

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 040**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2017 PCT/GB2017/050259**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2017 WO17134441**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2017 E 17704811 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3411064**

54 Título: **Métodos para producir virus**

30 Prioridad:

02.02.2016 GB 201601861

03.11.2016 GB 201618549

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

20.11.2020

73 Titular/es:

BENCHMARK ANIMAL HEALTH LIMITED (100.0%)

Benchmark House 8 Smithy Wood Drive

Sheffield S35 1QN, GB

72 Inventor/es:

TOON, LINDSEY ANN y

HOFFMANN, RALF

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 795 040 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

Métodos para producir virus

5 La presente invención se refiere a métodos para producir y propagar virus, en particular, virus de peces. La invención se refiere también a cultivos celulares para ser usados en métodos para producir y propagar virus para vacunas que comprenden virus preparados mediante los métodos de la misma.

10 El cultivo industrial de peces a través de la acuicultura está en fuerte expansión. Las enfermedades infecciosas provocadas por agentes patógenos constituyen un problema principal que deben superar las instalaciones acuáticas industriales. Los agentes patógenos de peces pueden ser hongos, protozoos, agentes bacterianos o virales, sin embargo, las enfermedades virales son las que provocan una mayor preocupación a los piscicultores, gestores de criaderos y científicos porque son bastante incontrolables y pueden provocar pérdidas económicas significativas.

15 Los peces son susceptibles a una diversidad de infecciones y enfermedades virales, algunas de las cuales incluyen el virus de necrosis pancreática (IPNV), virus de necrosis celular esencial (PCNV), nodavirus o necrosis nerviosa viral (VNN), virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus de necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), virus de manchas blancas de las gambas (WSV), virus del síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV), virus de anemia del salmón infecciosa (ISAV), así como otros de las siguientes familias: *Birnaviridae; Rhabdoviridae; Iridoviridae; Reoviridae; Ortomixovirus; Paramixovirus; Arterivirus; y Picornavirus.*

20 El desarrollo de vacunas eficaces es una solución para la reducción de las elevadas mortalidades y pérdidas económicas que se afrontan debido a las infecciones virales en los peces. Sin embargo, el coste de producir vacunas inactivadas es elevado porque requiere el cultivo de virus en masa seguida de la inactivación.

Los métodos de fabricación de vacunas conocidos en la técnica incluyen el uso de huevos embrionarios (por ejemplo, embriones de aves), cultivos celulares (tejidos) (TC), inoculación de animales vivos y/o uso de animales transgénicos. Son conocidos también métodos de investigación que usan cultivos de plantas, células de insectos o bacterias.

25 Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas. Por ejemplo, aunque el tiempo de producción para las vacunas basadas en células es significativamente reducido en comparación con las vacunas basadas en huevos, las vacunas basadas en células tienen costes de fabricación relativamente elevados y bajos rendimientos en comparación.

30 Son conocidos diversos cultivos celulares para la propagación de virus, por ejemplo, células epiteliooma papiloso de ciprínidos (EPC), trompa caudal de alevines de truchas (BF-2), *Epinephelus coioides* de mero (GF-1), culebras rayadas (SSN-1), aleta caudal de dorada (SAF-1), gónada 2 de trucha arcoíris (RTG-2), cepa K del salmón real embrionario (CHSE-214) y mero asiático (AGK).

La presente invención proporciona métodos mejorados para producir y propagar virus que superen algunos de los problemas de la técnica anterior.

35 El primer aspecto de la presente descripción proporciona un método para propagar un virus que comprende las etapas:

infectar un cultivo celular adecuado con el virus;

cultivar el cultivo celular infectado;

extraer el virus; y

40 opcionalmente, purificar el virus,

en que dicho cultivo celular es un cultivo de células de anguila japonesa.

En realizaciones de la presente invención, el cultivo celular puede comprender una línea celular mixta, es decir, una mezcla de dos o más líneas celulares o una línea celular única.

45 El cultivo de células de anguila japonesa puede comprender un único tipo de célula o una mezcla de dos o más tipos de células. Por ejemplo, el cultivo de células de anguila japonesa puede comprender una célula epitelial y/o una célula de fibroblasto. En algunas realizaciones, el cultivo celular comprende una célula epitelial y una célula de fibroblasto.

Preferentemente, el cultivo celular es el cultivo celular derivado de *Anguilla japonica* denominado *Anguilla japonica-K* depositado por el solicitante en la entidad European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) bajo el número de acceso 16062701.

La expresión "*Anguilla japonica*" (*A. japonica*) o "*Japanese eel*" se refiere a una especie de anguila de anguilidos. Esta se encuentra comúnmente en Japón, China, Taiwan y Vietnam y es un pez anódromo, lo que significa que desova en el mar pero vive parcialmente en agua dulce.

5 La expresión "*Anguilla japonica-K*" (*AJK*), o alternativamente "*Anguilla genus K*" es el nombre dado a un nuevo cultivo celular según la presente invención.

10 Durante la etapa de cultivo, el cultivo celular infectado puede ser incubado a una temperatura entre 10 y 30°C, más preferentemente entre 15 y 28°C. Se apreciará que la temperatura de incubación óptima dependerá del tipo y la cepa del virus que va a ser propagado. Por ejemplo, cuando el virus es IPNV, la temperatura de cultivo es preferentemente de aproximadamente de 15°C. Por ejemplo, cuando el virus es nodavirus, como betanodavirus, la temperatura de cultivo es preferentemente de aproximadamente 28°C.

15 Los presentes inventores han encontrado que tejidos cultivados a partir de *Anguilla japonica* pueden ser cultivados *in vitro* y forman inesperadamente un cultivo celular viable para la producción y propagación de virus a rendimientos sorprendentemente elevados. Fue también sorprendente observar que el cultivo celular era capaz de producir y propagar estos rendimientos virales inesperadamente elevados a temperaturas de incubación inferiores a las comúnmente observadas para otras líneas celulares o cultivos celulares usados en el campo. Para los fines de la presente invención, el cultivo celular se ha denominado *Anguilla japónica-K*.

Preferentemente, el virus es un virus de peces. Un "virus de peces" es cualquier virus que es capaz de provocar síntomas o enfermedad en peces.

El virus puede ser un virus de ARN o un virus de ADN.

