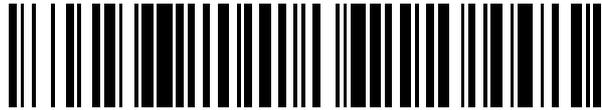


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 726**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/295** (2006.01)  
**C12N 15/34** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**C12N 7/04** (2006.01)  
**C12N 15/64** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**A01N 63/00** (2006.01)  
**C12P 19/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2002 E 10184612 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2263689**

54 Título: **Clones de ADN infeccioso quimérico de circovirus porcino y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**12.12.2001 US 340775 P**  
**08.11.2002 US 424840 P**  
**09.12.2002 US 314512**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.02.2015**

73 Titular/es:

**VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES,  
INC. (50.0%)**  
**2200 Kraft Drive, Suite 1050**  
**Blacksburg, VA 24060, US y**  
**IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MENG, XIANG-JIN;**  
**FENAUX, MARTIJN y**  
**HALBUR, PATRICK G.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 529 726 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

Clones de ADN infeccioso quimérico de circovirus porcino y uso de los mismos

## Antecedentes de la invención

## Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a vacunas virales quiméricas que protegen a un cerdo contra la infección viral o el síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS) causado por PCV2.

## Descripción de la técnica relacionada

Circovirus porcino (PCV) se aisló originalmente como un contaminante de cultivo de células de una línea celular de riñón porcina PK-15 (1. Tischer et al., "A very small porcine virus with circular single-stranded DNA," *Nature* 295: 64 - 66 (1982); 1. Tischer et al., "Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines," *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Otg. A.* 226 (2): 153 - 167 (1974)). PCV es un pequeño virus icosaédrico sin envuelta que contiene un genoma de ADN circular de una sola cadena de aproximadamente 1,76 kb. PCV está clasificado en la familia de *Circoviridae*, que consiste en otros tres circovirus de animales diferentes (virus de anemia de pollo (CAV), virus de enfermedad de pico y pluma de Psittacine (PBFDV) y el circovirus de colúmbidos recientemente descubierto (CoCV) de palomas) y tres circovirus de plantas (virus del cogollo racimoso de banano, virus de podredumbre foliar del cocotero y virus de malformación del trébol subterráneo) (M. R. Bassami et al., "Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anemia virus," *Virology* 249: 453 - 459 (1998); J. Mankertz et al., "Transcription analysis of porcine circovirus (PCV)," *Virus Genes* 16: 267 - 276 (1998); A. Mankertz et al., "Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons," *Arch. Virol.* 145: 2469 - 2479 (2000); B. M. Meehan et al., "Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses," *J. Gen. Virol.* 78: 221 - 227 (1997); B. M. Meehan et al., "Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs," *J. Gen. Virol.* 79: 2171 - 2179 (1998); D. Todd et al., "Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes," *Arch. Virol.* 117: 129 - 135 (1991)). Miembros de los tres circovirus animales reconocidos previamente (PCV, CAV, y PBFDV) no comparten la homología de secuencias de nucleótidos o determinantes antigénicos entre sí (M. R. Bassami *et al.*, 1998, *supra*; D. Todd *et al.*, 1991, *supra*). El genoma del CoCV recientemente identificado compartía aproximadamente el 40% de identidad de secuencia de nucleótidos con la de PCV (A. Mankertz et al., "Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons," *Arch. Virol.* 145: 2469 - 2479 (2000)). Recientemente, un circovirus humano novedoso con un genoma circular, denominado virus transmitido por transfusión o TT virus (TTV), se identificó de individuos asociados a hepatitis después de transfusión (H. Miyata et al., "Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus," *J. Virol.* 73: 3582 - 3586 (1999); T. Nishizawa et al., "A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 92 - 97 (1997)). De manera adicional, un minivirus humano de tipo TTV (TLMV) se identificó a partir de sangre de donantes normales (P. Biagini et al., "Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates," *J. Gen. Virol.* 82: 379 - 383 (2001); K. Takahashi et al., "Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus," *Arch. Virol.* 145: 979 - 993 (2000)) y un tercer circovirus humano novedoso, conocido como virus SEN (SENV), también se descubrió de seres humanos con hepatitis después de transfusión (T. Umemura et al., "SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis," *Hepatology* 33: 1303 - 1311 (2001)). La organización genómica de tanto TTV como TLMV humanos es similar al de CAV (P. Biagini *et al.*, 2001, *supra*; H. Miyata *et al.*, 1999, *supra*; K. Takahashi *et al.*, 2000, *supra*). Aunque se encontraron anticuerpos para PCV en diversas especies animales incluyendo seres humanos, ratones, ganado y cerdos (G. M. Allan et al., "production preliminary characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus," *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43:357-371 (1994); G. C. Dulac and A. Afshar, "Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs," *Can. J. Vet. Res.* 53: 431 - 433 (1989); S. Edwards and J. J. Sands, "Evidence of circovirus infection in British pigs," *Vet. Rec.* 134: 680 - 1 (1994); J. C. Harding and E.G. Clark, "Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)," *Swine Health and Production* 5: 201 - 203 (1997); R. K. Hines and P. D. Lukert, "Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States," *Swine Health and Production* 3: 71 - 73 (1995); G. P. Nayar et al., "Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses," *Can. Vet. J.* 40: 277 - 278 (1999); I. Tischer et al., "Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms," *Arch. Virol.* 140: 737 - 743 (1995); I. Tischer et al., "Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle," *Arch. Virol.* 140: 1427 - 1439 (1995)), se conoce poco con relación a la patogénesis de PCV en estas especies animales. La infección experimental de cerdos con PCV derivado de células PK-15 no produjo enfermedad clínica y de este modo, este virus no se considera que sea patógeno para los cerdos (G. M. Allan et al., "Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material," *Vet. Microbiol.* 44: 49 - 64 (1995); I. Tischer et al., "Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus," *Arch. Virol.* 91: 271 - 276 (1986)). El PCV no patógeno derivado de la línea celular PK-15 contaminada se denominó circovirus porcino tipo 1 o PCV1.

El síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS), descrito primero en 1991 (J. C. Harding and E.G. Clark, 1997, *supra*), es una enfermedad compleja de lechones de destete que está cada vez más extendida. Con la amenaza de un impacto económico serio potencial para la industria del cerdo, se hace urgente desarrollar una vacuna contra PCV2, el agente causante principal de PMWS. PMWS afecta directamente a cerdos entre 5 - 18 semanas de edad. Los signos clínicos de PMWS incluyen pérdida de peso progresiva, disnea, taquipnea, anemia, diarrea, e ictericia. La tasa de mortalidad puede variar entre 1% y 2%, y hasta 40% en algunos casos complicados en el Reino Unido. (M. Muirhead, "Sources of information on PMWS/PDNS," Vet. Rec. 150: 456 (2002)). Las lesiones microscópicas características de PMWS incluyen neumonía intersticial granulomatosa, linfadenopatía, hepatitis, y nefritis (G. M. Allan y J. A. Ellis, "Porcine circoviruses: a review," J. Vet. Diagn. Invest. 12: 3 - 14 (2000); J. C. Harding and E.G. Clark, 1997, *supra*). Se ha localizado PMWS en cerdos en Canadá, Estados Unidos (G. M. Allan et al., "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes," Vet. Rec. 142: 467 - 468 (1998); G. M. Allan et al., "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe," J. Vet. Diagn. Invest. 10: 3 - 10 (1998); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, *supra*; J. Ellis et al., "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome," Can. Vet. J. 39: 44 - 51 (1998); A. L. Hamel et al., "Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs," J. Virol. 72: 5262 - 5267 (1998); M. Kiupel et al., "Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana," Vet. Pathol. 35: 303 - 307 (1998); R. Larochelle et al., "Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR," Vet. Rec. 145: 140 - 142 (1999); B. M. Meehan *et al.*, 1998, *supra*; I. Morozov et al., "Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome," J. Clin. Microbiol. 36: 2535 - 2541 (1998)), la mayoría de los países europeos (G. M. Allan et al., "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe," J. Vet. Diagn. Invest. 10: 3 - 10 (1998); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, *supra*; S. Edwards and J. J. Sands, 1994, *supra*; S. Kennedy et al., "Porcine circovirus infection in Northern Ireland," Vet. Rec. 142: 495 - 496 (1998); A. Mankertz et al., "Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France," Virus Res. 66: 65 - 77 (2000); C. Rosell et al., "Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Vet. Rec. 146:40-43 (2000); P. Spillane et al., "Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland," Vet. Rec. 143: 511 - 512 (1998); G. J. Wellenberg et al., "Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands," Vet. Quart. 22: 167 - 72 (2000)) y algunos países en Asia (C. Choi et al., "Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction," J. Vet. Diagn. Invest. 12: 151 - 153 (2000); A. Onuki et al., "Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan," J. Vet. Med. Sci. 61: 1119 - 1123 (1999)). PMWS potencialmente tiene un grave impacto económico en la industria del cerdo en todo el mundo.

