



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 255 411**

⑫ Número de solicitud: 200402092

⑬ Int. Cl.:
C12N 15/47 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 39/205 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **27.08.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2006**

Fecha de la concesión: **19.02.2007**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2007**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

⑰ Titular/es: **Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Ctra. de la Coruña, Km. 7,5
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Coll Morales, Julio**

⑲ Agente: **González Palmero, Fe**

⑳ Título: **Genes G mutantes del virus de la septicemia hemorrágica de la trucha (VHSV) y aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Genes G mutantes del virus de la septicemia hemorrágica de la trucha (VHSV) y aplicaciones.

Los genes G mutantes del virus de la septicemia hemorrágica de la trucha (VHSV) codifican proteínas G mutantes de VHSV con capacidad de unión a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula. Dichos genes G mutantes de VHSV pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, en la elaboración de vacunas (vacunas ADN o vacunas vivas atenuadas) para prevenir la enfermedad causada por VHSV en animales susceptibles de ser infectados por VHSV, en la generación de animales no humanos transgénicos y en la elaboración de reactivos para el diagnóstico de la infección causada por VHSV.

ES 2 255 411 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Genes G mutantes del virus de la septicemia hemorrágica de la trucha (VHSV) y aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona, en general, con genes G mutantes del virus de la septicemia hemorrágica de la trucha (VHSV), que codifican proteínas G mutantes de VHSV con capacidad de unión a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula. Dichos genes G mutantes de VHSV pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, en la elaboración de vacunas para prevenir la enfermedad causada por VHSV en animales susceptibles de ser infectados por VHSV.

Antecedentes de la invención

Los rabdovirus son una de las mayores causas de mortalidad en los criaderos de peces, provocando grandes pérdidas en la industria de la cría del salmón. Entre los rabdovirus que afectan a peces (novirabdomovirus), el virus de la septicemia hemorrágica (VHSV), originado en Europa pero recientemente extendido a América, es uno de los más peligrosos ya que no sólo afecta a salmónidos sino también al bacalao, rodaballos, corvinas, anguilas, gallos y gambas. A pesar de los esfuerzos, incluyendo exitosas vacunas ADN a nivel de laboratorio, ninguna vacuna comercial contra el VHSV está todavía disponible.

El VHSV es un rabdovirus cuya partícula viral, de 170 x 80 nm aproximadamente, se compone de una nucleocápsida interior, que encierra una molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa [ssRNA(-)] con 11.000 bases y un peso molecular de 5-6,4 x 10⁶ kDa, y una envoltura exterior en forma de bala, compuesta por una membrana lipoproteica y por unas espículas triméricas de proteína que se proyectan hacia el exterior de ésta. El genoma completo de VHSV ya ha sido secuenciado (Heike *et al.*, 1999). Componen el virus las proteínas L, G, N, M1 y M2. La proteína L (190 kDa), asociada al RNA vírico, tiene actividad transcriptasa y replicasa. La proteína G o pG (65 kDa) es una glicoproteína que forma las espículas triméricas, responsables de la producción de anticuerpos (Ac) neutralizantes. La nucleoproteína N (40 kDa) de la nucleocápsida es la proteína mayoritaria. En VHSV se ha descrito además una proteína Nx relacionada antigénicamente con la proteína N, cuya función se desconoce. La fosfoproteína M1 o P (19 kDa) está asociada a la polimerasa L. La proteína M2 o M (25 kDa) puede estar situada o alrededor de la membrana lipídica o en el interior de la nucleocápsida.

La infección causada por rabdovirus se inicia por la unión de éste, a través de la pG, a receptores específicos en la membrana externa del huésped y continúa con una fusión de membranas dependiente de una bajada de pH después de que el virus haya sido introducido en el citoplasma de la célula por endocitosis. Una vez en el interior de las células, el rabdovirus se replica en el citoplasma, los viriones maduran y, finalmente, brotan por gemación en la superficie celular llegando a lisar la célula.

Se han descrito pG mutantes del virus de la estomatitis vesicular (VSV), un rabdovirus de mamífero muy bien estudiado, con mutaciones localizadas tanto en el péptido de fusión como en las regiones carboxi terminales que afectan a los cambios conformacionales a pHs bajos requeridos para la fusión viral. El alineamiento de la pG del VSV con las pG de otros 14 rabdovirus animales ha permitido predecir las localizaciones de los hipotéticos péptidos de fusión en otros rabdovirus, incluido el VHSV (Walter & Kongsuwan, 1999). Según ese modelo, el péptido de fusión del VHSV podría estar localizado entre las posiciones 142-159 de la pG de VHSV.

Evidencias indirectas obtenidas utilizando péptidos recombinantes y sintéticos de la pG del VHSV parecen sugerir que la secuencia comprendida entre los aminoácidos 56 y 110 (frg11) que contiene las repeticiones de heptadas no canónicas y la región del péptido de unión al fosfolípido (p2), pudiera estar involucrada en la fusión. Cuando se añadía frg11 recombinante a una monocapa de células se observaron cambios dramáticos en dicho frg11 recombinante tanto en su solubilidad como en la conformación de la lámina beta a pH bajo así como la inducción de la fusión célula-célula dependiente de pH bajo. Algunas formas mutantes de la pG del VHSV (118-161) obtenidas por resistencia a la neutralización por el anticuerpo monoclonal (AcM) C10, a pesar de tener alteraciones en su conformación, mantenían la capacidad de fusión viral (Gaudin *et al.*, 1999). El AcM C10 o los anticuerpos anti-frg11, anti-p2 (82-109) y anti-p4 (123-144) (Fredericksen *et al.*, 1996) inhiben la fusión viral, lo que sugiere que esas regiones podrían estar implicadas en la fusión viral a la célula animal huésped. Debido a la presencia de un puente disulfuro entre las posiciones 110 y 152 (Einer-Jensen *et al.*, 1998), se cree que las regiones p2 y del péptido de fusión deben ocupar posiciones cercanas en la pG nativa del VHSV. Sin embargo, no existen, hasta la fecha, evidencias directas sobre la participación de esas regiones en la fusión viral a la célula animal huésped.

Debido a la importancia de la incidencia causada por las infecciones de rabdovirus sobre peces, en particular, VHSV, y a la escasez de vacunas comerciales disponibles, existe la necesidad de desarrollar vacunas efectivas contra VHSV y otros rabdovirus.

65 **Compendio de la invención**

Ahora se ha conseguido expresar genes G mutantes de VHSV con mutaciones en las regiones p2 y del supuesto péptido de fusión, así como en las regiones entre ellos, en la membrana de una línea celular de pez, y se han realizado

ensayos de reactividad con anticuerpos monoclonales (AcMs) dependientes de conformación, entre ellos, el anticuerpo monoclonal (AcM) C10 y ensayos de fusión célula-célula a diferentes pHs. Ese estudio ha permitido identificar cuatro mutaciones (P79A, L85S, R103A y T135E) que, aunque no reaccionan con dichos AcMs, mantienen algo de la actividad de fusión similar a la de los mutantes resistentes al AcM C10. Tres de esas mutaciones (P79A, L85S y T135E), mapeadas alrededor de dos localizaciones concretas de la pG (80 y 140), muestran variaciones en los aminoácidos entre distintos aislados de VHSV. Debido a que el 40% de las truchas inmunizadas por VHSV reconocieron fuertemente epítomos lineales en esas regiones, los genes G mutantes proporcionados por esta invención son potencialmente útiles para diseñar vacunas destinadas a conferir protección a animales frente a la infección causada por VHSV. Dichas vacunas pueden ser, a modo ilustrativo, vacunas ADN o vacunas vivas atenuadas.

La obtención de mutantes que afecten a las fases tempranas de la infección de VHSV ofrece posibilidades de desarrollo de métodos terapéuticos y/o de vacunas tanto para VHSV como para otros rhabdovirus. El conocimiento del mecanismo de procesos tales como la fusión, permite desarrollar productos químicos que se podrían utilizar para interferir en el proceso, llegando a ser productos terapéuticos, es decir, que se pudieran utilizar para atajar la enfermedad una vez desarrollada la epizootia. Por otra parte, el mayor conocimiento de las secuencias del VHSV implicadas en procesos como la fusión, permite diseñar mutantes múltiples que resulten en la atenuación del virus y que se puedan utilizar para el desarrollo de vacunas vivas atenuadas o vacuna ADN.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un gen G mutante de VHSV que codifica una pG mutante de VHSV que comprende al menos una mutación y tiene una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende dicho gen G mutante de la invención, así como su empleo en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales susceptibles de ser infectados por VHSV. Células huésped que comprenden dicho vector constituyen un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un VHSV mutante cuyo genoma comprende dicho gen G mutante de la invención, junto con el resto de genes de VHSV. El empleo de dicho VHSV mutante en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales susceptibles de ser infectados por VHSV constituye un aspecto adicional de esta invención. Asimismo, células huésped transfectadas o infectadas con dicho VHSV mutante constituyen un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una vacuna que comprende un gen G mutante de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicho gen G mutante puede estar incorporado en dicho vector o bien en dicho VHSV. En una realización particular, dicha vacuna se selecciona entre una vacuna ADN y una vacuna viva atenuada.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un animal no humano transgénico cuyas células contienen, integrado en su genoma, un gen G mutante de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una pG mutante de VHSV codificada por dicho gen G mutante de la invención. El procedimiento para obtener dicha pG mutante constituye un aspecto adicional de esta invención.

Los posibles animales no humanos mencionados en la invención, se refieren fundamentalmente a peces y dentro de los peces a aquellos que sufren la enfermedad del VHSV, los salmónidos de aguas frías: salmón y trucha.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la localización, el número de aminoácidos cambiados en los 22 aislados de VHSV y el porcentaje de núcleos en sincitios de mutantes en la región correspondiente desde el aminoácido 56 al 159 de la proteína G de VHSV. Las cisteínas están en negrita. Los puentes disulfuro entre C110 y C152 son representados como una línea horizontal conectando ambas cisteínas (Finer-Jensen *et al.*, 1998). Las posiciones y localizaciones de p9, p2 (dominio de unión a fosfolípido), p3 (secuencia conservada de rhabdovirus de pez de agua fría), p4 (lazo hidrófilo) y las secuencias frg11 (p9+p2) en pG [definidas según un trabajo anterior (Estepa *et al.*, 2001)] y el supuesto péptido de fusión (Walter & Kongsuwan, 1999) están indicadas por líneas horizontales anchas. Las flechas verticales indican las localizaciones de los mutantes resistentes al AcM C10 en las posiciones 139 y 140 que no perdieron la fusión (Gaudin *et al.*, 1999). Los aminoácidos de las heptadas hidrofóbicas repetidas están subrayados (Coll, 1995).

La Figura 2 muestra los perfiles FACS representativos obtenidos por tinción de las células EPC transfectadas con las distintas pG de VHSV mutadas y células EPC no transfectadas con anticuerpos policlonales (AcPs) anti-pG. Las monocapas celulares de EPC fueron transfectadas con los plásmidos pMCV1.4 que codificaban para cada una de las pG mutantes de VHSV (pMCV1.4-pG mutantes). Las monocapas de células EPC no transfectadas fueron preparadas en paralelo. Dos días después, tanto las células EPC transfectadas como las no transfectadas fueron teñidas con AcPs anti-pG y FITC-GAR. Las células fueron separadas de las monocapas y analizadas por FACS. Los experimentos se repitieron 2-6 veces para cada mutante. Se muestra un experimento representativo en la figura mientras que la media y la desviación estándar se muestran en la Tabla 1. El mutante P148K fue eliminado de la figura para una mejor representación. Las fluorescencias relativas están en unidades logarítmicas. En gris se muestran las células EPC no transfectadas y en negro las células EPC transfectadas.

