

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 228**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61P 31/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2006 E 06793347 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1926496**

54 Título: **Vacuna contra el PCV-2**

30 Prioridad:

**09.09.2005 EP 05108299**

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

**14.10.2013**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)  
P.O. BOX 31 WIM DE KÖRVERSTRAAT 35  
5830 AA BOXMEER, NL**

72 Inventor/es:

**ROERINK, FRANK y  
VAN WOENSEL, PETER**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 425 228 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Vacuna contra el PCV-2

5 La presente invención se refiere al uso de la proteína ORF-2 del circovirus porcino tipo (PCV-2) para la fabricación de una vacuna contra el circovirus porcino y a un método para la fabricación de dicha vacuna, para proteger cochinitos contra la infección por PCV.

10 Se cree que el PCV-2 está relacionado con el síndrome de pérdida de peso posterior al destete (PMWS, por sus siglas en inglés) observado en cerdos jóvenes.

Esta enfermedad se descubrió por primera vez en Canadá en 1991.E

15 Los signos clínicos y la patología se publicaron en 1997 (Clarl y col., Proc. Am. Assoc. Swine. Pract, 1997: 499-501, Harding y col., Proc. Am. Assoc. Swine. Pract, 1997:503), e incluyen la pérdida progresiva de peso, disnea, taquipnea y ocasionalmente ictericia y amarilleamiento.

20 Nayar y col, Can. Vet. J. Volumen 38, junio de 1997 detectaron el circovirus porcino en cerdos con síntomas clínicos de PMWS y concluyeron que el PCV, diferente del PCV reconocido como habitante natural de las células PK-15, podía estar relacionado con el PMWS. Publicaciones posteriores (Hamel y col., J. Virol., 72(6), 5262-5267, 1998; Meehan y col., J. gen. Virol., 79, 2171-2179, 1998) confirmaron estos hallazgos, y propusieron (Meehan y col, citado más arriba) denominar al nuevo PCV patógeno como PCV-2, mientras que el aislado original de procedente del cultivo de células PK-15 (Tischer y col., Nature 295, 64-66, 1982) debería denominarse PCV-1.

25 PCV1 y PCV-2 son virus pequeños (17 nm) icosaédricos no encapsulados que contienen un genoma de ADN monocatenario circular. La longitud del genoma del PCV-2 es de aproximadamente 1768 pb. Los aislados de PCV-2 procedentes de diferentes regiones del mundo parecen estar estrechamente relacionados entre sí, y muestran identidades en la secuencia de nucleótidos del 95 al 99 % (Fenaux y col., J. Clin. Microbiol., 38(7), 2494-2503, 2000). ORF-2 de PCV codifica la posible proteína de la cápsida del virus. El ORF 2 de PCV 2 codifica una proteína de 233 aminoácidos. El ORF 2 de todos los aislados de PCV-2 comparte una identidad en la secuencia de nucleótidos de 91-100% y una identidad en la secuencia de aminoácidos deducida de 90-100%. Entre los genes del ORF 2 de PCV 1 y PCV-2 solamente existe una identidad de 65 a 67% de los nucleótidos, y de 63 a 68% de identidad en la secuencia de aminoácidos (Fenaux y col., citado más arriba).

35 El PDNS (síndrome de dermatitis y nefropatía porcina, por sus siglas en inglés) es otro problema importante para los criadores de cerdos que apareció por la misma época que el PMWS. Las características del PDNS son lesiones cutáneas circulares con hemorragia, habitualmente en las orejas, lados, patas y pernils.

40 Se proporciona una revisión de los síndromes relacionados con el PCV-2 en Chae, C (2005) Vet. J. 169326-336.

Existe necesidad de una vacuna que proteja a los cochinitos de enfermedades relacionadas con el PCV-2 tales como el PMWS y el PDNS. Sin embargo, en la actualidad no existe una vacuna comercialmente disponible contra las enfermedades relacionadas con el PCV-2.

45 Tradicionalmente, se pensaría en una vacuna convencional para cerdos basada en el virus PCV-2 completo inactivado. Sin embargo, en el caso del PCV-2, las cosas se complican por el hecho de que el PCV-2 no se replica con títulos elevados en células.