20 Preferentemente, el virus es un virus de ARN. En algunas realizaciones, el virus es un virus de ARN de cadena doble. En realizaciones alternativas, el virus es un virus de ARN de cadena única, por ejemplo, un virus de ARN de cadena única de sentido positivo.

25 El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae* y *Orthomyxoviridae*.

El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

30 El virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Alphanodavirus*; *Betanodavirus*; *Aquabirnavirus*; *Avibirnavirus*; *Blosnavirus*; *Entomobirnavirus*; *Alphavirus*; *Rubivirus*; *Novirhabdovirus*; *Brevidensovirus*; *Whispovirus*; *Aparavirus*; *Brevidensovirus*; y *Isavirus*.

35 El virus puede ser cualquier virus de peces conocido por un experto en la técnica, alguno de los cuales incluyen virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus de necrosis celular esencial (PCNV), nodavirus, virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus de necrosis hipodérmica infecciosa y de necrosis hematopoyética (IHHNV), virus de manchas blancas de las gambas (WSV), virus de síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) y virus de anemia del salmón infecciosa (ISAV).

40 Preferentemente, el virus es uno seleccionado entre el grupo: nodavirus, virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV). En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus recombinante. Preferentemente, el virus de peces es capaz de ser propagado en el cultivo celular según la presente invención.

45 La expresión "virus recombinante" se refiere a un virus producido mediante segmentos recombinantes de ADN, por ejemplo, usando ADN recombinante. La recombinación se efectúa mediante intervención humana. El término se puede referir también a una recombinación que se produce de forma natural entre genomas de virus en una célula infectada por más de una cepa de virus, por ejemplo, mediante un cruzado homólogo de cadenas de ácidos nucleicos o mediante redistribución de segmentos genómicos.

50 Preferentemente, el cultivo celular es infectado con un material viral a una multiplicidad de infección (MOI) entre 0,1 y 10. En el contexto de la presente invención, el término MOI se refiere a la relación de agentes (por ejemplo, fago o más genéricamente virus o bacterias) respecto al número de dianas de infección (por ejemplo, células). Por ejemplo, cuando se hace referencia a un grupo de células inoculadas con partículas de virus, la multiplicidad de infección o MOI es la relación del número de partículas de virus respecto al número de células dianas presentes en un espacio definido. Preferentemente, el agente es un virus de peces y la diana es una célula de *Anguilla japonica-K*.

En algunas realizaciones, las células de *Anguilla japonica-K* pueden ser cultivadas a 30°C con medio L-15 (Invitrogen) complementado con 10% de L-glutamina y 1 µl/ml de gentamicina, 7,5% de suero bovino fetal (FBS). Se

apreciará que las condiciones de cultivo, por ejemplo, los medios, pueden variar dependiendo del virus que va a ser propagado.

5 En otras realizaciones, las células de *Anguilla japonica-K* pueden ser cultivadas a 29°C con medio L-15 (Invitrogen) complementado con 10% de L-glutamina, 1 µl/ml de gentamicina y 7,5% de suero bovino fetal (FBS). Se apreciará que las condiciones de cultivo, por ejemplo, los medios, pueden variar dependiendo del virus que va a ser propagado.

10 En una realización preferida, las células de *Anguilla japonica-K* pueden ser cultivadas a 28° C con medio L-15 (Invitrogen) complementado con 10% de L-glutamina, 1 µl/ml de gentamicina y 7,5% de suero bovino fetal (FBS). Se apreciará que las condiciones de cultivo, por ejemplo, los medios, pueden variar dependiendo del virus que va a ser propagado.

En otras realizaciones preferidas, las células de *Anguilla japonica-K* pueden ser cultivadas a 27,5° C con medio L-15 (Invitrogen) complementado con 10% de L-glutamina, 1 µl/ml de gentamicina y 7,5% de suero bovino fetal (FBS). Se apreciará que las condiciones de cultivo, por ejemplo, los medios, pueden variar dependiendo del virus que va a ser propagado.

15 Preferentemente, el virus es extraído a un título final entre aproximadamente 2×10^6 TCID₅₀/ml y aproximadamente 2×10^{11} TCID₅₀/ml. En algunas realizaciones, el título final es de al menos aproximadamente 2×10^6 TCID₅₀/ml. En otras realizaciones, el título final es de al menos aproximadamente 2×10^7 TCID₅₀/ml, al menos aproximadamente 2×10^8 TCID₅₀/ml, al menos aproximadamente 2×10^9 TCID₅₀/ml o al menos aproximadamente 2×10^{10} TCID₅₀/ml. Se apreciará que el título final que es extraído dependerá de factores como el tipo y cepa de virus.

20 El término "título" en el contexto de la presente invención debe entenderse que significa la concentración efectiva de virus. El título es medido habitualmente en TCID₅₀/ml (50% de dosis infecciosa de cultivo de tejidos) es decir, la cantidad de virus necesaria para destruir un 50% de hospedantes infectados o para producir un efecto citopático (CPE) en un 50% de las células de cultivos de tejidos inoculadas.

25 La expresión "título final" se refiere a la concentración de virus que ha sido extraído a continuación de un CPE completo mediante centrifugación de la suspensión, por ejemplo, a aproximadamente 2500 x g o más, seguido de recuperación de la materia sobrenadante.

Preferentemente, el virus es extraído cuando se observa un efecto citopático total en las células. Preferentemente, el virus es extraído a partir de una materia sobrenadante y/o células lisadas.

30 La expresión "efecto citopático" o CPE en relación a una célula debe entenderse que significa la destrucción o deterioro de la célula provocado por una invasión viral que provoca cambios morfológicos. A modo de ejemplo, los cambios morfológicos se llevan a cabo como consecuencia de la replicación viral que puede estar acompañada de acumulación de nuevas partículas virales en la célula o la liberación de nuevas partículas virales en la materia sobrenadante.

35 El segundo aspecto de la presente invención proporciona un cultivo celular adecuado para la producción de un virus, en que el cultivo celular es un cultivo de células de anguila japonesa.

El cultivo de células de anguila japonesa puede comprender un único tipo de célula o una mezcla de dos o más tipos de células. Por ejemplo, el cultivo de células de anguila japonesa puede comprender una célula epitelial y/o una célula de fibroblasto. En algunas realizaciones, el cultivo celular puede comprender una célula epitelial y una célula de fibroblasto.

40 Preferentemente, el cultivo de células de anguila japonesa es el cultivo celular denominado *Anguilla japonica-K* depositado en la entidad European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) con el número de acceso 16062701.