La Figura 3 muestra la aparición de sincitios (A) y el porcentaje de núcleos en sincitios inducido por bajos pHs en células EPC transfectadas con plásmidos pMCV1.4 que codificaban para las pG mutantes de VHSV (pMCV1.4-pG mutantes) (B). Las monocapas de células EPC fueron transfectadas con los plásmidos pMCV1.4 que codificaban para cada una de las pG mutantes de VHSV. Dos días después, el medio de cultivo celular fue reemplazado por medio a diferentes pHs durante 15 minutos y, posteriormente, con medio fresco a pH 7,4 durante 2 horas. Las monocapas fueron fijadas, teñidas y los núcleos en sincitios contabilizados (n=1.300). En la Figura 3B se representan los valores medios procedentes de 2-3 experimentos por mutante. ● tipo salvaje; □, mutante P79A; ○ mutante R103A; △, mutante L85S; ★ mutante T135E; ■ mutante P86A, P65A, P86AG98A, R107A, F115K, F147K, W154K, P148K, A96E.

10 Descripción detallada de la invención

La invención se relaciona, en general, con unos mutantes del gen G que codifican unas proteínas G mutantes de VHSV, que comprenden, al menos, una mutación, en donde dicha mutación (o mutaciones) que afecta(n) a dichas pG mutantes producen un defecto, total o parcial, en su capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un gen G mutante de VHSV que codifica una pG mutante de VHSV, en adelante gen G mutante de la invención, en donde dicha pG mutante de VHSV comprende al menos una mutación y tiene una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula.

Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva” significa que la pG mutante de VHSV codificada por dicho gen G mutante de la invención tiene *menor capacidad* de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV que la pG nativa de VHSV tomada como referencia. Asimismo, la expresión “capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV nula”, tal como aquí se utiliza, significa que la pG mutante de VHSV codificada por dicho gen G mutante de la invención es *completamente incapaz* de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV. La capacidad de fusión de una proteína G mutante de VHSV puede ser determinada mediante un ensayo de fusión célula-célula EPC transfectada con un vector que comprende el gen G mutante a estudiar (que codifica la proteína G mutante de VHSV a ensayar), tal como se describe en el Ejemplo 1, en el apartado correspondiente a los Materiales y Métodos.

La secuencia de aminoácidos de la pG nativa de VHSV tipo salvaje (wt) tomada aquí como referencia es la descrita por Thiry en la cepa 07.71 de VHSV (Thiry, 1991). El gen G mutante de la invención se basa en dicha secuencia de nucleótidos del gen G de VHSV (wt) e incluye una o más mutaciones en distintas regiones de dicha secuencia de nucleótidos de manera que codifica una pG mutante de VHSV que comprende al menos una mutación en su secuencia de aminoácidos respecto a la pG nativa y tiene una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “mutación” se refiere a la alteración de uno o más nucleótidos en el gen G de VHSV wt que va a dar lugar al cambio de, al menos, un aminoácido en la pG nativa de VHSV como resultado de la expresión de la secuencia de nucleótidos donde se ha producido dicha alteración. En una realización particular, dicha pG mutante de VHSV comprende una única mutación, mientras que, en otra realización particular, dicha pG mutante de VHSV comprende dos o más mutaciones.

Asimismo, en una realización particular, el gen G mutante de la invención codifica una pG mutante de VHSV que comprende al menos una mutación en su secuencia de aminoácidos respecto a la pG nativa y tiene una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva. En otra realización particular, preferida, el gen G mutante de la invención codifica una pG mutante de VHSV que comprende al menos una mutación en su secuencia de aminoácidos respecto a la pG nativa y tiene una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV nula.

El gen G mutante de la invención comprende una o más mutaciones en la secuencia de nucleótidos del gen G de VHSV wt que dan como resultado una o más mutaciones (cambios o sustituciones de aminoácidos) en la secuencia de aminoácidos de la pG nativa dando lugar, por tanto, a una pG mutante que tiene la particularidad de que es defectiva o nula en cuanto a su capacidad de fusión, es decir, carece parcial o totalmente de la capacidad de unirse a los receptores de la pG nativa de VHSV en células susceptibles de ser infectadas por VHSV. Dichas mutaciones abarcan diferentes dominios de la pG de VHSV, tales como, el dominio corriente arriba (upstream) de la región p2, el dominio de unión al fosfolípido (p2), el dominio corriente abajo (downstream) de la región p2 y en el dominio del péptido de fusión.

Por simplicidad, los distintos genes G mutantes de VHSV ejemplificados en esta descripción se identificarán indicando la mutación resultante a nivel de aminoácido. Para la nomenclatura de las mutaciones en los aminoácidos se han seguido las recomendaciones contenidas en las siguientes referencias: (i) den Dunnen JT, Antonarakis SE. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Hum Mutat. 15(1):7-12; y (ii) Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. Hum Mutat. 11(1):1-3. A modo ilustrativo, una mutación identificada como “P65A” indica que la prolina situada en la posición 65 de la secuencia de aminoácidos de la pG de VHSV nativa ha sido sustituida por una alanina.

En una realización particular, el gen G mutante de la invención codifica una pG mutante de VHSV cuya mutación se localiza en el dominio upstream p2, es decir, desde el aminoácido 58 al 80 de la secuencia de aminoácidos de la pG nativa de VHSV. Ejemplos ilustrativos de este tipo de mutaciones incluyen las mutaciones: P65A y P79A.

5 En otra realización particular, el gen G mutante de la invención codifica una pG mutante de VHSV cuya mutación se localiza en el dominio de unión al fosfolípido (p2) de la pG de VHSV, es decir, desde el aminoácido 82 al 109 de la secuencia de aminoácidos de la pG nativa de VHSV. Ejemplos ilustrativos de este tipo de mutaciones incluyen las mutaciones: I82S, L85S, P86A, P86AG98A, A96E, G98A, G98AH99S, R103A y R107A. En otra realización particular, el gen G mutante de la invención codifica una pG mutante de VHSV cuya mutación se localiza en el
10 dominio downstream p2, es decir, desde el aminoácido 110 al 144 de la secuencia de aminoácidos de la pG nativa de VHSV. Ejemplos ilustrativos de este tipo de mutaciones incluyen las mutaciones: F115K y T135E.

En otra realización particular, el gen G mutante de la invención codifica una pG mutante de VHSV cuya mutación se localiza en el dominio del péptido de fusión de la pG de VHSV, es decir, desde el aminoácido 142 al 159 de la
15 secuencia de aminoácidos de la pG nativa de VHSV. Ejemplos ilustrativos de este tipo de mutaciones incluyen las mutaciones: F147K, P 148K y W 154K.

Sorprendentemente, cuando dichas sustituciones se introducen en los dominios señalados dentro de la pG nativa de VHSV, se obtienen unas pG mutantes de VHSV con capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectarlas por VHSV defectiva o nula, es decir, que han perdido parcial o totalmente la capacidad de fusionarse a células
20 susceptibles de ser infectadas por VHSV.

La pG de VHSV, tal como se ha mencionado previamente, es la proteína viral responsable de la fusión del virus a la célula susceptible de ser infectada por VHSV así como la proteína viral responsable de la respuesta inmunológica de los posibles huéspedes de VHSV (animales susceptibles de ser infectados por VHSV), por lo que el gen G mutante de la invención puede ser utilizado para inmunizar animales susceptibles de ser infectados por VHS V utilizando como
25 inmunógeno un único gen de dicho virus, tal como el gen G mutante de la invención.

Tal como se utiliza en esta invención, la expresión “huéspedes de VHSV” o “animales susceptibles de ser infectados por VHSV” se refiere a cualquier animal que puede ser infectado por VHSV e incluye animales acuáticos, por ejemplo, salmónidos, tales como truchas, distintas especies de salmón etc., así como otros animales acuáticos susceptibles de ser infectados por VHSV tales como bacalao, rodaballos, lubinas, anguilas, peces planos, y langostinos.

El gen G mutante de la invención presenta numerosas aplicaciones. A modo ilustrativo, el gen G mutante de la invención, en ausencia de la totalidad o parte de los otros genes constitutivos del genoma de VHSV, y, opcionalmente incorporado en vectores apropiados, es, por sí mismo, susceptible de varias posibles aplicaciones, tales como, por ejemplo, (i) en la elaboración de vacunas ADN, (ii) en la elaboración de vacunas vivas atenuadas constituidas por VHSV completos mutantes que contienen un gen G mutante de la invención junto con los restantes genes de VHSV, (iii) en la generación de animales no humanos transgénicos, (iv) en la elaboración de reactivos para el diagnóstico de la infección causada por VHSV, etc.
35 40

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, en adelante vector de la invención, que comprende un gen G mutante de la invención. En una realización particular, dicho vector de la invención es un plásmido de ADN o un vector de expresión capaz de ser expresado en células eucariotas, por ejemplo, en células animales, que comprende dicho gen G mutante de la invención. El vector de la invención puede contener, además, los elementos necesarios para la expresión y traducción del gen G mutante de la invención así como los elementos reguladores de su transcripción y/o traducción. Cuando el vector de la invención se introduce, por cualquier método convencional, por ejemplo, por inyección, transfección o transformación, en células de un huésped susceptible de ser infectado por VHSV, las células en las que se ha introducido dicho vector de la invención expresan una pG mutante de VHSV con capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula, preferentemente, nula, pero capaz de inmunizar al huésped frente a VHSV ya que dicha pG mutante se dirige a la membrana celular, desencadenando reacciones de respuesta inmune en el animal muy semejantes a las que produce una infección con el VHSV completo. De esta manera se puede vacunar contra el VHSV sin utilizar el virus completo, sino simplemente utilizando el gen G mutante de la invención incorporado en un vector adecuado (Fernández-Alonso *et al.*, 1999; Fernández-Alonso *et al.*, 2000). El vector de la invención, que comprende un gen G mutante de la invención, constituye, por tanto, la base de una vacuna ADN y puede ser utilizado, en ausencia del virus completo, para inmunizar animales susceptibles de ser infectados por VHSV.
45 50 55

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un vector de la invención en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales susceptibles de ser infectados por VHSV. En una realización particular, dicha vacuna es una vacuna ADN.

Asimismo, el gen G mutante de la invención puede ser utilizado para obtener un VHSV completo mutante, es decir, un VHSV que contiene un gen G mutante de la invención junto con los restantes genes de VHSV, los cuales pueden ser, independientemente entre sí, nativos o mutantes.
60 65

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un posible VHSV mutante, en adelante VHSV mutante de la invención, cuyo genoma comprende un gen G mutante de la invención junto con el resto de genes de VHSV,

en donde dicho gen G mutante codifica una pG mutante de VHSV, comprendiendo dicha pG mutante de VHSV al menos una mutación y teniendo dicha pG mutante de VHSV una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva. Los restantes genes, distintos al gen G mutante de la invención, que componen el VHSV mutante de la invención pueden ser, independientemente entre sí, nativos o mutantes.