El agente causante principal de PMWS es una cepa patógena de PCV denominada circovirus porcino tipo 2 o PCV2 (G. M. Allan et al., "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes," Vet. Rec. 142: 467 - 468 (1998); G. M. Allan et al., "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe," J. Vet. Diagn. Invest. 10: 3 - 10 (1998); G. M. Allan et al., "Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland," Vet. Microbiol. 66: 115 - 23 (1999); G. M. Allan y J. A. Ellis, 2000, *supra*; J. Ellis *et al.*, 1998, *supra*, A. L. Hamel *et al.*, 1998, *supra*; B. M. Meehan *et al.*, 1998, *supra*; I. Morozov *et al.*, 1998, *supra*). La secuencia genómica completa de PCV2 asociado a PMWS se ha determinado (M. Fenaux et al., "Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2," J. Clin. Microbiol. 38: 2494 - 503 (2000); A. L. Hamel *et al.*, 1998, *supra*; J. Mankertz *et al.*, 1998, *supra*; B. M. Meehan *et al.*, 1997, *supra*; B. M. Meehan *et al.*, 1998, *supra*; I. Morozov *et al.*, 1998, *supra*).

PCV1 es ubicuo en cerdos pero no es patógeno para los cerdos. Por el contrario, el PCV2 relacionado genéticamente es patógeno y provoca PMWS en cerdos. El análisis de secuencia revela que el PCV2 asociado a PMWS comparte solamente aproximadamente 75% de identidad de secuencia de nucleótidos con el PCV1 no patógeno. El gen ORF2 de tanto el PCV1 no patógeno como el PCV2 patógeno codifica la proteína de la cápsida viral inmunogénica principal (P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV," Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1: 33 - 40 (2002); P. Nawagitgul et al., "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein," J. Gen. Virol. 81: 2281 - 2287 (2000)).

Los intentos iniciales para reproducir PMWS en cerdos convencionales mediante inoculación de PCV2 no tuvieron éxito (M. Balasch et al., "Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome," J. Comp. Pathol. 121:139 - 148 (1999); M. Fenaux et al., "Cloned Genomic DNA of Type 2 Porcine Circovirus (PCV-2) is Infectious When Injected Directly into the Liver and Lymph Nodes of SPF Pigs: Characterization of Clinical Disease, Virus Distribution, and Pathologic Lesions," J. Virol. 76: 541 - 551 (2002)). La reproducción experimental de PMWS clínico en cerdos gnotobióticos y cerdos convencionales con homogenatos de tejidos de cerdos con PMWS de origen natural y PCV2 propagado de cultivo de células produjo resultados mixtos. PMWS clínico se reproduce en cerdos gnotobióticos (SPF) y cerdos desprovistos de calostro y derivados de cesárea coinfectados con PCV2 y parvovirus porcino (PPV) (G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," J.