50 Como alternativa, la vacuna podría basarse en antígenos recombinantes derivados del PCV-2. Las proteínas del PCV-2 ya se han expresado en diferentes sistemas de expresión. Por ejemplo, Liu y col. (Protein Expression and Purification, 21, 115-120 (2001) expresaron una proteína de fusión de la proteína completa codificada por ORF-2 de PCV-2 vinculada a la etiqueta MBP His, en E. Coli. Kim y col. (J. Vet. Sci, 3(1), 19-23, 2002) expresaron ORF 1 y 2 de PCV-2 en un sistema de expresión de baculovirus. Blanchard y col. (Vaccine, 21,4565-4575, 2003) expresaron también ORF 1 y ORF 2 por un sistema basado en baculovirus en células de insecto. Las células de insecto que produjeron las proteínas del PCV-2 se lisaron y formularon en una vacuna que se utilizó para vacunar cochinitos exentos de patógenos (SPF, por sus siglas en inglés) vacunados de forma expresa. Los cochinitos recibieron bien una de las proteínas en una pauta de estimulación/refuerzo donde la subunidad de la vacuna se administró tras una vacunación de ADN, o bien en otro grupo de cochinitos, los cochinitos recibieron la proteína ORF 1 y ORF 2 en dos inyecciones. Sin embargo, todos los experimentos se llevaron a cabo en cerdos SFP que estaban exentos de patógenos, y por lo tanto no tenían ningún anticuerpo procedente de la madre contra el PCV-2.

65 PMWS y PDNS producidos por PCV-2 se pueden observar desde la 4 semanas de edad hasta aproximadamente las 15 semanas de edad. Parece que hasta el momento del destete los cochinitos están bastante protegidos de las enfermedades relacionadas con el PCV-2, solo después del destete los cochinitos tienen posibilidad de desarrollar síntomas clínicos.

En consecuencia, para proteger los cochinitos mediante vacunación, de manera ideal los cochinitos estarían protegidos desde el destete en adelante, ya que no se puede predecir cuándo se manifestarán las enfermedades relacionadas con el PCV-2.

- 5 Para conseguir esto mediante una pauta de vacunación con dos pinchazos, los cochinitos deben recibir su vacunación de estímulo ya en su primera(s) semana(s) de edad para que puedan recibir la vacunación de refuerzo aproximadamente en el momento del destete y haber obtenido la protección completa contra la infección por PCV-2 justo después del destete. Es probable que los cochinitos tengan anticuerpos procedentes de la madre (MDA, por sus siglas en inglés) contra el PCV-2. (En los Ejemplos se proporciona una distribución de títulos de MDA usados en los experimentos con una vacuna de acuerdo con la invención). Sin embargo, es bien sabido que la presencia de anticuerpos procedentes de la madre interferirá con la vacunación.

15 Kamstrum y col., (Vaccine 22: 1358-1361 (2004)) **resuelven el problema de la existencia de MDA en cochinitos jóvenes y su efecto perjudicial sobre las vacunas. Sugieren el uso de vacunas basadas en ADN como la única forma de superar el problema de los MDA.**

20 Los cochinitos pueden tener diferentes títulos de MDA. Títulos de MDA pasivos muy elevados pueden proteger a los cochinitos de la infección por PCV-2 (Meril: "PCV-2 Diseases: From research back to the field strain", 18° IPVS, Hamburgo (Alemania), junio de 2004, página 99-101).

25 Sin embargo, los cochinitos con títulos de MDA inferiores no estarán protegidos contra el PCV-2 cuando alcancen la edad relevante (es decir, posterior al destete).

30 Para dichos cochinitos, que parecen ser la mayoría de los que se encuentran en el campo, el título de anticuerpos MDA parece ser demasiado bajo para proporcionar protección contra la infección por PCV-2, pero siguen siendo lo suficientemente altos como para interferir con la vacunación con, por ejemplo, una vacuna convencional con PCV-2 inactivado. Especialmente si una vacuna inactivada puede contener menos antígeno por el hecho que el virus no se puede propagar hasta títulos elevados en un cultivo celular (o deben introducirse en la fabricación de vacunas procedimientos complicados y que requieren tiempo). Especialmente para este grupo de cochinitos, se ha descubierto que una vacuna de acuerdo con la invención proporciona una protección adecuada contra la infección por PCV-2.

35 Con la presente invención, se ha proporcionado **el uso de una proteína de ORF-2 del circovirus porcino de tipo (PCV-2) para la fabricación de** una vacuna que se puede utilizar en un método para proteger cochinitos, incluso cochinitos que sean positivos para MDA contra el PCV-2, contra una infección por PCV-2, y por tanto contra enfermedades relacionadas con el PCV-2, principalmente PMWS y PDNS.

40 La presente invención proporciona **el uso de una proteína del ORF-2 del circovirus porcino de tipo (PCV-2) para la fabricación de** una vacuna contra el PCV-2 que comprende al menos 20 microgramos/dosis de proteína del ORF-2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2).