El VHSV mutante de la invención tiene la capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva y, por tanto, es capaz de llevar a cabo la función implicada en el proceso de fusión viral a la membrana de la célula a infectar solo parcialmente, por lo que estaría atenuado.

El VHSV mutante de la invención, después de infectar experimentalmente células susceptibles de ser infectadas por VHSV, expresa una pG mutante de VHSV con capacidad parcial de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV, es decir, con una capacidad reducida para infectar nuevas células huésped al no poder fusionar al 100% su membrana con la membrana de la célula huésped a infectar. Sin embargo, dichos VHSV mutantes dejarían inmunizado al huésped. Por tanto, dicho VHSV mutante de la invención puede ser utilizado con fines terapéuticos, por ejemplo, en la prevención de la infección causada por VHSV.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichos VHSV mutantes en la elaboración de vacunas destinadas a conferir protección a animales susceptibles de ser infectados por VHSV. En una realización particular, dichas vacunas son vacunas vivas atenuadas.

Los VHSV mutantes de la invención pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. No obstante, en una realización particular, dichos VHSV mutantes de la invención pueden ser obtenidos mediante técnicas de genética reversa conocidas por los expertos en la materia.

La invención también se relaciona, en otro aspecto, con una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un gen G mutante de la invención y, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, dicho gen G mutante de la invención está incorporado en un vector de la invención mientras que en otra realización particular, dicho gen G mutantes está incorporado en un VHSV mutante de la invención.

La vacuna proporcionada por esta invención es útil para proteger animales susceptibles de ser infectados por VHSV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de gen G mutante de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias del gen G mutante de la invención utilizado y el efecto de inmunización a conseguir.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse para formular una vacuna de acuerdo a la presente invención, tienen que ser estériles y fisiológicamente compatibles tales como, por ejemplo, agua estéril, solución salina, tampones acuosos tales como PBS, alcoholes, polioles y similares. Además, dicha vacuna puede contener otros aditivos, tales como adyuvantes, estabilizadores, antioxidantes, conservantes y similares. Los adyuvantes disponibles incluyen pero no limitan a sales o geles de aluminio, carbómeros, copolímeros en bloque no iónicos, tocoferoles, dipéptido muramil, emulsiones aceitosas, citoquinas, etc. La cantidad de adyuvante a añadir depende de la naturaleza propia del adyuvante. Los estabilizadores disponibles para su uso en vacunas de acuerdo con la invención son, por ejemplo, carbohidratos, incluyendo sorbitol, manitol, destripa, glucosa y proteínas tales como albúmina y caseína, y tampones como fosfatos alcalinos. Los conservantes disponibles incluyen, entre otros, timerosal, mertiolato y gentamicina.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a VHSV, para lo cual dicha vacuna se formulará en la forma adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la vacuna se formula para ser introducida en el animal cuando éste se sumerge en un baño que contiene dicha vacuna; en otra realización particular, la vacuna se prepara para su administración como un inyectable. A modo ilustrativo, dicha vacuna puede prepararse en forma de una solución o suspensión acuosa, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención pueden ser una vacuna ADN (utilizando un vector de la invención que comprende un gen G mutante de la invención) o bien una vacuna viva atenuada (basada en un VHSV mutante de la invención cuyo genoma comprende un gen G mutante de la invención).

La vacuna proporcionada por la presente invención puede ser preparada empleando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular, dicha vacuna es preparada mediante la mezcla, en su caso, de un vector de la invención o de un VHSV mutante de la invención, con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Adicionalmente, el gen G mutante de la invención puede ser utilizado en la generación de un animal no humano transgénico cuyas células contienen, integrado en su genoma, un gen G mutante de la invención. Dicho animal no humano puede ser cualquier animal, tal como un animal acuático, por ejemplo, un pez. A modo ilustrativo, dicho pez

podría ser un salmónido, tal como una trucha. El animal no humano transgénico proporcionado por esta invención expresa una pG mutante de VHSV que comprende al menos una mutación y tiene una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula. Dichos animales no humanos transgénicos pueden ser obtenidos por métodos convencionales, conocidos por los expertos en la materia, a partir, por ejemplo, de un gen G mutante de la invención o de un vector que lo contiene, tal como un vector de la invención. Información sobre transferencia génica a células eucariotas y organismos enteros puede encontrarse en, por ejemplo, el libro titulado “Ingeniería genética y transferencia génica”, de Marta Izquierdo, Ed. Pirámide (1999), especialmente en el Capítulo 8.

Asimismo, el gen G mutante de la invención puede ser utilizado en la elaboración de reactivos para el diagnóstico de la infección causada por VHSV, por ejemplo, en la obtención de sondas para ensayos genéticos, anticuerpos obtenidos en peces, etc. La obtención de anticuerpos contra el VHSV para diagnóstico es problemática ya que su obtención en mamíferos es poco eficiente. A los 37°C del cuerpo de conejos o ratones, el virus y sus proteínas, especialmente la pG, se desnaturalizan y hacen difícil la obtención de altos títulos de anticuerpos anti-proteínas de VHSV en mamíferos. Por otra parte, la obtención de anticuerpos neutralizantes, por ejemplo, en salmón o trucha, aunque sería óptima a los 20°C no es posible con virus completo ya que el VHSV mata a dichas especies antes de que se produzcan anticuerpos. El uso de virus atenuados permitiría, por tanto, obtener anticuerpos anti-proteínas de VHSV en peces a bajas temperaturas.

El gen G mutante de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. No obstante, en una realización particular, dicho gen G mutante de la invención puede ser obtenido introduciendo la mutación deseada mediante mutagénesis dirigida. Para ello, brevemente, tal como se describe en el apartado relativo a los Materiales y Métodos (Ejemplo) se sometió al vector plasmídico pGEMTeasy-G, que contiene la pG nativa de VHSV bajo el control del promotor T7, a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 2 iniciadores de 15 nucleótidos cada uno que proporcionaban la mutación deseada por cada mutación a ensayar. A continuación, se subclonaron los genes G mutantes en plásmidos pMCV1.4 para dar lugar a los correspondientes plásmidos pMCV1.4-G (portando cada uno de ellos un gen G mutante con la mutación deseada) con el fin de llevar a cabo los ensayos de la expresión de la pG mutante (mediante citometría de flujo) en la membrana superficial de células EPC (línea celular de epitelio derivado de carpa) transfectadas con dichos pMCV1.4-G.

Aunque en la realización práctica ilustrada en la presente invención, el método empleado para generar las secuencias de los genes G mutantes ha sido la mutagénesis dirigida, se podría emplear cualquier otro método conocido en el estado de la técnica que diera lugar a los mismos resultados. Asimismo, aunque en la presente invención, la forma de conseguir mutaciones en el genoma es mediante la sustitución de nucleótidos, sería igualmente válido cualquier otro procedimiento, que diese lugar a un resultado análogo al obtenido por sustitución.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una pG mutante de VHSV codificada por un gen G mutante de la invención, en adelante pG mutante de la invención, seleccionada entre una pG mutante que tiene la mutación P65A; una pG mutante que tiene la mutación P79A; una pG mutante que tiene la mutación I82S; una pG mutante que tiene la mutación L85S; una pG mutante que tiene la mutación P86A; una pG mutante que tiene la mutación P86AG98A; una pG mutante que tiene la mutación A96E; una pG mutante que tiene la mutación G98A; una pG mutante que tiene la mutación G98AH99S; una pG mutante que tiene la mutación R103A; una pG mutante que tiene la mutación R107A; una pG mutante que tiene la mutación F115K; una pG mutante que tiene la mutación T135E; una pG mutante que tiene la mutación F147K; una pG mutante que tiene la mutación P148K; y una pG mutante que tiene la mutación W154K.

Dichas pG mutantes de la invención contienen una o dos mutaciones y tienen una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula. A modo ilustrativo, la proteína G mutante de la invención (resultante de la expresión del gen G mutante de la invención) puede ser completamente incapaz de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV (es decir, a los receptores o membranas celulares de la proteína G nativa de VHSV), tal como las proteínas G mutantes de VHSV identificadas como P65A, P86A, P86AG98A, A96E, G98A, G98AH99S, R107A, F115K, F147K, P148K y W154K (véase la Tabla 1) o bien capaz de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV aunque con menor capacidad de fusión (es decir, con una capacidad de unión de las proteínas G mutantes a los receptores o membranas celulares de la proteína G nativa de VHSV menor que la capacidad de unión de la proteína G nativa de VHSV), tal como las proteínas G mutantes de VHSV identificadas como P79A, L85S, R103A y T135E, las cuales muestran una capacidad de fusionarse a los receptores comprendida entre 9,2±3,5% a pH 5,0 (L85S) y 27,7±4,1% a pH 5,0 (R103A) o bien de 23,5±2,4% a pH 5,3 (P79A) [Tabla 1]. No se han podido sacar conclusiones sobre las posibles propiedades de fusión defectuosas de la proteína G mutante de la invención con la mutación I82S ya que, aunque se ha expresado en el citoplasma, no se ha podido detectar en las membranas de las células transfectadas.

El mutante I82S, aunque se expresó en el citoplasma, no se detectó en las membranas de las células transfectadas y, por tanto, no se pudieron sacar conclusiones sobre sus posibles propiedades de fusión defectuosas (Tabla 1).

El vector que comprende el gen G mutante de la invención puede utilizarse, además, para transformar o transfectar una célula huésped apropiada, tal como una célula eucariota, por ejemplo, una célula de un animal superior (mamífero, pez, etc.), capaz de expresar dicho gen G mutante y producir la correspondiente pG mutante de VHSV. Dicho gen G mutante de la invención puede integrarse en un cromosoma de dicha célula o bien puede estar presente en dicha célula

en la forma de un plásmido episomal. La transformación y la transfección de dichas células huésped puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular, el gen G mutante de la invención está incorporado en un vector, tal como un vector de la invención, mientras que, en otra realización particular, dicho gen G mutante de la invención está incorporado en un VHSV mutante de la invención. Prácticamente, cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por VHSV y capaz de permitir el crecimiento del virus puede ser utilizada. No obstante, en una realización particular, dicha célula huésped es la línea celular EPC (*Epithelioma Papullosum cyprisi*), es decir, una línea celular de epiteloma derivada de carpa. Dichas células huésped que contienen un gen G mutante de la invención bien integrado en un cromosoma o bien como un plásmido episomal, constituyen un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir una pG mutante de la invención que comprende cultivar una célula que comprende un gen G mutante de la invención bajo condiciones que permiten la expresión de dicho gen y, si se desea, retirar la pG mutante producida del medio de cultivo. Las condiciones de cultivo dependerán, entre otros factores, de la célula utilizada. Aunque prácticamente cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por VHSV y capaz de permitir el crecimiento de VHSV puede ser utilizada, en una realización particular, dicha célula huésped útil para la producción de la proteína G mutante de la invención, es la línea celular EPC.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Genes G mutantes de VHSV

I. Materiales y métodos

Plásmidos utilizados

Para la generación de la construcción pGEMTeasy-G portadora del gen de la pG nativa de VHSV se partió de la construcción pcDNAI [donada por el Dr. Michel Brémont, INRA (Institut National Recherche Agronomique), Jouy en Josas, Paris, Francia] que contiene el gen de la pG de VHSV (aislado francés 07.71) clonado en el vector pcDNAI (4,0 kpb) (Invitrogen), y se subclonó en el vector comercial pcDNAFAmp (4,8 kpb) (Invitrogen) [Fernández-Alonso, 1999] y posteriormente en el vector comercial pGEMTeasy (Stratagene) bajo el control del promotor de T7.