Comp. Pathol. 121: 1 - 11 (1999); S. Krakowka et al., "Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus," Vet. Pathol. 37: 254 - 263 (2000)), y en cerdos gnotobióticos inoculados con PCV2 cuando su sistema inmune se activó por hemocianina de ojo de cerradura en adyuvante de Freund incompleto (S. Krakowka et al., "Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2)," Vet. Pathol. 38:31-42 (2001)).

PMWS clínico también se reprodujo en cerdos derivados de cesárea / desprovistos de calostro (CD/CD) inoculados con PCV2 solo (P. A. Harms et al., "Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus," Vet. Pathol. 38:528-539 (2001)) y en cerdos convencionales co-infectados con PCV2 y cualquier parvovirus porcino (PPV) o virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) (A. Rivora et al., "Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2," J. Virol. 76: 3232 - 3239 (2002)). En los casos de la co-infección con PRRSV/PCV2, los signos patológicos característicos de PMWS tales como agotamiento linfoide, inflamación granulomatosa y hepatitis necrotizante están inducidos por PCV2 y no por PRRSV (P. A. Harms et al., 2001, *supra*). Sin embargo, PMWS clínico no se reprodujo en cerdos gnotobióticos infectados con PCV2 solo (G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication," Arch. Virol. 145: 2421 - 2429 (2000); G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation, J. Vet. Med. 47: 81 - 94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," J. Comp. Pathol. 121: 1 - 11 (1999); M. Balasch et al., 1999, *supra*; J. Ellis et al., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets," J. Vet. Diagn. Invest. 11: 3 - 14 (1999); S. Kennedy et al., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus" J. Comp. Pathol. 122:9-24 (2000); S. Krakowka et al., 2001, *supra*; S. Krakowka et al., 2000, *supra*; R. M. Pogranichnyy et al., "Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection," Viral. Immunol. 13: 143-153 (2000)). Los inóculos de virus usados en estos estudios eran o bien homogenatos de tejidos de cerdos con PMWS de origen natural, o virus propagados en cultivos de células PK-15 (G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication," Arch. Virol. 145: 2421 - 2429 (2000); G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation, J. Vet. Med. 47: 81 - 94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," J. Comp. Pathol. 121: 1 - 11 (1999); M. Balasch et al., 1999, *supra*; J. Ellis et al., 1999, *supra*; S. Kennedy et al., 2000, *supra*; S. Krakowka et al., 2001, *supra*; S. Krakowka et al., 2000, *supra*; R. M. Pogranichnyy et al., 2000, *supra*). Ya que los homogenatos de tejidos pueden contener otros agentes de cerdo tales como PPV y virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) (G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication," Arch. Virol. 145: 2421 - 2429 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," J. Comp. Pathol. 121: 1 - 11 (1999); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, *supra*; J. A. Ellis et al., "Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome," J. Vet. Diagn. Invest. 12:21-27 (2000); C. Rosell et al., 2000, *supra*), y desde que la línea de células ATCC PK-15 utilizada para la propagación PCV se infectó de forma persistente con PCV1 (G. C. Oulac and A. Afshar, 1989, *supra*), la enfermedad clínica y las lesiones patológicas reproducidas en estos estudios pueden no atribuirse exclusivamente a la infección PCV2. (G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication," Arch. Virol. 145:2421-2429 (2000); G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation, J. Vet. Med. 47:81-94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease 50 by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," J. Comp. Pathol. 121: 1-11 (1999); G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, *supra*; J. A. Ellis et al., 2000, *supra*).

PMWS clínico también se ha reproducido en cerdos CDCD inoculados con PCV2 cuando se vacunan con *Mycoplasma hyopneumoniae* (G. M. Allan et al., "Immunostimulation, PCV-2 and PMWS," Vet. Rec. 147:171-172 (2000)). Dos recientes estudios de campo por G. M. Allan et al., "Neonatal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae* and postweaning multisystemic wasting syndrome: a field trial," Pig J. 48: 34 - 41 (2001), y S. C. Kyriakis et al., "The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome," J. Comp. Pathol. 126: 38 - 46 (2002), probó el efecto de inmunomodulación mediante vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* en el desarrollo de PMWS en manadas endémicas, y muestran una disminución significativa de casos de PMWS en grupos no vacunados comparados con los animales vacunados. Sin embargo, otro estudio reciente que usa lechones de SPF convencionales en condiciones de laboratorio controladas podría no reproducir este efecto, sugiriendo que las vacunaciones con *M. hyopneumoniae* pueden potencialmente influir en el desarrollo de PMWS clínico pero es claramente un papel secundario a una infección de PCV2. Basándose en estos y otros estudios, PCV2 no obstante se considera que es el agente causante principal pero no exclusivo de PMWS.