45 Se ha descubierto que una vacuna que contiene al menos 20 microgramos (ug) de proteína del ORF-2 de PCV-2 por dosis puede suscitar una respuesta protectora inmune contra la infección por PCV-2 (y por tanto contra enfermedades relacionadas con el PCV-2, principalmente PMWS y PDNS) incluso en presencia de MDA. Preferentemente, la vacuna contiene al menos 50 ug por dosis, y lo más preferible 80 ug por dosis.

50 Incluso se podrían **fabricar** vacunas de acuerdo con la presente invención con una masa antigénica de hasta 275 ug por dosis, y dichas vacunas seguirían sin suscitar reacciones locales en el punto de inyección. Por supuesto, se podrían incluir en la vacuna incluso más microgramos del antígeno en una dosis de vacuna de acuerdo con la invención, pero la protección obtenida con la vacuna no mejora con una dosis superior; el aumento de la carga antigénica solamente da como resultado que la vacuna sea más cara de lo necesario. Además, una dosis mayor del antígeno eventualmente ocasionaría reacciones locales inaceptables en el punto de inyección, lo que debería evitarse. Un método para medir la masa antigénica se proporciona en la parte experimental de esta solicitud.

55 Una vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención puede contener una proteína ORF-2 recombinante, donde dicha proteína recombinante se produce preferentemente mediante la expresión a partir de un vector de baculovirus en células de insecto, conteniendo dicho vector de expresión de baculovirus la secuencia del gen ORF-2 de PCV-2 bajo el control de un promotor adecuado.

60 Aunque también se pueden utilizar otros sistemas de expresión adecuados conocidos en la técnica en un método para preparar una vacuna de acuerdo con la invención, se ha descubierto que el uso del sistema de expresión en baculovirus da como resultado la producción de altos rendimientos de antígeno vírico, que muestran además una buena antigenia. El uso del sistema de expresión en baculovirus elimina de esta forma la necesidad de procedimientos complicados y que requieren tiempo para concentrar el antígeno hasta un nivel adecuado cuando no se pueden producir en concentración elevada en, por ejemplo, un cultivo celular infectado con virus.

65

El vector de expresión en baculovirus más utilizado es *Autographa californica* frecuentemente utilizada con un cultivo de células de insecto de SF-9, SF-21 o células de insecto High five. SF-9 y SF-21 son líneas de ovario procedentes de *Spodoptera frugiperda*, las células High five se han derivado de células de huevo de *Trichoplusia ni*. El gen PCV-ORF-2 se debe colocar bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores más frecuentemente usados en el sistema de expresión en baculovirus son los promotores del gen de la polihedrina y el promotor del gen p10, lo que significa que la secuencia del gen ORF-2 de PCV-2 se inserta en un sitio de inserción bien en el locus polihedrinico o bien en el locus p10 del genoma del baculovirus. También se pueden utilizar otros promotores adecuados conocidos en la técnica, tanto homólogos como heterólogos. Se proporciona una descripción de todos los aspectos del sistema de expresión en baculovirus en "Baculovirus Expression vectors" de O.R. O'Reilly, L.K. Miller, y VA Luckow (1992, W.H. Freeman & Co, Nueva York). Además, vectores de expresión derivados de baculovirus y sistemas completos de expresión están comercialmente disponibles de muchas empresas diferentes.

Una vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención puede comprender además un adyuvante adecuado. Se conocen en la técnica muchos sistemas adyuvantes, por ejemplo el aceite habitualmente utilizado en sistemas adyuvantes de agua. Se puede utilizar cualquier aceite adecuado, por ejemplo un aceite mineral conocido en la técnica para usar como adyuvante. La fase oleosa puede también contener una mezcla de diferentes aceites, tanto minerales como no minerales. El adyuvante adecuado puede comprender también vitamina E, opcionalmente mezclada con uno o más aceites. La fase acuosa de una vacuna con un adyuvante de aceite en agua contendrá el material antigénico. Las formulaciones adecuadas contendrán habitualmente de aproximadamente 25-60 % de fase oleosa (40-75 % de fase acuosa). Los ejemplos de formulaciones adecuadas pueden contener un 30 % de fase acuosa y un 70 % de fase oleosa o un 50 % de cada una.

Una vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención se puede administrar mediante cualquier vía conocida en la técnica tal como la vía intramuscular, intradérmica o subcutánea, de las que se prefiere la administración intramuscular.

La presente invención proporciona además un método para fabricar una vacuna prevista para la protección de cochinitos jóvenes, que son MDA positivos para PCV-2, contra la infección por PCV-2, donde dicha vacuna se proporciona con al menos 20 ug/dosis de ORF del circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2).

Se puede utilizar una vacuna (preparada por un método) de acuerdo con la invención para proteger a los jóvenes cochinitos contra la infección por PCV-2.