Para llevar a cabo los ensayos de fusión basados en fluorescencia o en formación de sincitios, la colección de mutantes de pG obtenida en pGEMTeasy, se subclonó en el plásmido pMCV1.4 (Ready Vector, Madrid, España). Para ello, se obtuvo el gen de la pG nativa de VHSV mediante una digestión preparativa a partir de 2 µg de la construcción pGEMTeasy-G con *EcoRI* (10 U/µl) (GibcoBRL, Postfach, Germany) durante 2 h a 37°C en un aparato Techne dri-block. De igual manera, se linealizó el vector pMCV1.4. La *EcoRI* se inactivó a 65°C durante 15 minutos y, a continuación, se añadió fosfatasa alcalina SAP (shrimp alkaline phosphatase) (Roche, Barcelona, España). La mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos y después se inactivó la fosfatasa alcalina a 65°C durante 15 minutos. Los productos de las digestiones se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP, low melting point) al 1%, recuperando y purificando las bandas obtenidas con columnas del kit comercial SNAP (Invitrogen, Barcelona, España). Se realizó la ligación del plásmido y del inserto que contenía la secuencia codificante de la pG (razón plásmido:inserto 1:3, incluyendo controles sin inserto), a temperatura ambiente durante 2 h utilizando la DNA ligasa de T4 (Roche) en un volumen final de 20 µl por mezcla de ligación por mutante.

Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida se basó en el método Quick-Change (Stratagene, La Jolla, Ca, USA) para generar los genes G mutados en el plásmido pGEMTeasy-G (que contiene el gen de la pG de VHSV nativo) [Cameiro *et al.*, 2001]. Para cada mutante se diseñaron dos oligos de 15 nucleótidos, que contenían las mutaciones deseadas. En todos los casos, los oligos se extendieron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la ADN polimerasa Pfu turbo (Stratagene), generando plásmidos mutantes con cadenas abiertas sin metilar que contenían la mutación introducida en los oligos. Después se trató la mezcla con la endonucleasa de restricción *DpnI* específica de ADN metilado, que digiere solo las cadenas del ADN parental inicial, quedando intacto el plásmido amplificado. Dicho plásmido, que contiene la mutación deseada, se utilizó posteriormente para transformar células XL1-blue competentes (Stratagene). Los mutantes del gen de la pG mutada se subclonaron en el sitio *EcoRI* del plásmido pMCV1.4 (Rocha *et al.*, 2004a, Rocha *et al.*, 2004b) siguiendo los métodos convencionales para *E. coli* Top10 (Fernández-Alonso *et al.*, 1999) para dar lugar a los correspondientes plásmidos pMCV1.4-G (portando cada uno de ellos un gen G mutante con la mutación deseada). Se prepararon grandes cantidades de plásmido utilizando el sistema de purificación de ADN Megaprep Wizard (Promega, Madison, USA). Las soluciones plasmídicas fueron ajustadas a 0,5-1 mg/ml del ADN total (absorbancia a 260 nm). La confirmación de las secuencias mutadas se llevó a cabo mediante la secuenciación de los plásmidos a través de la región mutada en ambas direcciones.

Transfección de las células EPC con los plásmidos mutados

Se cultivaron células de epiteloma de carpa *Papulosum cyprini* (EPC) [Fijan *et al.*, 1983] en placas de 96 pocillos a 28°C con medio RPMI Dutch, tampón HEPES 20 mM y 10% de suero de ternera fetal (100 µl por pocillo). Las células fueron transfectadas (aproximadamente 100.000 células/pocillo) con 0,3 µg de los diferentes mutantes pMCV 1.4-G previamente acomplexados con 0,5 ml de Eugene 6 (Roche, Barcelona, España) (López *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2004a; Rocha *et al.*, 2004b) e incubadas a 20°C en 5% de CO₂ durante dos días.

Tinción de las monocapas de células EPC transfectadas

Después de la transfección, se tiñeron las monocapas de células EPC con anticuerpos policlonales (AcP) anti-pG obtenidos en conejos (proporcionados por el Dr. Lorenzen, Dinamarca) [Lorenzen & LaPatra, 1999], en medio de cultivo que contenía 2% de suero de conejo, 2% de suero de cabra y 2% de extracto de *E. coli*, durante 1 hora tras permeabilización con 2-perm (BD-Biosciences, Becton-Dickinson, España) (para estimar la expresión citoplasmática) o sin permeabilización (para estimar la expresión en membrana). A continuación, las células se incubaron con el fragmento Fab'2 anti-conejo de cabra fluorescente (FITC-GAR) (Caltag, S.Francisco, CA, EEUU), se lavaron y se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia (expresión citoplasmática) o separadas con tampón FACS (Becton-Dickinson) y analizadas por citometría de flujo (región FL1 514-545 nm, verde) en un aparato FACScan (Becton-Dickinson) usando el programa LYSYS II (expresión de membrana). Se obtuvieron registros de fluorescencia de fondo usando células EPC no transfectadas observándose que variaban ligeramente de experimento a experimento. Para calcular el porcentaje de células fluorescentes por cada experimento se utilizó la siguiente fórmula: área bajo la curva obtenida con células transfectadas - área bajo la curva obtenida con células transfectadas solapando con la curva de fondo / área total bajo la curva obtenida con células EPC transfectadas x 100. Para calcular las intensidades de fluorescencia para cada experimento, se restó el valor del pico de fluorescencia de fondo del valor del pico obtenido con células EPC transfectadas. La intensidad de fluorescencia fue expresada en unidades relativas de fluorescencia (urf).

Ensayos de fusión célula-célula EPC transfectada

Para llevar a cabo los ensayos de fusión, las células EPC plaqueadas en placas de 24 pocillos (aproximadamente 500.000 células/pocillo) fueron transfectadas con 0,6 mg de diferentes mutantes pMCV 1.4 acomplexados con 2 µl de Eugene 6 (Fernández-Alonso *et al.*, 1999; López *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2002) e incubadas a 20°C. Dos días después, las monocapas de células transfectadas fueron incubadas durante 15 minutos en medio de cultivo RPMI Dutch que contenía HEPES 20 mM / MES 20 mM (Sigma, Chem. Co., St.Louis, Missouri, EEUU) a diferentes pHs (5,0, 5,3, 5,6, 6,0, 6,3, 7,0 y 7,3) a 20°C. Los ensayos de formación de sincitios no pudieron ser llevados a cabo a un pH más bajo de 5,0 debido al desprendimiento de las monocapas de células EPC. A continuación, las monocapas se incubaron durante 2 h a pH 7,6, se fijaron con metanol frío, se lavaron, secaron y se tiñeron con Giemsa (Rocha *et al.*, 2004a; Rocha *et al.*, 2004b). Los resultados se expresaron como el porcentaje de núcleos en sincitios calculados por la siguiente fórmula: número de núcleos en sincitios de tres o más células por sincitios/número de núcleos x 100.

Ensayos de unión a fosfolípido

Para ensayar la unión a fosfolípido, se secaron 100 pl/pocillo de 0,1 mg/ml (1 µg por pocillo) de péptidos sintéticos (Chiron-Mimotopes, Victoria, Australia) en placas de 96 pocillos tal como se describió previamente (Estepa *et al.*, 1996a; Estepa *et al.*, 1996b). L-3-fosfatidil-[L-C3-¹⁴C]Serina (PS) marcada, de 55 mCi/mmol (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) fue secada a vacío en tubos de cristal y sometida a sonicación en tampón de citrato-fosfato 0,1 M a pH 7,7 (Gaudin *et al.*, 1993). La PS marcada fue añadida en un volumen de 100 µl por pocillo a los péptidos en fase sólida (200 pmoles por pocillo). Después de 4 horas de incubación a 20°C, se lavaron las placas y se extrajeron con 100 ml/pocillo de 2% de dodecilsulfato sódico (SDS) en etilendiamina 50 µM, pH 11,5 a 60°C durante 30 minutos. Los sobrenadantes fueron pipeteados en placas de 96 pocillos de polietileno tereftalato que contenían 100 pi por pocillo de líquido de centelleo Hiloal (LKB, Loughborough, R. Unido) y contados en un contador de centelleo 1450-Microbeta (Wallac, Turku, Finlandia). La unión de fondo obtenida en ausencia de péptidos (1,25 pmoles por pocillo) fue sustraída de todos los datos y las cuentas fueron transformadas en pmoles de PS.

II. Resultados*Selección de mutaciones puntuales*

Se llevó a cabo una comparación entre las secuencias de las pG de 22 aislados de VHSV para seleccionar las mutaciones a introducir en la pG. Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las regiones hipotéticas de unión al fosfolípido y de los péptidos de fusión (posiciones 56 a 159) de los 22 aislados se obtuvieron del GenBank (números de acceso: A10182, AB060725, AB060727, AF143862, AF345857, AF345858, AF345859, AJ233396, N0000855, U28799-2, U28747, U88056, U28800, U88050, U88051, U88052, U88053, U88054, U88055, X73873 y X66134). Las secuencias de aminoácidos traducidas estaban altamente conservadas entre los aislados. Las variaciones de aminoácidos entre los aislados de VHSV estaban principalmente concentradas en dos localizaciones alrededor de las posiciones 80 y 140 (Figura 1). De este modo, la mayoría de los cambios se encontraron en la posición R81 (arginina) que cambiaba a Q (glutamina) o K (lisina) [16 aislados], y en la posición D136 (aspártico) que cambiaba a N (asparagina) [14 aislados]. Se encontraron variaciones menos abundantes de aminoácidos en 2-4 aislados en las po-

siciones 71, 80, 97, 112, 118, 138 y 139. Las posiciones en las que se detectaron variaciones de aminoácidos fueron excluidas del diseño del mutante porque no se había descrito una actividad de fusión alterada en ninguno de esos aislados.

5 Las posiciones seleccionadas para la mutación se cambiaron a A (alanina) cuando fue posible, o a un aminoácido de propiedades físico-químicas diferentes a las de la posición mutada, dependiendo de las posibilidades para cada nucleótido cambiado. Las posiciones seleccionadas en el péptido hipotético de unión a fosfolípido (p2+frg11) incluían las altamente conservadas P (prolina) y G (glicina) desestabilizadoras de hélices (P65, P79, P86 y G98) y las argininas cargarlas localizadas en la parte carboxilo terminal (R103 y R107). Todos estos aminoácidos fueron cambiados a A (alanina). Otras posiciones seleccionadas en los aminoácidos pertenecientes a algunos de las repeticiones de heptadas hidrofóbicas no canónicas (I82, L85, A96) se cambiaron a aminoácidos hidrófilos (S, serina) o cargados (E, glutámico). Las posiciones F115 y T135 localizadas entre el péptido hipotético de unión al fosfolípido y el péptido de fusión se mutaron a un aminoácido cargado (K y E respectivamente). Debido a que los aminoácidos hidrofóbicos F147, P148 y W154, localizados en el motivo del péptido de fusión hipotético (E,Y)PXPXXCX(WF), estaban conservados entre 15 14 rhabdovirus animales (Walter & Kongsuwan, 1999), dichos aminoácidos también fueron mutados en VHSV a un aminoácido cargado (E o K).