La carencia de una reserva de virus infeccioso de una forma biológicamente pura de PCV2 ha impulsado el entendimiento de la patogénesis de PCV2 y el papel etiológico de PCV2 en PMWS. Las vacunaciones contra PPV y posiblemente PRRSV no han mostrado de manera consistente que eviten la aparición de PMWS en cerdos infectados con PCV2. Por consiguiente, el hallazgo una vacuna segura incluso potente que dirige de manera específica PMWS ha sido difícil. Existe una necesidad reconocida en la técnica en el campo veterinario para producir una vacuna eficaz, segura contra infecciones por PCV2 y PMWS.

La Patente de EE.UU. N° 6.287.856 (Poet et al.) y el documento WO 99/45956 se refieren a ácidos nucleicos del virus de enfermedad de pico y pluma de Psittacine (BFDV), un circovirus que infecta especies aviarias, y de circovirus porcino (PCV). La patente proporciona composiciones de vacuna que comprenden ADN o ARNm desnudos y divulga un vector de ácido nucleico para la expresión transitoria de PCV en una célula eucariótica que comprende una secuencia reguladora de transcripción o traducción de actuación cis derivada del citomegalovirus humano potenciador del gen inmediato o temprano o promotor unido funcionalmente a ácido nucleico de la secuencia. Sin embargo, ya que el ADN de PCV se deriva únicamente de la línea celular PK-15, es probable que comprenda el PCV1 no patógeno descubierto aproximadamente hace 30 años por I. Tischer *et al.*, 1974, *supra*, y, por lo tanto, es probable que no sea capaz de provocar una respuesta inmune a PCV2 o infecciones provocadas por PCV2. Las vacunas subunitarias de proteínas recombinantes hechas a partir de vectores que comprenden marcos abiertos de lectura también se sugieren en la patente pero los marcos abiertos de lectura de PCV no están bien caracterizados o distinguidos uno del otro. Ya que la fuente del ADN de PCV es células de PK-15, las proteínas preparadas a partir de vectores que comprenden los marcos abiertos de lectura de PCV1 no poseerían propiedades inmunogénicas fiables, si las hay, contra PCV2.

La Patente de EE.UU. N° 6.217.883 (Allan et al.) y la Patente Francesa N° 2.781.159B se refieren al aislamiento de cinco cepas de PCV de muestras pulmonares o ganglionarias tomadas de cerdos infectados con PMWS en Canadá, California y Francia (Bretaña), y su uso en combinación con al menos un antígeno de parvovirus porcino en composiciones inmunogénicas. Las proteínas codificadas por PCV2 marcos abiertos de lectura (ORF) que consisten en ORF1 a ORF13 se describen ampliamente en la patente pero no es ejemplificación de cualquier proteína específica que muestra propiedades inmunogénicas. La patente además divulga vectores que constan de ADN de plásmidos, moléculas de ADN lineal y virus recombinantes que contienen y expresan *in vivo* una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de PCV. Otras referencias diferentes, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 6.391.314 B1; la Patente de EE.UU. N° 6.368.601 B1; la patente francesa N° 2.769.321; la patente francesa N° 2.769.322; el documento WO 01/96377 A2; el documento WO 00/01409; el documento WO 99/18214; el documento WO 00/77216 A2; el documento WO 01/16330 A2; el documento WO 99/29871; etc., también describen la administración de polipéptidos PCV1 o PCV2 o los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de diversas cepas.