Preferentemente, el virus es un virus de peces.

El virus puede ser un virus de ARN o un virus de ADN.

45 Preferentemente, el virus es un virus de ARN. En algunas realizaciones, el virus es un virus de ARN de cadena doble. En realizaciones alternativas, el virus es un virus de ARN de cadena única, por ejemplo, un virus de ARN de cadena única de sentido positivo.

50 El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

El virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Alphanodavirus*; *Betanodavirus*; *Aquabirnavirus*; *Avibirnavirus*; *Blosnavirus*; *Entomobirnavirus*; *Alphavirus*; *Rubivirus*; *Novirhabdovirus*; *Brevidensovirus*; *Whispovirus*; *Aparavirus*; *Brevidensovirus*; y *Isavirus*.

- 5 El virus puede ser cualquier virus de peces conocido por un experto en la técnica, algunos de los cuales incluyen necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus de necrosis celular esencial (PCNV), nodavirus, virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus hipodérmico infeccioso y de necrosis hematopoyética (IHHNV), virus de manchas blancas de gambas (WSV), virus de síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) y virus de anemia del salmón infeccioso (ISAV).
- 10 Preferentemente, el virus puede ser uno seleccionado entre el grupo: nodavirus, virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV). En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus recombinante. Preferentemente, el virus de peces es capaz de ser propagado en el cultivo celular según la presente invención.
- El tercer aspecto de la presente descripción proporciona el uso de un cultivo de células de anguila japonesa para multiplicar un material viral.
- La expresión "material viral" debe ser entendida por un experto en la técnica y se refiere generalmente a una solución que comprende dicho virus.
- 15 El cultivo de células de anguila japonesa puede comprender un único tipo de célula o una mezcla de dos o más tipos de células. Por ejemplo, el cultivo de células de anguila japonesa puede comprender una célula epitelial y/o una célula de fibroblasto. En algunas realizaciones, el cultivo celular comprende una célula epitelial y una célula de fibroblasto.
- 20 Preferentemente, el cultivo celular de anguila japonesa es el cultivo de células denominado *Anguilla japonica-K* depositada en la entidad European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) con el número de acceso 16062701.
- Preferentemente, el virus es un virus de peces.
- El virus puede ser un virus de ARN o un virus de ADN.
- 25 El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae; Birnaviridae; Togaviridae; Rhabdoviridae; Iridoviridae; Reoviridae; Ortomixovirus; Paramixovirus; Arterivirus; Picornavirus; Nimaviridae; Dicistroviridae; Parvoviridae; y Orthomyxoviridae.*
- El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae; Birnaviridae; Togaviridae; Rhabdoviridae; Iridoviridae; Reoviridae; Ortomixovirus; Paramixovirus; Arterivirus; Picornavirus; Nimaviridae; Dicistroviridae; Parvoviridae; y Orthomyxoviridae.*
- 30 El virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Alphanodavirus; Betanodavirus; Aquabirnavirus; Avibirnavirus; Blosnavirus; Entomobirnavirus; Alphavirus; Rubivirus; Novirhabdovirus; Brevidensovirus; Whispovirus; Aparavirus; Brevidensovirus; Isavirus.*
- 35 El virus puede ser cualquier virus de peces conocidos por un experto en la técnica, algunos de los cuales incluyen necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus de necrosis celular esencial (PCNV), nodavirus, virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infeccioso (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus hipodérmico infeccioso y de necrosis hematopoyética (IHHNV), virus de manchas blancas de gambas (WSV), virus de síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) o virus de anemia del salmón infeccioso (ISAV).
- 40 Preferentemente, el virus puede ser uno seleccionado entre el grupo: nodavirus, virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV). En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus recombinante. Preferentemente, el virus de peces es capaz de ser propagado en el cultivo celular según la presente invención.
- El cuarto aspecto de la presente descripción proporciona una célula de anguila japonesa aislada infectada con un virus. La célula de anguila japonesa puede ser una célula epitelial o una célula de fibroblasto.
- 45 Preferentemente, la célula de anguila japonesa es del cultivo celular denominado *Anguilla japonica-K* depositado en la entidad European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) con el número de acceso 16062701.
- Preferentemente, el virus es un virus de peces.
- El virus puede ser un virus de ARN o un virus de ADN.
- 50 Preferentemente, el virus es un virus de ARN. En algunas realizaciones, el virus es un virus de ARN de cadena doble. En realizaciones alternativas, el virus es un virus de ARN de cadena única, por ejemplo, un virus de ARN de cadena única de sentido positivo.

El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

- 5 El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

El virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Alphanodavirus*; *Betanodavirus*; *Aquabirnavirus*; *Avibirnavirus*; *Blosnavirus*; *Entomobirnavirus*; *Alphavirus*; *Rubivirus*; *Novirhabdovirus*; *Brevidensovirus*; *Whispovirus*; *Aparavirus*; *Brevidensovirus*; y *Isavirus*.

- 10 El virus puede ser cualquier virus de peces conocido por un experto en la técnica, algunos de los cuales incluyen virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV), virus de necrosis de células esenciales (PCNV), nodavirus, virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infeccioso (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus hipodérmico infeccioso y de necrosis hematopoyética (IHHNV), virus de manchas blancas de gambas (WSV), virus de síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) y virus de anemia del salmón infeccioso (ISAV).
- 15 de anemia del salmón infeccioso (ISAV).

Preferentemente, el virus es uno seleccionado entre el grupo: nodavirus, virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV). En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus recombinante. Preferentemente, el virus de peces es capaz de ser propagado en el cultivo celular según la presente invención.

- 20 El quinto aspecto de la presente descripción proporciona una vacuna que comprende un virus producido mediante un método según la invención, para ser usado en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad en un pez.

Preferentemente, el virus está en una forma inactivada.

Preferentemente, el virus está presente a un título de más de 1×10^6 TCID₅₀/ml, más de 1×10^7 TCID₅₀/ml, más de 1×10^8 TCID₅₀/ml, más de 1×10^9 TCID₅₀/ml o más de 1×10^{10} TCID₅₀/ml.

