavobacteriaceae*, en donde la inmunización comprende sumergir el pez en la vacuna.