Una vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención se puede incluso utilizar en un método para la protección de cochinitos jóvenes, que son positivos para anticuerpos procedentes de la madre (MDA) contra PCV-2, contra la infección por PCV-2.

Se ha descubierto que una vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención puede proteger a los cochinitos, incluso si tienen un título relativamente elevado de MDA contra PCV-2. Se refleja en la tabla 1 una distribución de los títulos de MDA en cochinitos jóvenes que se encuentran en el campo en varias granjas de toda Europa; la protección proporcionada por una vacuna de acuerdo con la invención se ha reflejado en la tabla 2.

Se ha demostrado que una vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención puede incluso proporcionar una protección adecuada contra la infección por PCV-2 a cochinitos que tengan títulos de MDA comprendidos en la "agrupación 2" según se define en los Ejemplos (Tabla 2). Los cochinitos comprendidos en esta agrupación tienen títulos de MDA entre 8 y 12 log<sub>2</sub> que es un valor elevado para los títulos de MDA.

Una vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención puede por tanto incluso utilizarse en un método para la protección de cochinitos jóvenes, que tienen un título de MDA contra PCV-2 superior a 10 log<sub>2</sub>, o incluso superior a 12 log<sub>2</sub> (medido por un método tal como el indicado en los Ejemplos).

De la Tabla 1, puede observarse que aproximadamente el 55% de los cochinitos recogidos en diferentes granjas de Europa están comprendidos en esta agrupación 2 (aunque por supuesto, los cochinitos comprendidos en la agrupación 1 que tienen un título de MDA inferior y que comprenden el 32 % de la población, también están protegidos por la vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención). De este modo, se puede concluir que una vacuna **fabricada** de acuerdo con la invención proporciona protección a la amplia mayoría de cochinitos que se encuentran en el campo, incluyendo los que tienen títulos elevados de MDA.

Para proporcionar una protección adecuada, la vacuna se administra preferentemente en una pauta de vacunación con dos pinchazos, en donde el primer pinchazo (vacunación de estímulo) se proporciona a los cochinitos entre la primera y la cuarta semana de edad, preferentemente antes del destete, por ejemplo, en la primera semana de edad. El segundo pinchazo (vacunación de refuerzo), se puede proporcionar aproximadamente 3 semanas después. De esta forma, los cochinitos conseguirán una protección completa contra la infección por PCV-2 justo después del destete, que es el momento en que los cochinitos son más susceptibles a la infección por PCV-2 y por tanto se vuelven susceptibles al PMWS y al PDNS.

**Ejemplos:**

Ejemplo 1: Determinación de títulos de anticuerpo específico contra PCV-2 procedentes de la madre.

5 Los títulos de anticuerpo contra PCV-2 se pueden determinar de la siguiente forma:

10 Se formó una monocapa de células PK15 en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Cuando alcanzaron una confluencia del 80%, las células se infectaron con un PCV-2 aislado del campo y se incubaron adicionalmente durante 2 días a 37° C en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Después de este periodo, las células se fijaron en etanol y se almacenaron a 2-8 °C hasta su uso. Se usaron placas para los ensayos cuando aproximadamente el 20 % de las células resultaron infectadas.

15 Para determinar el título de anticuerpo específico contra PCV-2 de un suero dado, se realizaron diluciones en serie y se incubaron sobre las células fijadas con etanol. Después de 1 hora de incubación a 37° C, las placas se lavaron con agua del grifo, y los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con anticuerpo de conejo marcado con FITC dirigido contra IgG de suínido. El título de un suero dado se expresa como la inversa de la dilución más elevada a la que se sigue observando una respuesta del anticuerpo específico contra PCV-2.

20 En la tabla 1 se proporciona una distribución típica de los títulos de anticuerpo contra PCV-2 procedentes de la madre en cochinitos aún no destetados.

Se recogió suero de 232 cochinitos procedentes de varios países de Europa.

25 Tabla 1 Distribución de títulos de anticuerpo procedentes de la madre en un grupo de 232 cochinitos jóvenes

Categorías de cochinitos con títulos de anticuerpo específico contra PCV-2 procedentes de la madre (log 2) en una población	Porcentaje de cochinitos por categoría	Porcentaje de cochinitos por agrupación
≤ 4	1,3	32
5	9,9	
6	9,1	
7	12,1	
8	9,5	55
9	19,4	
10	11,2	
11	9,9	
12	4,7	13
13	5,2	
14	3,0	
15	2,6	
16	1,3	
≥ 17	0,8	