- 25 Las vacunas basadas en células tienen un cierto número de ventajas sobre las vacunas basadas en huevos que incluyen tiempos de producción más cortos, fácil aislamiento del virus y evitación de reacciones de alergias basadas en los huevos. Además, las líneas celulares y cultivos se pueden hacer crecer en medio sintéticos que minimizan los riesgos asociados con un suero animal. Además, las desventajas de los métodos basados en células incluyen un coste aumentado y rendimientos virales reducidos. El cultivo celular de la presente invención proporciona mejoras para los métodos existentes basados en células para proporcionar vacunas para peces.
- 30 para los métodos existentes basados en células para proporcionar vacunas para peces.

El sexto aspecto de la presente descripción proporciona un estuche de ensayo para la propagación de un virus, comprendiendo el estuche de ensayo un cultivo de células de anguila japonesa e instrucciones para su uso.

- 35 El cultivo celular de anguila japonesa puede comprender un tipo de célula único o una mezcla de dos o más tipos de células. Por ejemplo, el cultivo de células de anguila japonesa puede comprender una célula epitelial y/o una célula de fibroblasto. En algunas realizaciones, el cultivo celular comprende una célula epitelial y una célula de fibroblasto.

Preferentemente, el cultivo celular es el cultivo celular denominado *Anguilla japonica*-K depositado en la entidad European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) con número de acceso 16062701.

Preferentemente, el virus es un virus de peces.

El virus puede ser un virus de ARN o un virus de ADN.

- 40 Preferentemente, el virus es un virus de ARN. En algunas realizaciones, el virus es un virus de ARN de cadena doble. En realizaciones alternativas, el virus es un virus de ARN de cadena única, por ejemplo, un virus de ARN de cadena única de sentido positivo.

- 45 El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

- 50 El virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Alphanodavirus*; *Betanodavirus*; *Aquabirnavirus*; *Avibirnavirus*; *Blosnavirus*; *Entomobirnavirus*; *Alphavirus*; *Rubivirus*; *Novirhabdovirus*; *Brevidensovirus*; *Whispovirus*; *Aparavirus*; *Brevidensovirus*; y *Isavirus*.

- 5 El virus puede ser cualquier virus conocido por un experto en la técnica, algunos de los cuales incluyen virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV), virus de necrosis celular esencial (PCNV), nodavirus, virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infeccioso (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus hipodérmico infeccioso y de necrosis hematopoyética (IHHNV), virus de manchas blancas de las gambas (WSV), virus de síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) y virus de anemia del salmón infeccioso (ISAV).
- 10 Preferentemente, el virus es uno seleccionado entre el grupo: nodavirus, virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV). En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus recombinante. Preferentemente, el virus de peces es capaz de ser propagado en el cultivo celular según la presente invención.
- El séptimo aspecto de la presente descripción proporciona un método para producir un virus que comprende las etapas:
- transducir un cultivo celular adecuado con un material viral;
- cultivar las células transducidas en un medio de cultivo;
- 15 recuperar el virus; y
- opcionalmente, purificar el virus a partir del medio de cultivo, en que el cultivo celular es un cultivo de células de anguila japonesa.
- 20 El cultivo de células de anguila japonesa puede comprender un tipo único de células o una mezcla de dos o más tipos de células. Por ejemplo, el cultivo de células de anguila japonesa puede comprender una célula epitelial y/o una célula de fibroblasto. En algunas realizaciones, el cultivo celular comprende una célula epitelial y una célula de fibroblasto.
- Preferentemente, el cultivo de célula japonesa es el cultivo de células denominada *Anguilla japonica-K* depositado en la entidad European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) con el número de acceso 16062701.
- Preferentemente, el virus es un virus de peces.
- 25 Preferentemente, el virus es un virus de ARN. En algunas realizaciones, el virus es un virus de ARN de cadena doble. En realizaciones alternativas, el virus es un virus de ARN de cadena única, por ejemplo, un virus de ARN de cadena única de sentido positivo.
- El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.
- 30 El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.
- El virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Alphanodavirus*; *Betanodavirus*; *Aquabirnavirus*; *Avibirnavirus*; *Blosnavirus*; *Entomobirnavirus*; *Alphavirus*; *Rubivirus*; *Novirhabdovirus*; *Brevidensovirus*; *Whispovirus*; *Aparavirus*; *Brevidensovirus*; y *Isavirus*.
- 35 El virus puede ser un virus de peces conocido por un experto en la técnica, alguno de los cuales incluyen virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV), virus de necrosis celular esencial (PCNV), nodavirus, virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infeccioso (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus de necrosis hipodérmica infeccioso y de necrosis hematopoyética (IHHNV), virus de manchas blancas de las gambas (WSV), virus de síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) y virus de anemia del salmón infeccioso (ISAV).
- 40 Preferentemente, el virus es uno seleccionado entre el grupo: nodavirus, virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV). En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus recombinante. Preferentemente, el virus es capaz de ser propagado en el cultivo celular según la presente invención.
- Preferentemente, el cultivo celular es transducido con un material viral a una multiplicidad de infección (MOI) entre 0,05 y 10, entre 0,1 y 10 o entre 0,1 y 1. Se apreciará que la MOI dependerá de factores como el tipo y cepa de virus.
- 50 Preferentemente, el virus es recuperado a un título final del virus entre aproximadamente 2×10^6 TCID₅₀/ml y aproximadamente 2×10^{11} TCID₅₀/ml. En algunas realizaciones, el título final es de al menos aproximadamente 2×10^6 TCID₅₀/ml. En otras realizaciones, el título final es de al menos aproximadamente 2×10^7 TCID₅₀/ml, al menos

aproximadamente 2×10^8 TCID₅₀/ml, al menos aproximadamente 2×10^9 TCID₅₀/ml o al menos aproximadamente 2×10^{10} TCID₅₀/ml. Se apreciará que el título final que es extraído dependerá de factores como el tipo y la cepa de virus.

5 Preferentemente, el virus es extraído cuando se observa un efecto citopático total (CPE) en las células. Preferentemente, el virus es extraído a partir de una materia sobrenadante.

10 De forma sorprendentemente para los inventores se encontró que el cultivo celular de *Anguilla japonica-K* de la presente invención era capaz de producir también rendimientos virales más elevados que otras líneas o cultivos celulares conocidos como células SSN o células CCH-1. Por ejemplo, para SPDV, se produjo un título de 2×10^7 TCID₅₀/ml mediante células CCH-1, mientras que se produjo un título de más de dos órdenes de magnitud mediante células de la invención (véase el ejemplo 4).