Expresión de la pG mutante en células EPC transfectadas

20 Todos los plásmidos que contenían pG mutantes obtenidos para VHSV se expresaban en el citoplasma de las células EPC transfectadas permeabilizadas, tal como se verificó por inmunofluorescencia directa con anticuerpos policlonales anti-G (Tabla 1).

La Tabla 1 muestra que el porcentaje estimado de células EPC transfectadas que expresan pG en sus membranas, después de hacer el promedio entre los resultados de 2-6 réplicas por mutante, variaba de 42,4 a 77,2% (excepto para I82S, que no se había expresado). El 53,5±11% de las células EPC transfectadas con el gen de la pG nativa expresaban pG en sus membranas. De manera análoga, la pG se expresó en el 50,2-77,2% de las células EPC transfectadas con los mutantes P65A, L85S, P86A, P86AG98A, G98A, G98AH99S, R103A, R107A, F115K, P148K y W154K. Los mutantes P79A y A96E no se transfectaron tan eficientemente como el resto de los mutantes (42,5% y 44,5%, respectivamente) y la expresión del mutante I82S en la membrana de las células EPC transfectadas fue muy baja o no significativamente diferente de los niveles basales (1,3±0,3% de las células transfectadas).

La Figura 2 muestra, para cada mutante, un perfil de células teñidas con FACS no transfectadas/transfectadas representativo de las 2-6 réplicas indicadas en la Tabla 1. Debido a que la eficacia de la fusión depende altamente de la densidad de la pG en la superficie de la célula, se estimó el nivel relativo de expresión por célula procedente de los perfiles FACS asumiendo que el anticuerpo reconoce a todos los mutantes por igual. Dado que el fondo obtenido con células EPC no transfectadas (curvas grises en los gráficos) variaba ligeramente de un experimento a otro, para comparar la expresión de la pG entre los mutantes, se eliminó el área solapante con el fondo de la fluorescencia para cada experimento. Los valores medios de la intensidad de la fluorescencia FACS se calcularon a partir de las réplicas. 40 La intensidad estimada obtenida de la cepa salvaje de pG fue de 18,7±4,1 urf (n=6) y sólo variaba respecto al resto de los mutantes entre 10,8 y 22,5 urf, excepto para el mutante I82S (Tabla 1).

Debido a que, al contrario de lo que ocurre en VSV, no se dispone de un ensayo proteolítico para estudiar los cambios conformacionales en la pG de VHSV inducidos a bajo pH, se usó un ensayo de unión a anticuerpos neutralizantes dependientes de conformación como una estimación de los posibles cambios conformacionales inducidos por mutación. El correcto plegamiento de la pG fue, asimismo, analizado con anticuerpos monoclonales (AcMs) dependientes de conformación, tal como el AcM C10 que reconoce simultáneamente las posiciones 140 y 433 (Bearzotti *et al.*, 1995; Gaudin *et al.*, 1999) y 2F1A12 que mapea en la posición 253 (Lorenzen, comunicación personal). Aproximadamente, el 21,6±9% de las células EPC transfectadas con la forma nativa del gen de la pG han expresado el epítipo C10 en sus membranas. En contraste, sólo el 0,3-1,6% de las células EPC transfectadas con cualquiera de los mutantes expresó el epítipo C10 (Tabla 1). Se obtuvieron resultados similares con los anticuerpos monoclonales 2F1A12 (datos no mostrados).

Ensayos de fusión célula-célula EPC transfectada

55 La Figura 3 muestra la apariencia típica de sincitios y las cinéticas de fusión obtenidas en ensayos de fusión célula-célula EPC transfectada con el gen G para el gen G nativo y sus mutantes. Bajo las condiciones experimentales ensayadas, la fusión para las células transfectadas con el gen G nativo fue máxima a pH 5,6 y decreció hasta el 70% aproximadamente a pH 6,0 y hasta 0% a pH 6,6. Sólo las células EPC transfectadas con los mutantes P79A, L85S, R103A y T135E mostraron actividad de fusión. Los mutantes R103A y T135E mostraron una fusión máxima a pH 5,0 y el porcentaje de núcleos en sincitios se redujo a 27,7±4,1% y 13,7±4,5%, respectivamente. Los mutantes P79A y L85S mostraron una fusión máxima a pH 5,3-5,6 y el porcentaje de núcleos en sincitios también se redujo a 23,5±2,4% y 9,2±3,5%, respectivamente. Los mutantes P79A y L85S (amino-terminal) y R103A (carboxi-terminal) flanquean las secuencias más internas del dominio de unión al fosfolípido p2.

65 Por otro lado, los mutantes P86A, P86AG98A, A96E, G98A, G98AH99S y R107A (la mayoría de las mutaciones localizadas en el interior del péptido hipotético de unión a fosfolípido) y P65A y F115K (mutaciones alrededor del péptido de unión a fosfolípido), fueron completamente defectivos en la fusión para todos los pH estudiados. Los

mutantes F147K, P148K y W154K, localizados en las posiciones altamente conservadas del péptido hipotético de fusión, fueron también defectivos en la fusión para todos los pH estudiados (pH igual o mayor de 5,0).

El mutante I82S, aunque se expresó en el citoplasma, no se detectó en las membranas de las células transfectadas y, por tanto, no se pudieron sacar conclusiones sobre sus posibles propiedades de fusión defectuosas (Tabla 1).

Unión al fosfolípido de los péptidos sintéticos correspondientes a la región p2

Debido a que p2 (82-109) era la región principal de un análisis pepscan de la pG que mostraba la unión a PS (Estepa *et al.*, 1996a; Estepa *et al.*, 2001), se introdujeron cambios en un único aminoácido en péptidos sintéticos derivados de la secuencia de p2, para estudiar si las mutaciones en esa región podían afectar a la unión a PS. Para sintetizar los péptidos se seleccionó la secuencia de aminoácidos que contenía del aminoácido 93 al 107 (que incluye los dos aminoácidos cargados positivamente R103 y 107) debido a que mostraba la máxima actividad de unión a PS de p2 (Estepa *et al.*, 1996a). Cada aminoácido de esta secuencia fue cambiado por una A y se midió el efecto de este cambio en la unión a PS en fase sólida. La actividad de unión a PS de la secuencia nativa fue de $2,47 \pm 0,34$ pmoles de PS por μg de péptido (Tabla 2). La actividad de unión a PS sólo varió de $2,1 \pm 0,46$ a $4,1 \pm 0,53$ pmoles de PS por μg de péptido entre los 15 péptidos sintéticos con cambios en un único aminoácido.

Debido a que tanto las interacciones hidrofóbicas como iónicas participan en la unión a PS por p2 (Gaudin *et al.*, 1999), se obtuvieron péptidos sintéticos en los que se introdujeron cambios más drásticos en las posiciones de aminoácidos cargados. Una de las posiciones 103 ó 107 pudo ser cambiada a una K sin que variara significativamente la unión a PS ($2,5 \pm 0,42$ ó $2,6 \pm 0,33$ pmoles de PS por μg de péptido respectivamente). La unión a PS únicamente podía reducirse cuando ambos aminoácidos eran cambiados simultáneamente a una K o una E ($1,3 \pm 0,19$ ó $0,75 \pm 0,36$ pmoles de PS por μg de péptido, respectivamente).

La sustitución de varios aminoácidos por una serie de A en posiciones 104-106, 95+104-106 y 99-102+104-106 también redujo la unión a PS a $2,1 \pm 0,28$, $1,69 \pm 0,29$ y $0,69 \pm 0,21$ pmoles de PS por μg de péptido respectivamente.

III. Discusión

Se han obtenido pG mutantes de VHSV con cambios conformacionales y fusión defectuosa, reducida o alterada al pH, en la región de unión al fosfolípido p2 y en los péptidos unidos a la región de fusión. Debido a que la existencia de mutantes de VSV defectivos en la fusión o con fusión reducida con un desplazamiento hacia valores más ácidos del pH óptimo, ha sido previamente interpretada como una indicación del papel de estas posiciones mutadas en la fusión, se puede concluir que las regiones antes mencionadas también participan en los procesos de fusión del VHSV. Resultados previos, tanto de penetración en modelos de membrana por p2 aislados en el pH de fusión, como de inhibición de la fusión obtenida con anticuerpos antipéptidos correspondientes a las diferentes partes (p2, frg11, p4) de la región 56-144 de la pG del VHSV (Estepa, 2001), están conformes con la participación de ambos péptidos (p2 y péptido de unión a la región de fusión) en alguno de los pasos de la fusión del VHSV. Sin embargo, puesto que en todos los mutantes de VSVH estudiados se han encontrado alteraciones en la reactividad de pG con anticuerpos monoclonales dependientes de conformación, también es posible que las mutaciones estén afectando a la conformación de pG y esa diferencia conformacional sea la responsable de las alteraciones observadas en la fusión.

A pesar de su alteración en la unión al anticuerpo monoclonal C10, los mutantes P79A, L85S, R103A y T135E eran capaces de sufrir los cambios conformacionales a bajo pH que deben preceder a la fusión, aunque P79A se fusionó solamente un 50% a un pH 0,3 unidades más bajas que la pG nativa, mientras que los otros mutantes necesitaron un pH de 5,0 (o más bajo) para alcanzar el 25-50% de fusión. De modo similar, los mutantes VHSV resistentes a la neutralización por el AcM C10 que han perdido su capacidad de unión a los AcMs C10, eran todavía capaces de llevar a cabo la fusión y sus epítopos mapeados estaban relacionados con la fusión de VHSV. Los mutantes de VHSV en los que se mantenía alguna actividad de fusión, tenían mutaciones bien flanqueando el núcleo más interior de p2 (P79A, L85S y R103A) o bien en el lazo hidrófilo (p4) entre los péptidos p2 y el de fusión (T135E). En todos estos casos, el cambio en la conformación a pH fisiológico en las posiciones 140 ó 433 (como se estimó por la unión del AcM C10) y 235 (como se estimó por la unión del AcM 2F1A12) no impidió la fusión. El incremento en la unión de AcMs C10 y 2F1A12 a la pG nativa a pH bajo, podría indicar que la conformación a pH bajo requerida para la fusión, estaría menos afectada por estas mutaciones. La Figura 1 muestra que los mutantes con actividad de fusión en las posiciones P79 o L85 (es decir, alrededor de la posición 80) y T135 (es decir, alrededor de la posición 140) y los mutantes resistentes a la neutralización por el AcM C10, mapeaban en posiciones bien alrededor del aminoácido 80 o bien alrededor del aminoácido 140, las dos localizaciones alrededor de las cuales el número de cambios de aminoácidos en los 22 aislados de VHSV era el más alto. Las localizaciones alrededor de las variaciones de aminoácidos en los aislados naturales de mutantes puntuales y resistentes a anticuerpos monoclonales que retenían actividad de fusión (excepto la posición 103), sugieren que, con el objetivo de preservar la actividad de fusión, la mayoría de los cambios de aminoácidos permitidos en la región 56-159 son aquéllos alrededor de las posiciones 80 y 140.