30 En la tabla 1 se pueden distinguir tres agrupaciones: agrupación 1; cochinitos con títulos inferiores a 8, agrupación 2; cochinitos con títulos entre 8 y 12 y agrupación 3; cochinitos con títulos de 13 y mayores. En la agrupación 3, los títulos de anticuerpo procedentes de la madre son tan altos que se espera que los cochinitos estén protegidos durante el período de edad crucial (Merial: "PCV-2 Diseases: From research back to the field strain", 18° IPVS, Hamburgo (Alemania), junio de 2004, página 99-101). Sin embargo, en la agrupación 1, los títulos de anticuerpo procedentes de la madre son tan bajos que la mayoría de estos cochinitos se pueden vacunar con facilidad. Sin embargo, en la agrupación 2, los títulos de anticuerpo son de una magnitud tal que un enfoque de vacunación convencional para inmunizar la mayoría de este grupo probablemente no tendría éxito. Puesto que más de la mitad de estos cochinitos parecen estar incluidos en esta agrupación, si se desea eliminar el PMWS de una granja será de la mayor importancia ser capaces de proteger los cochinitos incluidos en esta agrupación.

40 Es bien sabido en la técnica que la vacunación en presencia de títulos de anticuerpo procedentes de la madre puede auxiliarse mediante el uso de un adyuvante o de un elevado contenido antigénico. No se sabe qué adyuvante o contenido antigénico será capaz de superar los títulos de anticuerpo procedentes de la madre dirigidos contra un patógeno dado. Por tanto, en los experimentos descritos, los autores deseaban definir la cantidad mínima de antígeno que se necesitaría para proteger los cochinitos incluidos en la agrupación 2 contra una infección por PCV-2.

Ejemplo 2. Construcción de un baculovirus recombinante que expresa el ORF-2 de PCV-2.

El virus PCV-2 fue aislado de tejido pulmonar de un cerdo de engorde que mostraba signos clínicos e histopatológicos de PMWS usando células de testículo de suínido (ST) exentas de PCV. El virus se propagó mediante cinco pasos en células PK15 exentas de PCV.

Se aisló el ADN de una preparación de virus PCV-2 purificado a partir del sobrenadante de las células PK15 infectadas. Se llevó a cabo la PCR para amplificar el gen ORF-2 basado en las secuencias publicadas, utilizando cebadores que contenían sitios de restricción *Bam*H1 (cebador directo: CGG GAT CCG TTT TCA GCT ATG ACG TAT, cebador inverso: CGG GAT CCT TTA TCA CTT CGT MT GGT T). El amplicón resultante abarca el gen ORF-2 completo y los sitios de restricción *Bam*H1 flanqueantes.

Tras la electroforesis en gel, el amplicón se extrajo y se purificó. El fragmento del ORF-2 de PCV-2 se digirió a continuación con *Bam*H1 y se ligó en pAcAS3 digerido con *Bam*H1 (Vlak y col. (1990) *Virology* 179 312-320). Este plásmido contiene el promotor p10 en dirección 3' del sitio de inserción, permitiendo la expresión de genes extraños bajo el control del promotor p10.

Bacterias TOP 10F' (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) se transformaron con la mezcla de unión, y los clones que contenían la construcción correcta se seleccionaron en función de su secuencia. Un clon positivo se amplió, y el ADN plásmido de transferencia se volvió a ensayar de nuevo mediante secuenciación.

Antes de la transfección, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV, descrito en Martens y col. (1995) *J. Virol. Methods* 52 15-19) se digirió con *Bsu*361. El sitio *Bsu*361 de este virus es un sitio de restricción único en el locus de p10.

A continuación, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) se transfectaron con el plásmido de transferencia, y el ADN del baculovirus AcNPV se digirió con *Bsu*361 mediante CellFectine (Life Technologies, Gaithersburg, EE.UU.). El sobrenadante de la transfección se recogió 3 días después de la transfección y se realizó la purificación en placas de las células Sf9.

Las placas se ampliaron, y el virus resultante se cribó para determinar la presencia de la inserción del gen ORF-2 de PCV-2 por secuenciación del ADN vírico aislado, e inmunofluorescencia de las células Sf9 usando un suero de conejo y de cerdo dirigido contra PCV-2.

Se preparó una simiente del baculovirus recombinante BacPCV-2-ORF-2 que se denominó "Masterseed". El Masterseed y el 5º paso del Masterseed en células Sf9 se ensayaron para determinar la inserción estable del gen ORF-2 de PCV-2 por secuenciación del ADN aislado e inmunofluorescencia de las células Sf9.

Se realizaron titulaciones para medir la cantidad de virus infeccioso en las preparaciones de virus. Se realizaron titulaciones en las células Sf9, y se leyeron observando el CPE específico de baculovirus y/o la inmunofluorescencia específica de ORF-2 de PCV-2 mediante suero inmune de conejo policlonal dirigido contra PCV-2.