Sin embargo, el PCV1 no patógeno no será útil contra infecciones con PCV2 y las capas patógenas de PCV2 descritas en la técnica, incluso si están atenuadas, es probable que sean de valor limitado debido a la tendencia usual de un virus vivo para revertir su estado virulento. Por lo tanto, existe todavía una necesidad desde hace mucho tiempo en la técnica de un antígeno vivo, infeccioso, no patógeno para la inoculación de cerdos contra infección grave o PMWS provocada por PCV2 que sea eficaz y permanezca seguro en vacunas veterinarias. Estos objetivos se consiguen mediante la construcción del nuevo circovirus porcino quimérico vivo descrito en el presente documento, que se basa en la estructura central genómica del PCV1 no patógeno aislado por I. Tischer *et al.* hace casi 30 años. El circovirus porcino quimérico novedoso de la presente invención es capaz de satisfacer esa necesidad existente desde hace mucho tiempo mediante solamente y ventajosamente reteniendo el fenotipo no patógeno de PCV1 pero provocando respuesta inmune específica contra PCV2 patógeno.

#### Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a vacunas virales, por ejemplo vacunas de ADN, vacunas vivas, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivadas o vacunas atenuadas que protegen a un cerdo contra la infección viral o el síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS) provocado por PCV2, que comprende un vehículo no tóxico, fisiológicamente aceptable, uno o más adyuvantes y una cantidad inmunogénica de un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en:

(a) una molécula de ácido nucleico quimérico de circovirus porcino (PCV1-2) caracterizada por tener una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV1 no patógeno, que contiene el gen del marco abierto de lectura 2 (ORF2) inmunogénico de un PCV2 patógeno en lugar del gen ORF2 de la molécula de ácido nucleico de PCV1;

(b) una molécula de ácido nucleico quimérico que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID N° 2, su hebra complementaria o secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95 % de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2;

(c) un plásmido o vector viral que contiene la molécula de ácido nucleico quimérico de circovirus porcino (PCV1-2), la hebra complementaria de la secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95 % de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2; y

(d) un circovirus porcino quimérico hecho de una molécula de ácido nucleico quimérico de PCV1-2, en la que el gen de la cápsida de ORF2 de un PCV1 no patógeno se reemplaza con el gen de la cápsida de ORF2 de un PCV2 patógeno,

5 y, opcionalmente, una cantidad inmunogénica de al menos un antígeno porcino adicional, por ejemplo un virus de síndrome porcino reproductor y respiratorio (PRRSV), parvovirus porcino (PPV) o ambos.

La presente invención también se refiere a la vacuna viral de la presente invención para uso en la protección de un cerdo contra infección viral o síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS) provocado por PVC2.

10 Los virus vivos quiméricos, genéticamente no virulentos, se preparan a partir de estructura genómica de PCV1 no patógeno, en la que un gen inmunogénico de una hebra de PCV2 patógeno reemplaza un gen de PCV1, en la misma posición correspondiente. La memoria descriptiva describe los plásmidos biológicamente funcionales, vectores virales y similares que contienen las nuevas moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en el presente documento, células huésped adecuadas transfectadas por los vectores que comprenden el ADN y productos de expresión polipeptídicos inmunogénicos. También incluida dentro del ámbito de la presente invención es una vacuna viral y su uso en un procedimiento de protección de cerdos contra la infección viral o el síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS) provocado por PCV2, que comprende administrar a un cerdo en necesidad de tal protección una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna. La memoria descriptiva además describe clones de ADN quimérico recíprocos de PCV que encuentran uso como modelos experimentales en la obtención o caracterización de las vacunas virales no virulentas.

### Breve descripción de los dibujos

20 Los antecedentes de la invención y su novedad en la técnica se describirán adicionalmente en el presente documento más adelante con referencia a los dibujos que acompañan, en los que:

25 Figura 1 representa la construcción de un clon de ADN molecular de PCV2 infeccioso. Las posiciones relativas del par de cebadores usados para ampliar el genoma del PCV2 completo se indican en las fechas (cebador inverso PCVSAC2, cebador directo PCVSAC2). El ADN genómico de PCV2 amplificado por PCR se digiere con la enzima de restricción de SacII, y se purificó. El ADN genómico purificado y digerido con SacII se ligó para formar concatémeros. Los concatémeros ligados se separan mediante electroforesis en gel, el dímero del genoma en tándem de PCV2 se purifica y se clona en el vector pSK que se digiere previamente con la enzima SacII para producir un clon de ADN de PCV2 molecular.