La reducción de la capacidad de unión de los AcMs dependientes de conformación a la pG mutante del VHSV, debería indicar que esos mutantes están mal plegados. Por tanto, esas mutaciones estarían afectando a la conformación de la pG, que sería la principal razón tras las alteraciones observadas en la actividad de fusión. En este momento no es posible determinar si las mutaciones estudiadas tienen un efecto directo en la fusión debido a cambios en la conformación de pG, un efecto directo en su capacidad de fusión, o a ambos, ya que ninguno de los mutantes VHSV fue

reconocido por los AcMs C10 o 2F1A12, y no hay todavía disponible ningún otro anticuerpo monoclonal neutralizante de VHSV (Fernández-Alonso *et al.*, 1998) o ningún otro ensayo para estudiar la conformación de la pG. Además, no es posible todavía comparar directamente las propiedades de los mutantes defectivos en la fusión de VSV con los mutantes descritos antes para VHSV. Por tanto, las alteraciones en la unión de AcMs o dependientes de conformación por mutantes defectivos en la fusión de VSV, no se han descrito todavía. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre la cepa salvaje de VSV y los mutantes defectivos en la fusión en cuanto al incremento de la resistencia de la pG a la digestión con tripsina a pH bajo (el ensayo bioquímico utilizado para cambios conformacionales). El reconocimiento por AcMs anti-VSV dependientes de conformación podría estar alterado en esos mutantes VSV, ya que es conocido que la conformación esta alterada extensivamente en la pG durante la fusión (Carneiro *et al.*, 2001; Carneiro *et al.*, 2003).

Para estudiar si las mutaciones en p2 podrían afectar la fusión reduciendo sus propiedades de unión a fosfolípido, se llevaron a cabo una serie de experimentos con péptidos sintéticos mutados correspondientes a las secuencias p2 que muestran la actividad de unión más alta de anclaje a PS, tal como se ha descrito previamente (Estepa *et al.*, 1996a; Estepa *et al.*, 1996b). Para disminuir la unión a PS en este modelo, tienen que introducirse simultáneamente más de tres sustituciones de aminoácidos en la secuencia p2 nativa de acuerdo con las indicaciones previas, en las que tanto las interacciones hidrofóbicas como fónicas eran requeridas para la unión máxima a PS (Estepa *et al.*, 1996b). Aunque no todas las posibles mutaciones en p2 han sido estudiadas, estos resultados hicieron improbable que los mutantes con una única mutación o los 2 dobles mutantes estudiados (P86AG98A ó G98AH99S) pudieran causar una reducción en el anclaje a PS.

La pG con mutaciones dentro del péptido de fusión hipotético (F147K, P148K y W154K), fueron completamente defectuosas en fusión para todos los pHs estudiados, a pesar de expresarse en la membrana de las células EPC transfectadas en un nivel similar al de la cepa salvaje o mutantes con alguna actividad en la fusión (Tabla 1). Los mutantes F125Y y P126L de VSV mostraron respectivamente una reducción de la fusión del 34% y del 48% respecto a la obtenida con la pG nativa (Shokralla *et al.*, 1999), mientras que en los mutantes equivalentes F147K y P148K de VHSV, la reducción de la fusión fue de un 100%. La actividad de fusión más baja observada en VHSV pudo deberse a los cambios de aminoácidos más drásticos introducidos en los mutantes de VHSV. Alternativamente, podría deberse a diferencias en las condiciones de los ensayos de fusión célula-célula (exposición a bajo pH durante 2 ó 15 minutos en VSV o VHSV, respectivamente).

Debido a que el suero procedente de las truchas inmunizadas con VHSV (aproximadamente un 40%) reaccionó fuertemente con el frg11 en fase sólida (Estepa *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2002) mediante reconocimiento de sus epítomos lineales (Fernández-Alonso *et al.*, 1998) y los mutantes en frg11 se expresaron en la membrana celular independientemente de su conformación, la mayoría de los mutantes de la pG defectuosos en la fusión aquí descritos, son viables y capaces de inducir respuestas inmunes en truchas. Algunas de las mutaciones descritas en la presente invención podrían utilizarse para diseñar vacunas atenuadas frente al VHSV, incluyendo vacunas ADN con el gen G mutante (Anderson, 1996a; Anderson, 1996b; Fernández-Alonso, 2001) o VHSV mutantes obtenidos mediante métodos de genética reversa (Biacchesi *et al.*, 2002; Biacchesi *et al.*, 2000).

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1
Expresión de pG en membrana (FACS) y citoplasma (IF) y núcleos inducidos en sincitios a pH óptimo en células transfectadas con pG mutante

Dominio	Mutante	*IF	FACS** AcP Anti-pG			AcM C10 ⁺			Fusión		
			% células teñidas	Intensidad de fluorescencia (ufr)	n	% células teñidas	n	pH	% núcleos en sincitios ***	n	
	Tipo salvaje	+	53,5 ± 11	18,7 ± 4,1	(6)	21,6 ± 9	(6)	5,6	44,7 ± 8,1	(3)	
Corriente arriba p2	P65A	+	54,1 ± 8	13,3 ± 3,1	(3)	0,9 ± 0,1	(4)	-	1,8 ± 0,6	(3)	
	P79A	+	42,5 ± 10	13,1 ± 3,6	(4)	0,3 ± 0,1	(3)	5,3	23,5 ± 2,4	(2)	
Péptido de unión al fosfolípido, p2 (82-110)	I82S	+	1,3 ± 0,3	0	(3)	1,6 ± 0,6	(4)	?	1,6 ± 0,2	(2)	
	L85S	+	51,6 ± 29	13,6 ± 1,1	(2)	0,5 ± 0,1	(3)	5,0	9,2 ± 3,5	(2)	
	P86A	+	56,8 ± 15	13,7 ± 5,8	(4)	1,1 ± 0,6	(3)	-	2,1 ± 0,5	(3)	
	P86AG98A	+	50,6 ± 13	12,2 ± 3,5	(4)	1,4 ± 0,1	(4)	-	1,4 ± 0,3	(3)	
	A96E	+	44,5 ± 19	13,3 ± 3,3	(3)	1,2 ± 0,6	(3)	-	1,6 ± 0,4	(2)	
	G98A	+	77,2 ± 9	13,2 ± 4,7	(2)	0,6 ± 0,2	(3)	-	1,6 ± 0,2	(2)	
	G98AH99S	+	71,5 ± 4	22,5 ± 2,5	(2)	0,5 ± 0,3	(2)	-	1,7 ± 0,3	(2)	
	R103A	+	64,7 ± 14	11,7 ± 3,2	(2)	1,6 ± 0,8	(2)	5,0	27,7 ± 4,1	(2)	
	R107A	+	63,5 ± 23	13,1 ± 2,1	(2)	0,9 ± 0,3	(2)	-	2,1 ± 0,5	(2)	
	F115K	+	52,0 ± 23	10,8 ± 3,4	(3)	0,4 ± 0,2	(2)	-	1,6 ± 0,5	(3)	
Corriente abajo p2	T135E	+	55,6 ± 20	11,6 ± 8,4	(3)	1,3 ± 0,8	(2)	5,0	13,7 ± 4,5	(3)	
	F147K	+	69,0 ± 1	11,5 ± 0,5	(2)	1,3 ± 0,3	(3)	-	1,6 ± 0,2	(2)	
Péptido de fusión (142-159)	P148K	+	50,2 ± 2	22,5 ± 2,5	(2)	1,5 ± 0,3	(2)	-	2,8 ± 1,5	(2)	
	W154K	+	76,3 ± 13	13,1 ± 1,8	(2)	1,0 ± 0,7	(3)	-	1,8 ± 0,2	(2)	

*, La expresión en el citoplasma de las células EPC transfectadas con los plásmidos que contenían pG mutantes se estimó por inmunofluorescencia con el AcP de conejo anti-pG. Los resultados se clasificaron en "+" cuando se detectó fluorescencia mayor que la del fondo; **, Los resultados se dan en medias ± la desviación estándar del porcentaje de células EPC teñidas con los anticuerpos indicados por comparación con el número de células teñidas con los mismos anticuerpos monoclonales en células EPC no transfectadas (Figura 2). La media ± la desviación estándar de la intensidad de fluorescencia del número de experimentos diferentes por mutante están entre paréntesis; ***, Los resultados de fusión al máximo pH (Figura 3) se proporcionan como porcentaje de núcleos en sincitios (sincitios de 3 o más de 3 células por sincitio, n = 1.300 aproximadamente, 4 campos de aumentos (x100)). El porcentaje de núcleos en sincitios en monocapas de células EPC sin transfectar tras pH 5,6 fue 1,3 % (n=1.300), aunque el 95% de ellos sólo tenía 3 núcleos por sincitio.; +, Anticuerpos monoclonales C10 mapean simultáneamente en las posiciones 139 y 140 (Bearzotti, 1995; Gaudin, 1999).

TABLA 2

*Péptidos p2 mutantes de unión a PS en fase sólida marcados
(posiciones de 93 a 107)*

Posición	Secuencia	Unión a PS (pmoles/ μ g péptido)
93	A AVASGHYLHRVTYR	2,17 $\pm$ 0,47
94	SAVASGHYLHRVTYR	2,47 $\pm$ 0,34
95	S A AASGHYLHRVTYR	2,10 $\pm$ 0,46
96	SAVASGHYLHRVTYR	2,47 $\pm$ 0,34
97	SAVA A GHYLHRVTYR	1,82 $\pm$ 0,50
98	SAVAS A HYLHRVTYR	2,66 $\pm$ 0,16
99	SAVASG A YLHRVTYR	2,41 $\pm$ 0,15
100	SAVASGH A LHRVTYR	2,99 $\pm$ 0,23
101	SAVASGHY A HRVTYR	3,24 $\pm$ 0,31
102	SAVASGHYL A RVTYR	4,10 $\pm$ 0,53
103	SAVASGHYLH A VTYR	2,72 $\pm$ 0,23
104	SAVASGHYLHR A TYR	2,80 $\pm$ 0,37
105	SAVASGHYLHRV A YR	2,64 $\pm$ 0,31
106	SAVASGHYLHRVT A R	2,84 $\pm$ 0,33
107	SAVASGHYLHRVTY A	2,40 $\pm$ 0,28
107	SAVASGHYLHRVTY K	2,50 $\pm$ 0,42
103	SAVASGHYLH K VTYR	2,60 $\pm$ 0,33
103, 107	SAVASGHYLH K VTY K	1,30 $\pm$ 0,19
103, 107	SAVASGHYLH E VTY E	0,75 $\pm$ 0,36
104-106	SAVASGHYLHR AAA R	2,10 $\pm$ 0,28
95, 104-106	S A AASGHYLHR AAA R	1,69 $\pm$ 0,29
99-102, 104-106	SAVASG AAAA AAAA R	0,69 $\pm$ 0,21

El PS marcado radiactivamente fue estimado por la unión a fase sólida revestida con péptidos mutantes sintéticos derivados de la secuencia parcial de p2 ($_{93}$ SAVASGYLHRVTYR $_{107}$). Las cuentas por encima del valor de fondo fueron convertidas a pmoles de PS por μ g de péptido y los promedios procedentes de dos experimentos diferentes fueron realizados por triplicado y sus desviaciones estándar, representadas. Las secuencias de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los aminoácidos mutados están en letra negrita.

Bibliografía

Anderson, E.D., Mourich, D.V., Fahrenkrug, S.C., LaPatra, S.C., Shepherd, J. y Leong, J.C. (1996a) Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 5: 114-122.

Anderson, E.D., Mourich, D.V., y Leong, J.C. (1996b). Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 5: 105-113.