Se demostró que se produjo un Masterseed purificado en placa del baculovirus AcNPV recombinante BacPCV-2-ORF-2. La construcción expresó de forma estable la proteína PCV-ORF-2 bajo el control del promotor p10 en células Sf9, según se desprende de la secuenciación e inmunofluorescencia del Masterseed y el 5º paso del Masterseed en células Sf9.

Ejemplo 3. Producción de un antígeno de PCV-2

Para obtener las máximas cantidades del producto de expresión, se llevaron a cabo experimentos piloto para optimizar las condiciones para obtener la proteína ORF-2 de PCV-2 recombinante. Todos los experimentos se llevaron a cabo en células de *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) en un cultivo en suspensión a 28°C. Se utilizó para la infección el virus BacPCV-2-ORF-2 en su 4º nivel de paso desde el Masterseed. Para una producción optimizada, la densidad celular en el momento de la infección fue de  $1,4 \times 10^6$  células/ml, la multiplicidad de infección (MOI) fue 0,01 y el cultivo se continuó durante 6 días a partir de la infección. La mezcla resultante se denominó producto de expresión recogido. La expresión en condiciones optimizadas se llevó a cabo por 5 veces en experimentos independientes en el transcurso de un año.

Puesto que el antígeno estaba situado en las células, la cosecha completa que contenía tanto las células como el sobrenadante se sometió a sonicación en la medida que al menos el 90 % de las células se rompió. A continuación, el virus recombinante vivo en los lotes de cosecha sonicada se inactivó con etilenimina binaria (BEI) 33 mM a 37°C durante 72 horas con agitación completa a pH 7,5. Tras la inactivación, la BEI se neutralizó por la adición de un exceso molar de 1,6 veces de tiosulfato de sodio.

Tras la neutralización, los residuos celulares y el poliedro se retiraron mediante centrifugación a baja velocidad a 600 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se denominó suspensión de virus inactivado. Se comprobó la esterilidad de las cosechas y la completitud de la inactivación. Se ensayó la completitud de la inactivación mediante

el paso de la suspensión de virus inactivado en células Sf9 durante 2 semanas e inspección visual para determinar la ausencia de CPE específicas de baculovirus.

5 Se demostró que se obtuvieron títulos de baculovirus de 8,5 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub>/ml que resultaron completamente inactivados tras el tratamiento con BEI.

#### Ejemplo 4 Determinación de la cantidad de antígeno de PCV-2

10 Las muestras de suspensión inactivada antes y después de la centrifugación a baja velocidad, y la muestra de sobrenadante del cultivo celular del virus transferido parental se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida SOS desnaturante de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, U. K. (1970). Nature 227, 680-685). Se utilizó un gradiente en gel de 4-12%, teñido con azul brillante de Coomassie.

15 Al realizar la transferencia Western, las proteínas del gel se transfirieron electroforéticamente sobre membranas de nylon, se bloquearon con leche desnatada en PBS, y se hicieron reaccionar con suero policlonal de suínido diluido sensibilizado contra un aislado de campo de PCV-2.

20 Como medida del contenido en antígeno de la suspensión de virus inactivado resultante, 1 microlitro (ul) de esta suspensión se analizó en un gel de forma similar, a la vez que se analizaron en paralelo diluciones en serie de albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, EE.UU., n° de cat. A-2153) en el mismo gel como referencia. La cuantificación del producto del gen ORF-2 en la suspensión de virus inactivado se realizó comparando las densidades de la referencia de BSA con las de la muestra que contenía el PCV-2 mediante captura de la imagen con una cámara y análisis por ordenador mediante GeneTools (SynGene, Cambridge, Reino Unido v. 3.06.02).

25 Cuando se compararon las cosechas inactivadas antes y después de la centrifugación de baja velocidad mediante separación electroforética en geles SDS-PAGE contra marcadores Precision Plus (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.), el material previo a la centrifugación proporcionó 2 bandas principales a aproximadamente igual densidad de los pesos moleculares aparentes (MW) de 30 y 26,8 kDa, mientras que el material después de la centrifugación solamente contenía la banda inferior. Cuando se analizó el virus parental junto con el virus recombinante, el virus parental transferido solamente contenía la más alta de las dos bandas, demostrando que la banda inferior era ORF-2 de PCV y la banda más alta de polihedrina fue retirada tras la centrifugación.

35 La identidad de la banda inferior de 26,8 kDa se confirmó adicionalmente por transferencia Western, mediante la que se demostró que esta banda, pero no la banda de 30 kDa, reaccionó con el suero policlonal de suínido diluido sensibilizado contra un aislado de campo de PCV-2.