Se cree que el tamaño más pequeño de las células *Anguilla japonica-K* da lugar a la observación de que hay un número mucho mayor de células por volumen unitario en confluencia que otros cultivos celulares. El cultivo celular de *Anguilla japonica-K* de la presente invención crece también de forma más rápida en comparación con cultivos de células de salmónidos.

15 Estos factores pueden contribuir a los elevados rendimientos virales observados en el cultivo celular de *Anguilla japonica-K*, pero solo suponen una parte de las diferencias de rendimiento. Otros factores que contribuyen incluyen las capacidades individuales de portar virus de células, por ejemplo, un corte de proteína retrasado, o un retraso/carencia de apoptosis.

20 El octavo aspecto de la presente descripción proporciona un método para identificar la presencia de un virus en una muestra, comprendiendo el método:

exponer un cultivo de células de anguila japonesa a la muestra;

obtener un cultivo de células infectadas;

opcionalmente, incubar el cultivo de células infectadas;

opcionalmente, aislar un virus; y

25 identificar la presencia del virus.

El término "muestra" se refiere, por ejemplo, a bacterias, células virales, células de peces, tejido o fluido corporal que puede ser obtenido a partir de cualquier fuente medioambiental como un medio animal que puede estar o no estar en contacto con un animal o una fuente artificial como un material de cultivo de tejidos. Preferentemente el animal es un pez.

30 El cultivo de células de anguila japonesa puede comprender un único tipo de células o una mezcla de dos o más tipos de células. Por ejemplo, el cultivo de células de anguila japonesa puede comprender una célula epitelial y/o una célula de fibroblasto. En algunas realizaciones, el cultivo celular comprende una célula epitelial y una célula de fibroblasto.

35 Preferentemente, el cultivo celular es el cultivo celular denominado *Anguilla japonica-K* depositado en la entidad European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) con el número de acceso 16062701.

El método para identificar la presencia del virus en una muestra puede ser un método de diagnosticar la presencia de un virus en la muestra. Se apreciará que cuando la muestra comprende un virus, el método comprenderá adicionalmente las etapas de infectar el cultivo celular de anguila japonesa y hacer crecer el virus en el cultivo de células de anguila japonesa.

40 Se apreciará que la etapa de incubación puede ser opcional, dependiendo del virus, por ejemplo, de si el virus es lítico o lisogénico.

Preferentemente, el virus es un virus de peces.

El virus puede ser un virus de ARN o un virus de ADN.

45 Preferentemente, el virus es un virus de ARN. En algunas realizaciones, el virus es un virus de ARN de cadena doble. En realizaciones alternativas, el virus es un virus de ARN de cadena única, por ejemplo, un virus de ARN de cadena única de sentido positivo.

El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

5 El virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Alphanodavirus*; *Betanodavirus*; *Aquabirnavirus*; *Avibirnavirus*; *Blosnavirus*; *Entomobirnavirus*; *Alphavirus*; *Rubivirus*; *Novirhabdovirus*; *Brevidensovirus*; *Whispovirus*; *Aparavirus*; *Brevidensovirus*; y *Isavirus*.

10 El virus puede ser cualquier virus de peces conocidos por un experto en la técnica, algunos de los cuales incluyen virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV), virus de necrosis celular esencial (PCNV), nodavirus, virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infeccioso (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus hipodérmico infeccioso y de necrosis hematopoyética (IHHNV), virus de manchas blancas de las gambas (WSV), virus de síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) y virus de anemia del salmón infeccioso (ISAV).

15 Preferentemente, el virus es uno seleccionado entre el grupo, nodavirus; virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV). En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus recombinante. Preferentemente, el virus de peces es capaz de ser propagado en el cultivo celular según la presente invención.

20 En algunas realizaciones, la etapa de identificación comprende una seleccionada entre el grupo que comprende, por ejemplo: reacción de cadena de polimerasa (PCR); reacción de cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), análisis de transferencia Western, análisis de transferencia Northern, análisis de transferencias Southern, ensayo inmunoabsorbente conectado a enzimas (ELISA); ensayo de desplazamiento de movilidad electroforético (EMSA) y/o análisis FACS. Estas técnicas y otras herramientas y técnicas similares de identificación y predicción de laboratorio en húmedo y basadas en ordenador serán conocidas por los expertos en este campo.

El noveno aspecto de la presente descripción proporciona un cultivo células aislado denominado *Anguilla japonica-K* depositada con el número de acceso ECACC 16062701.

25 El décimo aspecto de la presente invención proporciona un método para producir una composición inmunogénica, que comprende las etapas:

proporcionar el cultivo celular aislado de la presente invención;

infectar el cultivo celular con un virus;

cultivar el cultivo celular infectado con el virus; y

30 extraer el virus a partir del cultivo celular.

Preferentemente, el virus es un virus de peces.

El virus puede ser un virus de ARN o un virus de ADN.

35 Preferentemente, el virus es un virus de ARN. En algunas realizaciones, el virus es un virus de ARN de cadena doble. En realizaciones alternativas, el virus es un virus de ARN de cadena única, por ejemplo, un virus de ARN de cadena única de sentido positivo.

El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

40 El virus puede ser un virus de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en: *Nodaviridae*; *Birnaviridae*; *Togaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Iridoviridae*; *Reoviridae*; *Ortomixovirus*; *Paramixovirus*; *Arterivirus*; *Picornavirus*; *Nimaviridae*; *Dicistroviridae*; *Parvoviridae*; y *Orthomyxoviridae*.

El virus puede ser un virus de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Alphanodavirus*; *Betanodavirus*; *Aquabirnavirus*; *Avibirnavirus*; *Blosnavirus*; *Entomobirnavirus*; *Alphavirus*; *Rubivirus*; *Novirhabdovirus*; *Brevidensovirus*; *Whispovirus*; *Aparavirus*; *Brevidensovirus*; y *Isavirus*.

45 El virus puede ser cualquier virus de peces conocido por un experto en la técnica, alguno de los cuales incluyen virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV), virus de necrosis celular esencial (PCNV), nodavirus, virus de enfermedad pancreática de salmónidos (SPDV), virus de necrosis hematopoyética infeccioso (IHNV), virus de septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus hipodérmico infeccioso y de necrosis hematopoyética (IHHNV), virus de manchas blancas de las gambas (WSV), virus de síndrome de Taura (TSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) y virus de anemia del salmón infeccioso (ISAV).