Bearzotti, M., Monnier, A.F., Vende, P., Grosclaude, J., DeKinkelin, P. and Benmansour, A. (1995). The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Vet.Res.* 26:413-422.

Biacchesi, S., Bearzotti, M., Bouguyon, E. and Bremont, M. (2002). Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a Novirhabdovirus. *J.Virol.* 76:2881-2889.

Biacchesi, S., Thoulouze, M.I., Bearzotti, M., Yu, Y.X. and Bremont, M. (2000). Recovery of NV Knockout Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Expressing Foreign Genes. *J.Virol.* 74:11247-11253.

Carneiro, F.A., Ferradosa, A.S., y DaPoian, A.T. (2001) Low pH-induced conformational changes in vesicular stomatitis virus glycoprotein involve dramatic structure reorganization. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 62-67.

Carneiro, F.A., Stauffer, F., Lima, C.S., Juliano, M.A., Juliano, L. y DaPoian, A.T. (2003). Membrana fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidina protonation. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 13789-13794.

Coll, J.M. (1995). Heptad-repeat sequences in the glycoprotein of rhabdoviruses. *Virus Genes* 10:107-114.

Einer-Jensen, K., Krogh, T.N., Roepstorff, P. and Lorenzen, N. (1998). Characterization of intramolecular disulphide bonds and secondary modifications of the glycoprotein from viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *J.Virol.* 72:10189-10196.

Estepa, A. and Coll, J.M. (1996a). Pepsan mapping and fusion related properties of the major phosphatidylserine-binding domain of the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus, a salmonid rhabdovirus. *Virology* 216:60-70.

Estepa, A. and Coll, J.M. (1996b). Phosphatidylserine binding to solid-phase peptides: a new method to study phospholipid/viral protein interactions. *J.Virol.Methods* 61:37-45.

Estepa, A., Rocha, A., Pérez, L., Encinar, J.A., Núñez, E., Fernández, A., Gonzalez Ros, J.M., Gavilanes, F. and Coll, J.M. 2001. A protein fragment from the salmonid VHS rhabdovirus induces cell-to-cell fusion and membrana phosphatidylserine translocation at low pH. *Journal Biological Chemistry*, 276: 46268-46275.

Fernández-Alonso, M., Alvarez, F., Estepa, A., Blasco, R. and Coll, J.M. (1999). A model to study fish DNA immersion-vaccination by using the green fluorescent protein. *J.Fish Dis.* 22:237-241.

Fernández-Alonso, M., Lorenzo, G., Pérez, L., Bullido, R., Estepa, A., Lorenzen, N. y Coll, J.M. (1998). Mapping of the linear antibody epitopes of the glycoprotein of VHSV, a salmonid rhabdovirus. *Diseases Aquatic Organisms*, 34: 167-176.

Fernández-Alonso, M., Rocha, A. and Coll, J.M. (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine*, 19: 3067-3075.

Fijan, N.; Sulimanovic, D.; Bearzotti, M.; Muzinic, D.; Zwillenberg, L.O.Z.; Chilmonczyk, S; Vautherot, J.F. y Kinkelin, P. (1983). Some properties of the epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cell line from carp cyprinus carpio. *Annals Virology (Institute Pasteur)*, 134: 207-220.

Fredericksen, B.L., and Whitt, M.A. (1996). Mutations at two conserved acidic amino acids in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect pH-dependent conformational changes and reduce the pH threshold for membrane fusion. *Virology*, 217: 49-57.

Gaudin, Y., DeKinkelin, P. and Benmansour, A. (1999). Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *J.Gen.Virol.* 80:1221-1229.

Gaudin, Y., Ruigrok, R.W.H., Knowsow, M. y Flamand, A. (1993) Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *Journal Virology*, 67: 1365-1372.

Heike, S., Egbert, M. and Mettenleiter, T.C. (1999). Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* 19:59-65.

López, A., Fernández-Alonso, M., Rocha, A., Estepa, A. and Coll, J.M. (2001). Transfection of epithelioma cyprini (EPC) carp cells. *Biotechnology Letters* 23:481-487.

Lorenzen, N. y LaPatra, S.E. (1999) Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunology*, 9: 345-360.

Rocha, A., Fernández-Alonso, M., Mas, V., Pérez, L., Estepa, A. and Coll, J.M. (2002). Antibody response to a linear epitope of the protein G of a rhabdovirus in immunized trout. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 86:89-99.

Rocha, A., Ruiz, S., y Coll, J.M. (2004a). Improvement of transfection efficiency of epithelioma papulosum cyprini carp cells by modification of their cell cycle and using an optimal promoter. *Marine Biotechnology*, in press.

Rocha, A., Ruiz, S., Tafalla, C. y Coll, J.M. (2004b). Characterisation of the syncytia formed by VHS salmonid rhabdovirus G-gene transfected cells. *Veterinary Immunology Immunopathology*, in press.

ES 2 255 411 B1

Shokralla, S., Chernish, R. and Ghosh, H.P. (1999). Effects of double-site mutations of vesicular stomatitis virus glycoprotein G on membrane fusion activity. *Virology* 256:119-129.

5 **Thiry, M.; Lecoq-Xhonneux, F.; Dheur, I.; Renard, A. and Kinkelin, D. (1991).** Molecular cloning of the m_RNA coding for the G protein of the viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of salmonids. *Journal Veterinary Microbiology*, 23: 221-226.

10 **Walker, P.J. and Kongsuwan, K. (1999).** Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins. *J.Gen. Virol.* 80:1211-1220.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un gen G mutante del virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) que codifica una proteína G (pG) mutante de VHSV, en donde dicha pG mutante de VHSV comprende al menos una mutación P65A, P69A, I82S, L85S, P86A, P86AG98A, A96E, G98A, G98AH99S, R103A, R107A, F115K, T135E, F147K, P148K y W154K y tiene una capacidad de fusionarse a células susceptibles de ser infectadas por VHSV defectiva o nula.
2. Gen G mutante según la reivindicación 1, que codifica una pG mutante de VHSV con P65A y/o P79A cuya mutación se localiza en el dominio upstream p2 de la pG de VHSV.
3. Gen G mutante según la reivindicación 2, en el que dicha mutación en la pG de VHSV se selecciona entre las mutaciones P65A y P79A.
4. Gen G mutante según la reivindicación 1, que codifica una pG mutante de VHSV con al menos I82S, L85S, P86A, P86AG98A, A96E, G98A, G98AH99S, R103 o R107A cuya mutación se localiza en el dominio de unión a fosfolípido (p2) de la pG de VHSV.
5. Gen G mutante según la reivindicación 4, en el que dicha mutación en la pG de VHSV se selecciona entre las mutaciones I82S, L85S, P86A, P86AG98A, A96E, G98A, G98AH99S, R103A y R107A.
6. Gen G mutante según la reivindicación 1, que codifica una pG mutante de VHSV con al menos F115K, T135E, F147K, P148K o W154K cuya mutación se localiza en el dominio corriente abajo (downstream) de la región p2 de la pG de VHSV.
7. Gen G mutante según la reivindicación 6, en el que dicha mutación en la pG de VHSV se selecciona entre las mutaciones F115K y T135E.
8. Gen G mutante según la reivindicación 1, que codifica una pG mutante de VHSV con al menos F147K, P148K o W154K cuya mutación se localiza en el dominio del péptido de fusión de la pG de VHSV.
9. Gen G mutante según la reivindicación 8, en el que dicha mutación en la pG de VHSV se selecciona entre las mutaciones F147K, P148K y W154K.
10. Un vector que comprende un gen G mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Vector según la reivindicación 10, seleccionado entre un plásmido de ADN y un vector de expresión capaz de ser expresado en células eucariotas.
12. Vector según la reivindicación 10 u 11, que comprende, además, los elementos necesarios para la expresión y traducción de dicho gen G mutante y/o elementos reguladores para su transcripción y/o traducción.
13. Empleo de un vector según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales susceptibles de ser infectados por VHSV.
14. Un virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) mutante cuyo genoma comprende un gen G mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con el resto de genes de VHSV.
15. Empleo de un virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) mutante según la reivindicación 14 en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales susceptibles de ser infectados por VHSV.
16. Una vacuna que comprende un gen G mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
17. Vacuna según la reivindicación 16, en la que dicho gen G mutante está incorporado en un vector según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
18. Vacuna según la reivindicación 16, en la que dicho gen G mutante está incorporado en un VHSV mutante según la reivindicación 14.
19. Vacuna según la reivindicación 16, seleccionada entre una vacuna ADN y una vacuna viva atenuada.
20. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para proteger animales susceptibles de ser infectados por VHSV.
21. Vacuna según la reivindicación 20, en el que dichos animales susceptibles de ser infectados por VHSV son animales acuáticos.

22. Vacuna según la reivindicación 21, en el que dichos animales acuáticos son truchas.

23. Una proteína G mutante del virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) codificada por un gen G mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

24. Proteína G mutante según la reivindicación 23, seleccionada entre una pG mutante que tiene la mutación P65A; una pG mutante que tiene la mutación P79A; una pG mutante que tiene la mutación I82S; una pG mutante que tiene la mutación L85S; una pG mutante que tiene la mutación P86A; una pG mutante que tiene la mutación P86AG98A; una pG mutante que tiene la mutación A96E; una pG mutante que tiene la mutación G98A; una pG mutante que tiene la mutación G98AH99S; una pG mutante que tiene la mutación R103A; una pG mutante que tiene la mutación R107A; una pG mutante que tiene la mutación F115K; una pG mutante que tiene la mutación T135E; una pG mutante que tiene la mutación F147K; una pG mutante que tiene la mutación P148K; y una pG mutante que tiene la mutación W154K.

25. Una célula huésped que comprende un gen G mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

26. Célula huésped según la reivindicación 25, **caracterizada** porque es una célula eucariota.

27. Célula huésped según la reivindicación 26, **caracterizada** porque es una célula perteneciente a la línea celular EPC (*Epithelioma Papullosum cyprisi*).

28. Un método para producir una proteína G mutante del virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) que comprende cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26, que comprende un gen G mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, bajo condiciones que permiten la expresión de dicho gen.

29. Método según la reivindicación 28, que comprende, además, retirar la proteína G mutante producida del medio de cultivo.