40 Los niveles de expresión de ORF-2 de PCV-2 se determinaron en 5 experimentos independientes y, en cada caso, la cantidad fue muy superior al límite de detección del ensayo, estando comprendida específicamente entre 40 y 550 microgramos/mililitro (ug/ml) de suspensión de virus inactivado.

#### Ejemplo 5 Influencia de la cantidad de ORF-2 de PCV-2 en la vacuna captada en cochinillos jóvenes positivos para MDA.

45 Se formularon vacunas con un contenido en ORF-2 de PCV-2 diferente, y se utilizaron para vacunar cochinillos jóvenes con niveles variables de anticuerpos procedentes de la madre (MDA) contra PCV-2. Se administraron dos vacunaciones, separadas entre sí por un plazo de 3 semanas. La serorespuesta contra el antígeno se midió a las 5-6 semanas tras la primera vacunación. A partir de estos datos, se calculó la influencia del contenido de antígeno sobre la captación de la vacuna en presencia de los MDA.

50 Se realizaron varias diluciones de antígeno, y se mezclaron 1:1 (v/v) con un adyuvante de agua-en-aceite, tal como es habitual en la técnica.

55 A continuación, a entre 1 y 4 semanas de edad, la camada se dividió en dos grupos y se trató intramuscularmente con vacunas que contenían cantidades variables de proteína ORF-2 de PCV-2, o bien no fueron vacunados. Las vacunaciones se repitieron al cabo de tres semanas. Se configuraron los siguientes grupos: 114 cochinillos se vacunaron con 1-14 ug de proteína ORF-2 de PCV-2/dosis (grupo 1), 85 cochinillos se vacunaron con 20 y 80 ug/dosis (grupo 2)

60 Se extrajo sangre en el momento de la primera vacunación, y 5-6 semanas después. El suero se preparó y examinó para determinar los anticuerpos contra PCV-2 mediante inmunofluorescencia. Para esto, una monocapa de células PK15 en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos se infectó con un aislado de campo de PCV-2. Tras 2 días de cultivo, cuando aproximadamente el 20-30% de las células resultaron infectadas, las monocapas se fijaron en etanol y se almacenaron a 2-8°C hasta su uso. Para determinar el título, se incubaron diluciones en serie de los sueros de ensayo en las células durante 1 hora a 37°C y, tras el lavado de las placas, los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación durante 1 hora a 37°C con anticuerpo de conejo marcado con FITC dirigido contra IgG de suínido (Nordic, Tilburg, Países Bajos). Los títulos se determinaron como la inversa de la dilución más elevada a la

que se sigue observando una fluorescencia específica de PCV-2.

Para todos los animales, se determinó la disminución en el título de anticuerpos entre la primera y la segunda extracción de sangre. Si durante este período no se observa una disminución en el título de anticuerpos, o se observó un aumento, se consideró que el animal había captado la vacuna. Sin embargo, si el título de anticuerpos específicos contra PCV-2 disminuye, se consideró que la vacunación no había tenido éxito y que la vacuna no se había captado.

Al relacionar las diferentes dosis de vacuna con el título de anticuerpos procedentes de la madre en el momento de la vacunación, se pudo determinar la masa antigénica mínima necesaria para vacunar una cantidad suficiente de cochinitos. Los resultados de este análisis se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de vacuna captada para diferentes títulos de MDA y concentraciones de antígeno.

Categorías de cochinitos con títulos de anticuerpo específico contra PCV-2 procedentes de la madre (log 2) en una población	Grupo 1; 1-14 ug/dosis		Grupo 2; 20-80 ug/dosis	
	Número de cochinitos por categoría/número de cochinitos que captaron la vacuna	Porcentaje de vacuna captada por agrupación	Número de cochinitos por categoría/número de cochinitos que captaron la vacuna	Porcentaje de vacuna captada por agrupación
≤ 4	3/3	90%	1/1	100 %
5	0/0		3/3	
6	15/13		5/5	
7	2/2		3/3	
8	12/8	17 %	4/4	76 %
9	12/5		11/10	
10	6/0		13/10	
11	21/0		15/10	
12	26/0		7/4	
13	15/0	0 %	6/1	4 %
14	2/0		11/0	
15	0/0		4/0	
16	0/0		1/0	
≥ 17	0/0		1/0	
Total	114/31	27 %	85/51	60 %
Protección total	114/48	42 %	85/73	86 %

\*el número total de cochinitos protegidos viene dado por el número de cochinitos con un título inferior a 13 que captaron la vacuna sumado a los cochinitos que ya tenían un título de 13 o superior.