50 Preferentemente, el virus es uno seleccionado entre el grupo: nodavirus, virus de necrosis pancreática infeccioso

(IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV). En algunas realizaciones, el virus puede ser un virus recombinante. Preferentemente, el virus de peces es capaz de ser propagado en el cultivo celular según la presente invención.

La presente invención se describe haciendo referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

5 La figura 1 muestra los resultados de una separación por tamaños mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de análisis PCR del cultivo celular de *Anguilla japonica-K* depositado bajo el número de acceso ECACC 16062701;

10 La figura 2 es un gráfico que muestra la curva de crecimiento del aislado de virus de necrosis pancreática infeccioso IPN NVI 015 (números de acceso GenBank AY379740 y AY379741) en cultivo celular de *Anguilla japonica-K* (número de acceso ECACC 16062701) en términos del título de virus a los 5, 6, 7 y 8 días después de la recolección, infectados a una MOI de 1.

La figura 3 es un gráfico que muestra la curva de crecimiento del virus de la enfermedad de páncreas del salmón (SPDV) en un cultivo celular de *Anguilla japonica-K* (número de acceso ECACC 16062701) en términos del título de virus a los 5, 6, 7, 12 y 14 días después de la recolección, infectado a una MOI de 0,5; y

15 La Figura 4 es un gráfico que muestra la curva de crecimiento para nodavirus en cultivo celular de *Anguilla japonica-K* (número de acceso ECACC 16062701) en términos del título de virus a los 4, 5, 6, 7, 9 y 11 días después de la recolección, infectado a una MOI de 0,1, 0,5 y 1.

Ejemplos

Ejemplo 1

20 Identidad de especies de cultivo celular de *Anguilla japonica-K* – ensayo molecular

Partes alícuotas de células pre-maestras de *Anguilla japonica-K* sembrada en el paso (p) 118 y célula maestra de *Anguilla japonica-K* sembrada en el p 121 fueron ensayadas en cuanto a identidad de especies mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) y secuenciado.

Materiales y métodos

25 Se extrajo ADN genómico de partes alícuotas del sembrado de células maestras p121 y sembrado de células pre-maestras p118 por duplicado usando un estuche de ensayo de tejidos de ADN EZ1 y EZ1 Biorobot (Qiagen) y se sometieron a amplificación por PCR con cebadores para la oxidasa 1 de citocromomitocondrial (CO1) y genes 16S (Tabla 1 siguiente). Los productos fueron visualizados después de una separación de tamaños mediante electroforesis sobre gel de agarosa (Figura 1). Todos los productos fueron escindidos, purificados y secuenciados directamente mediante secuenciado de ciclos (estuche de ensayo de secuenciado de ciclos BigDye Terminator v3.1 y analizador genético ABI 3130xl Avant (Applied Biosystems)). Las secuencias de consenso de los análisis por duplicado se compararon con secuencias publicadas disponibles en la entidad GenBank y EMBL mediante análisis BlastN.

30

Tabla 1

Gen	Tamaño del fragmento	Nombre	Secuencias de cebadores
Col	<650 bp	FishF1	5' -TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'
		FishR1	5' -TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'
16S	<410 bp	16SarL	5' -CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'
		16SbrH	5' -CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

35

Resultados

La Figura 1 muestra los productos de amplificación para el gen CO1 (conjunto de la izquierda, columna 1-4) y gen 16S (conjunto de la derecha, columnas 7-10) de células de *Anguilla japonica-K* pre-maestras sembradas el p118 (1 y 2 y 7 y 8) y célula maestra p121 (3 y 4 y 9 y 10). Las columnas 5, 6, 11 y 12 son testigos negativos.

40 La PCR y el secuenciado de los genes CO1 y 16S de partes alícuotas de célula pre-maestra sembrada en p118 y célula maestra sembrada en p121 muestran todos una identidad de 100% respecto a los genes respectivos de anguila japonesa (*Anguilla japonica*). No hubo evidencia de una secuencia mixta.

El cultivo celular de *Anguilla japonica-K* es de origen *A. japonica*.

Ejemplo 2

Propagación de células de *Anguilla japonica-K*

5 Los métodos y protocolos experimentales para el crecimiento de células y cultivos celulares deben ser conocidos para un experto en la técnica. Algunos ejemplos de métodos según la presente invención se describen a continuación.

Condiciones de almacenamiento de células

El cultivo celular se almacenó en 50/50 en volumen de DMSO al 10% en medio esencial mínimo (MEM) y suero bovino fetal (FBS) sin diluir a una densidad de 2×10^6 células/ml.

Condiciones del cultivo celular

10 Las células de *Anguilla japonica-K* se mantuvieron generalmente a 28° C con medio L-15 (Invitrogen) complementado con 10% de L-glutamina y 1 µl/ml de gentamicina y 7,5% de suero bovino fetal (FBS).

Alternativamente, las células de *Anguilla japonica-K* se mantuvieron entre 15 y 28° C en medio esencial mínimo (MEM), 7,5 % de suero bovino fetal (FBS), 0,5% de bicarbonato de sodio y 1% de dipéptido de L-Alanil-L-glutamina (Glutamax).

15 Las células de *Anguilla japonica-K* infectadas con IPN se mantuvieron a 15° C. Las células de *Anguilla japonica-K* infectadas con nodavirus se mantuvieron a 28° C.

Paso

Las células se pasaron a una relación de sembrado de 1:6 o una proporción de sembrado de células de $1,6 \times 10^4$ células/ cm².

20 Ejemplo 3

Cultivo celular de *Anguilla japonica-K*, número de acceso ECACC 16062701

El cultivo celular de *Anguilla japonica-K* depositado en la entidad ECACC se refiere a una muestra de la célula pre-maestra sembrada en el paso (p) 124. Un análisis mostró que el cultivo celular era principalmente epitelial, con fibroblastos presentes.

25 Ejemplo 4

Valoración de rendimientos virales

Aproximadamente un 80% de células de *Anguilla japonica-K* confluentes mantenidas en medio L15 con 2% de FBS y a una densidad de 6×10^4 células/cm² fueron inoculadas con un virus (necrosis pancreática infecciosa (IPN), virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV) o nodavirus), seguido de incubación a 15° C.