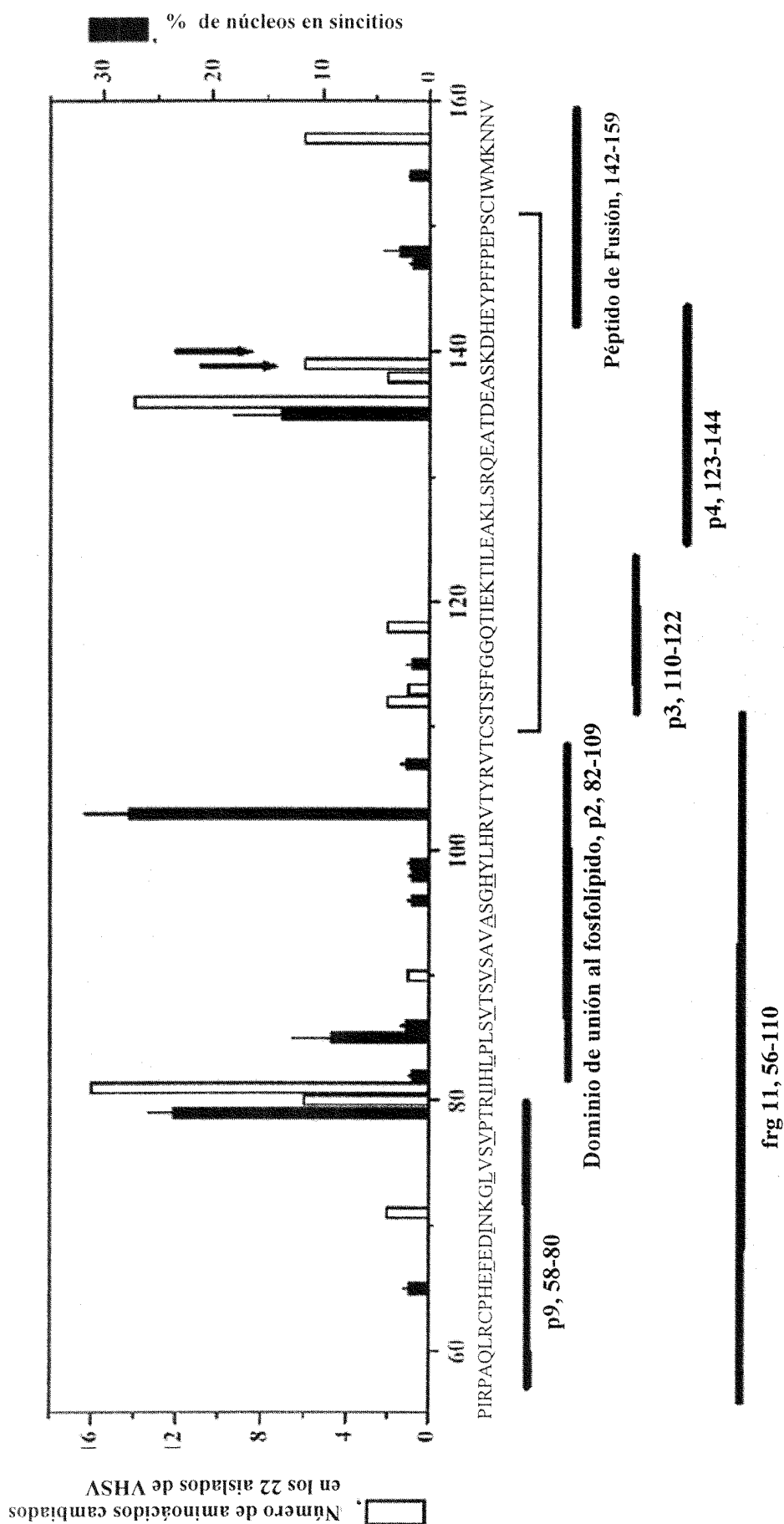


Fig 1

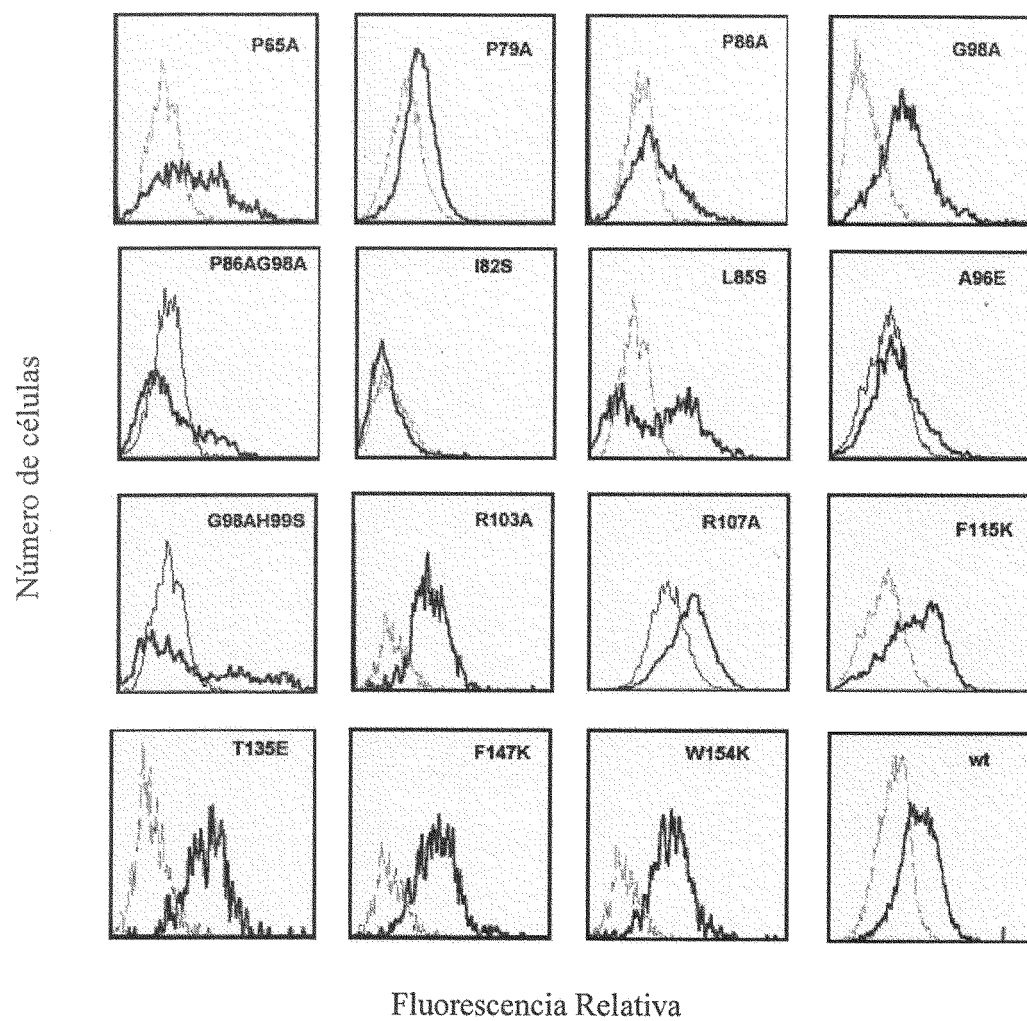


Fig 2

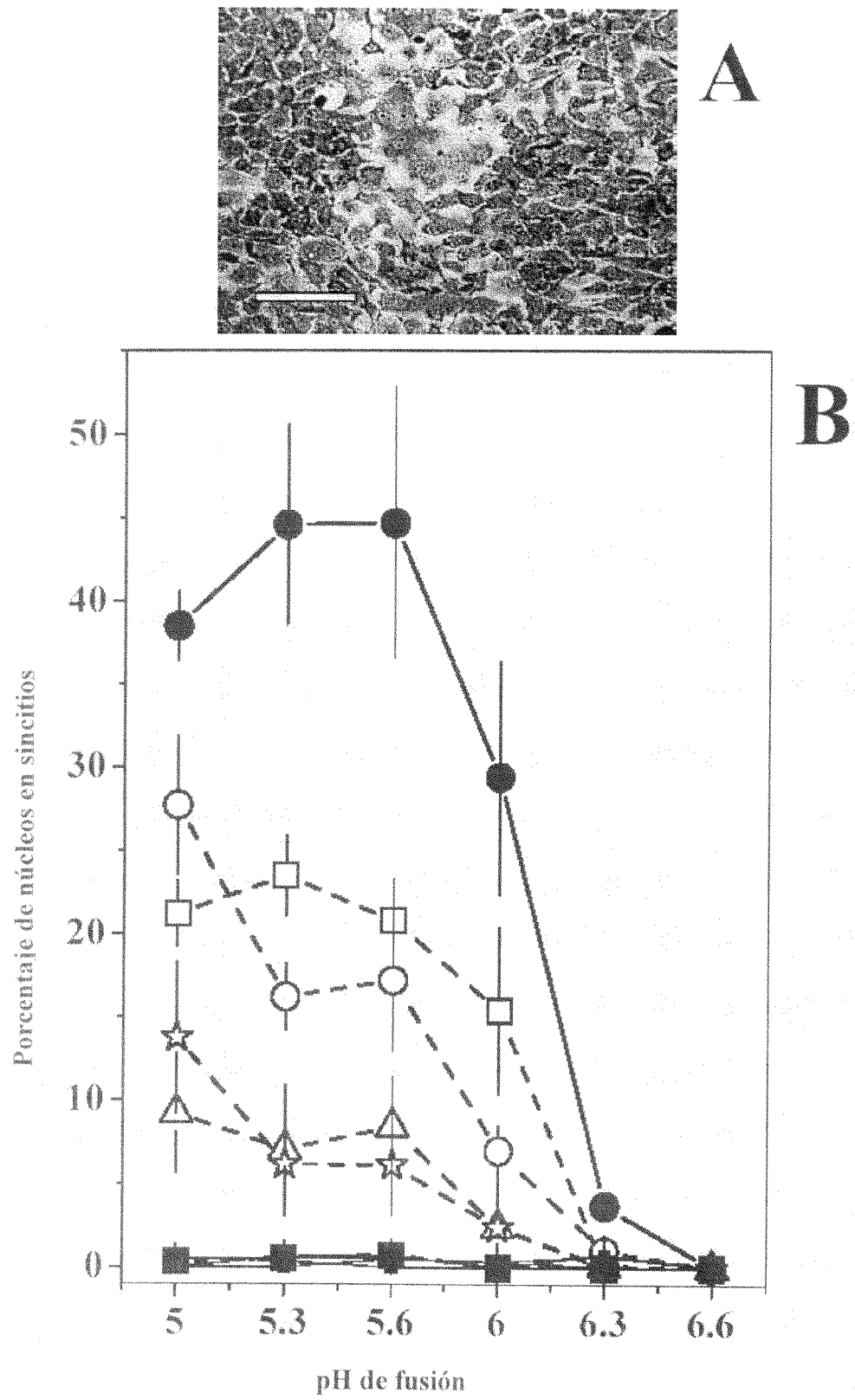


Fig 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 255 411

⑫ Nº de solicitud: 200402092

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 27.08.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GAUDIN, Y.; KINKELIN, P.; BENMANSOUR, A. Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. Journal of General Virology. Mayo 1999, Vol. 80, Nº5, páginas 1221-1229. ISSN 0001-6109.	1-29
A	ESTEPA, A. M.; ROCHA, A. I.; MAS, V. et al. A protein G fragment from the salmonid viral hemorrhagic septicemia rhabdovirus induces cell-to-cell fusion and membrane phosphatidylserine translocation at low pH. The Journal of Biological Chemistry. Diciembre 2001, Vol. 276, Nº49, páginas 46268-46275. ISSN 0021-9258.	1-29
A	BENMANSOUR, A.; KINKELIN, P. Live fish vaccines: history and perspectives. Developments in Biological Standardization. 1997, Vol. 90, páginas 279-289. ISSN 0301-5149.	1-29
A	ENZMANN, P. J.; FICHTNER, D.; SCHÜTZE, H.; WALLISER, G. Development of vaccines against VHS and IHN: oral application, molecular marker and discrimination of vaccinated fish from infected populations. Journal of Applied Ichthyology. Diciembre 1998, Vol. 14, Nº 3-4, páginas 179-183. ISSN 0175-8659.	1-29
A	BÉARZOTTI, M.; MONNIER, A. F.; VENDE, P. et al. The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. Veterinary Research. 1995, Vol. 26, Nº 5-6, páginas 413-422. ISSN 0928-4249.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

23.05.2006

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/47 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)