En esta tabla, "Vacuna captada" significa que la vacunación de un cochinito dio como resultado un título de anticuerpo específico contra PCV-2 una semana después de la vacunación de refuerzo que es igual o superior que el título específico contra PCV-2 en la vacunación primaria. En todos los casos, se demostró que la vacuna suscita una respuesta sérica activa contra PCV-2 y dichos cochinitos se pueden considerar como protegidos contra una infección por PCV-2. Sin embargo, en los cochinitos cuyo título una semana después de la vacunación de refuerzo era más pequeño que en el momento de la vacunación primaria, la vacuna no pudo inducir una respuesta inmune, y se observó la disminución natural de los anticuerpos procedentes de la madre, lo que vuelve estos animales susceptibles a una infección por PCV-2.

De la tabla se demuestra que, cuando se utilizan dosis de vacuna iguales o inferiores a 14 microgramos, en la agrupación 1 (títulos de MDA ≤ 7), el 90% de los animales fueron seroconvertidos debido a la vacunación, y por tanto deben considerarse como protegidos. Sin embargo, en la agrupación 2 (títulos de MDA >7 y <13), solamente el 17% de los animales vacunados con una dosis menor o igual a 14 microgramos fueron seroconvertidos y quedaron protegidos. En este grupo, 17 animales tuvieron títulos de 13 o mayores, y por tanto, ya estaban protegidos por sus anticuerpos procedentes de la madre específicos contra PCV-2 adquiridos de forma natural. Por tanto, se puede concluir que en este grupo de 114 cochinitos, solamente 48 (42%) quedaron protegidos; 17 cochinitos ya tenían títulos elevados de anticuerpos procedentes de la madre más 31 cochinitos seroconvertidos en las agrupaciones 1 y 2.



En el grupo vacunado con 20 microgramos por dosis o más, quedaron protegidos significativamente más animales; todos los animales de la agrupación 1 y el 76% de los animales de la agrupación 2 experimentaron seroconversión para PCV-2 y por tanto quedaron protegidos, añadiéndose a los cochinitos con títulos de 13 o más. Se encontró que el 88 % de los cochinitos de este grupo quedaron protegidos.

5 Como se considera que la protección de la pira se alcanza cuando aproximadamente el 80% o más de los animales están protegidos, se puede concluir que la masa antigénica de una vacuna dirigida contra PCV-2 debe contener al menos 20 ug de antígeno o más para poder proteger de forma eficaz la pira contra las consecuencias de una  
10 infección por PCV-2.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una proteína ORF-2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2) en la fabricación de una vacuna que comprende al menos 20 microgramos/dosis de dicha proteína ORF-2, para la protección de cochinitos positivos para anticuerpos procedentes de la madre contra PCV-2 (PCV-2-MDA-positivos) contra la infección por PCV-2.
- 10 2. Uso de una proteína ORF-2 de PCV-2 de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** la vacuna comprende al menos 50 microgramos/dosis de dicha proteína ORF-2.
- 10 3. Composición que comprende al menos 20 microgramos/dosis de la proteína ORF-2 de PCV-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso como una vacuna para proteger cochinitos PCV-2-MDA-positivos contra la infección por PCV-2.
- 15 4. Composición para uso como una vacuna para proteger cochinitos PCV-2-MDA-positivos contra la infección por PCV-2 de acuerdo con la reivindicación 3 **caracterizado por que** dicha composición comprende al menos 50 microgramos/dosis de dicha proteína ORF-2.
- 20 5. Composición para uso como una vacuna para proteger cochinitos PCV-2-MDA-positivos contra la infección por PCV-2 de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 **caracterizada por que** dicha composición comprende un adyuvante adecuado.
- 25 6. Composición para uso como una vacuna para proteger cochinitos PCV-2-MDA-positivos contra la infección por PCV-2 de acuerdo con la reivindicación 5 **caracterizada por que** dicho adyuvante es una emulsión de aceite en agua.
- 30 7. Composición para uso como una vacuna para proteger cochinitos PCV-2-MDA-positivos contra la infección por PCV-2 de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 **caracterizada por que** dicho adyuvante comprende vitamina E.
- 30 8. Uso de una proteína ORF-2 del circovirus porcino de tipo 2 en la fabricación de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde dicha proteína ORF-2 se puede obtener mediante expresión a partir de un vector de expresión de baculovirus en células de insecto, y donde el vector de expresión baculovirus comprende la secuencia del gen ORF-2 de PCV-2 bajo el control de un promotor adecuado.
- 35 9. Uso de una proteína ORF-2 en la fabricación de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 8 donde dicho promotor es el promotor p10.