30 Las células fueron inoculadas a una MOI de 1,0 para IPN y SPDV y valores de la MOI de 0,1, 0,5 y 1,0 para nodavirus.

Las curvas de crecimiento para los virus se muestran en la Figura 2 (virus de necrosis pancreática infeccioso), Figura 3 (virus de enfermedad pancreática del salmón) y Figura 4 (nodavirus).

35 Se valoraron también producciones a escala mayor de los tres virus (IPN, SPDV y nodavirus) en factorías celulares y se registraron los títulos de virus a tiempos de recolección óptimos. Las células tuvieron infección a una MOI de 1 para IPN, una MOI de 0,5 para SPDV y una MOI de 0,1 para nodavirus.

El virus se recolectó a continuación de CPE completa mediante centrifugación de la suspensión a 2500 x g seguido de recuperación de la materia sobrenadante. Los títulos medios de los virus se muestran en la Tabla 2 siguiente.

40

Tabla 2

Crecimiento de virus en células de <i>Anguilla japonica-K</i>	Título medio (TCID ₅₀ /ml) a un tiempo de recolección óptimo sobre varias tandas a escala de investigación (factorías celulares)	Número de tandas (factorías celulares)	Tiempo de recolección óptimo en días después de la infección (días)
SPDV	6,6 x 10 ⁹	5	~15
Nodavirus	4,65 x 10 ¹⁰	2	7-11
IPN	1,58 x 10 ¹⁰	1	8-12

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo celular aislado denominado *Anguilla japonica-K* depositado con el número de acceso ECACC 16062701.
2. Un método para propagar un virus, que comprende las etapas:
 - 5 infectar un cultivo celular con el virus;
 - cultivar el cultivo celular infectado;
 - extraer el virus; y
 - opcionalmente, purificar el virus,
 - 10 en que dicho cultivo celular es el cultivo celular denominado *Anguilla japonica-K* depositado con el número de acceso 16062701.
3. El método según la reivindicación 2, en el que el virus es un virus de peces.
4. El método según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el virus es uno seleccionado entre el grupo que consiste en: nodavirus, virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV).
- 15 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el cultivo celular es infectado con un material viral a una multiplicidad de infección (MOI) entre 0,1 y 10.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el virus es extraído a un título final entre aproximadamente 2×10^6 TCID₅₀/ml y aproximadamente 2×10^{11} TCID₅₀/ml.
- 20 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el virus es extraído cuando se observa un efecto citopático (CPE) en las células.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que el virus es extraído a partir de una materia sobrenadante y/o células lisadas.
9. Uso de un cultivo celular de anguila japonesa denominado *Anguilla japonica-K* depositado con el número de acceso 16062701 para multiplicar un material viral.
- 25 10. Una célula de anguila japonesa aislada a partir del cultivo celular denominado *Anguilla japonica-K* depositado con el número de acceso 16062701 infectado con un virus.
11. Una célula de anguila japonesa aislada según la reivindicación 10, en que el virus es uno seleccionado entre el grupo que consiste en: nodavirus, virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV).
- 30 12. Un método para identificar la presencia de un virus en una muestra, comprendiendo el método:
 - exponer un cultivo celular de anguila japonesa denominado *Anguilla japonica-K* depositada con el número de acceso 16062701 con la muestra;
 - obtener un cultivo celular infectado;
 - opcionalmente, incubar el cultivo celular infectado;
 - 35 opcionalmente, aislar un virus; y
 - identificar la presencia del virus.
13. El método según la reivindicación 12, en el que el virus se selecciona entre el grupo que consiste en: nodavirus, virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV).
14. Un método para producir una composición inmunogénica, que comprende las etapas:
 - 40 proporcionar el cultivo celular aislado de la reivindicación 1;
 - infectar el cultivo celular con un virus;
 - cultivar el cultivo celular infectado con el virus; y
 - extraer el virus a partir del cultivo celular.

15. El método según la reivindicación 14, en el que el virus se selecciona entre el grupo que consiste en: nodavirus, virus de necrosis pancreática infeccioso (IPNV) y virus de enfermedad de páncreas del salmón (SPDV).

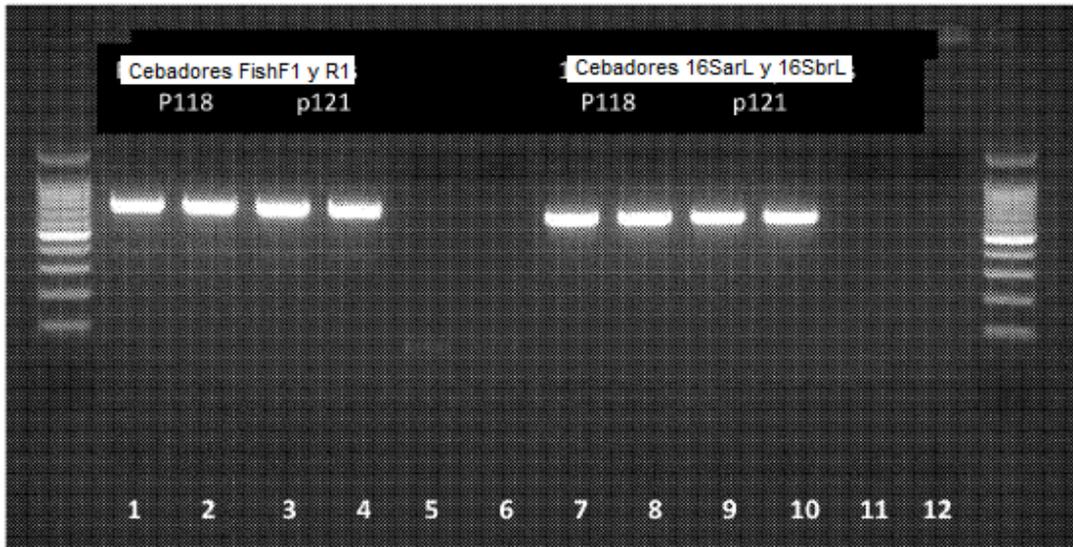


Fig. 1

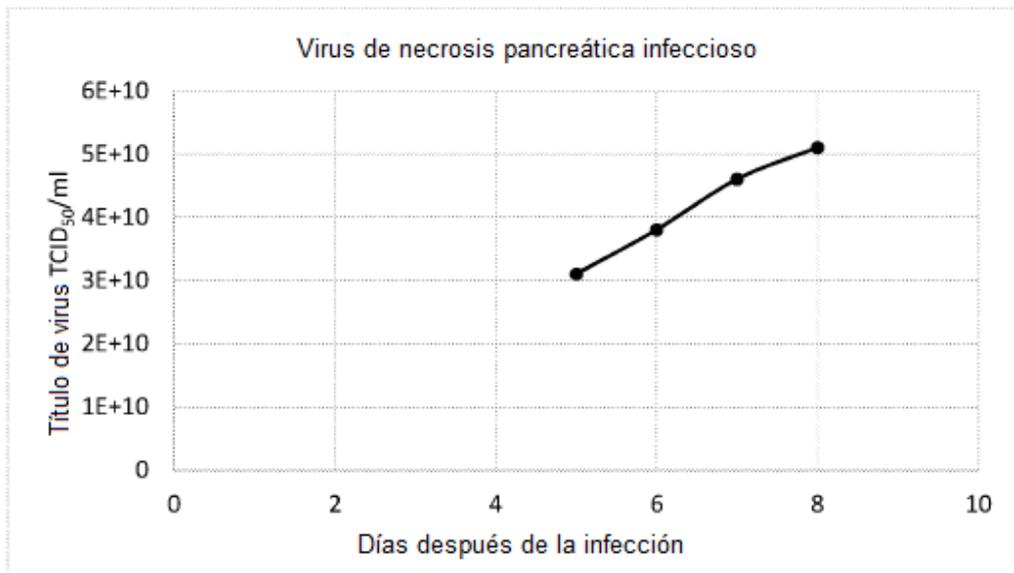


Fig. 2

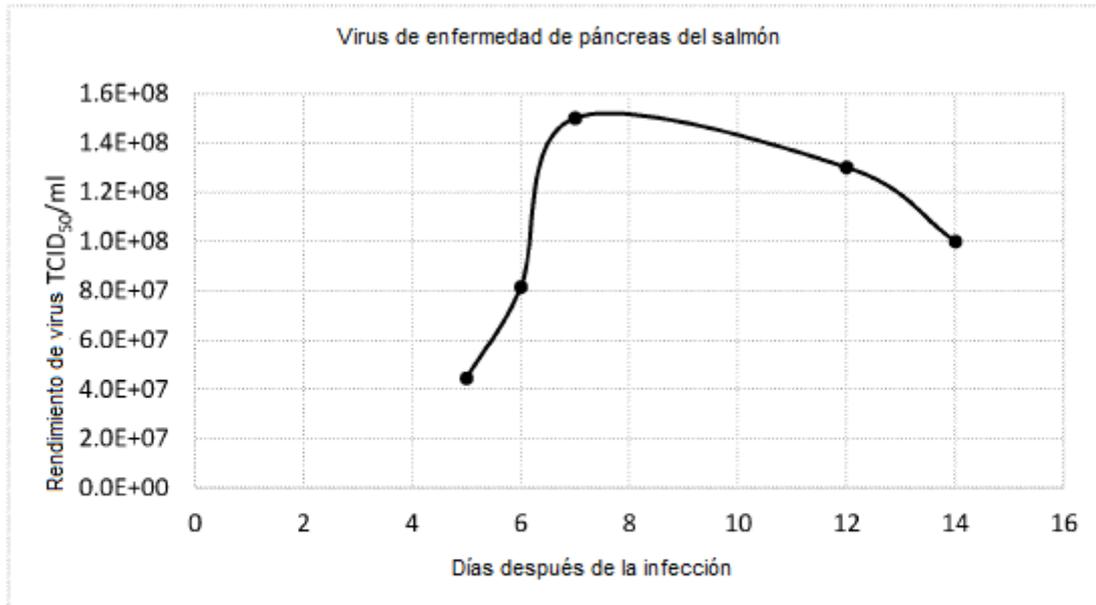


Fig. 3

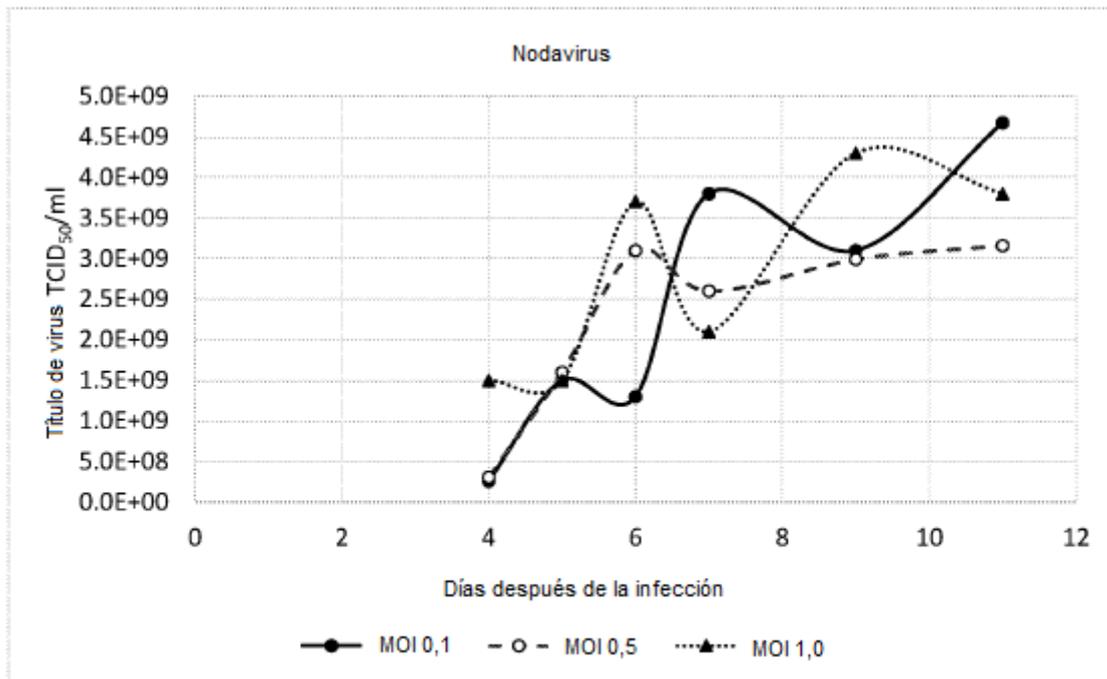


Fig. 4