30 Figuras 2A y 2B ilustran que el ADN de plásmido de PCV2 clonado es infeccioso cuando se transfecta *in vitro* en células PK-15. Figura 2A muestra la detección del antígeno de PCV2 mediante ensayo de inmunofluorescencia (IFA) en células PK-15 transfectadas con ADN de plásmido de PCV2. El inmunomarcaje intenso del antígeno de PCV2 se visualiza en el núcleo, y a un menor grado, citoplasma de las células transfectadas. Figura 2B muestra las células PK-15 transfectadas simuladamente.

35 Figura 3A muestra los pulmones de un cerdo inoculado por vía intralinfoide con PCV2 ADN 21 días después de la infección. Los pulmones son gomosos, fallan hasta el colapso, y están sombreados de color rojo tostado. Los ganglios linfáticos traqueobronquiales están notablemente agrandados y de color tostado (flechas). Figura 3B representa una sección microscópica de un pulmón normal de un cerdo de control (25X). Figura 3C representa una sección microscópica del pulmón del cerdo en la Figura 3A. Hay que destacar la inflamación linfocítica peribronquiolar y la bronquiolitis necrotizante suave (25X). Figura 3D ilustra la tinción inmunohistoquímica del pulmón en la Figura 3A. Hay que destacar el antígeno de PCV2 en macrófagos (flechas) y células de tipo fibroblasto (cabezas de flechas) alrededor de las vías respiratorias (64X).

Figura 4A muestra un ganglio linfático normal de un cerdo de control. Hay que destacar los folículos linfoides bien definidos (flechas) (25X).

45 Figura 4B representa una sección microscópica del ganglio linfático traqueobronquial del cerdo en la Figura 3A inoculado 21 días previamente por la vía intralinfoide con ADN genómico de PCV2 clonado. Los folículos linfoides están escasamente definidos, existe un agotamiento linfoide suave a moderado, y una inflamación granulomatosa multifocal suave (25X).

50 Figura 4C representa una sección microscópica del ganglio linfático en la Figura 4B en un aumento mayor que se centra en el folículo. Hay que destacar el folículo escasamente definido con macrófagos y células gigantes (flecha) reemplazo de linfocitos foliculares (64X).

Figura 4D ilustra la detección inmunohistoquímica de antígeno de PCV2 en el mismo ganglio linfático que la Figura 4B en macrófagos (flechas) y células gigantes (cabezas de flecha pequeñas), y células de tipo dendrítico (cabezas de flecha grandes) en los folículos (64X).

55 Figura 5 ilustra la construcción de un clon de ADN de PCV1-2 quimérico (PCV1/PCV2) con el genoma de PCV1 no patógeno que lleva el gen inmunogénico de la cápsida de ORF2 de PCV2 patógeno. El clon de ADN

dimerizado se usa para transfección *in vitro* de células PK-15 para producir virus quimérico vivo que expresa la proteína de ORF2 de PCV2, y experimentos animales *in vivo* para confirmar actividad.

Figura 6 representa la construcción y organización de clones de ADN moleculares infecciosos de PCV1, PCV2, PCV1-2 quimérico y PCV2-1 quimérico recíproco. El clon de ADN de PCV2 se construye ligando dos genomas de PCV2 lineales de longitud completa en tándem en el vector Bluescript SK (pSK) mediante los procedimientos generales descritos anteriormente (M. Fenaux *et al.*, 2002, *supra*). El clon de ADN de PCV1 se construye ligando dos genomas de PCV1 lineales de longitud completa en tándem en el vector pSK. El clon de ADN de PCV1-2 quimérico se construye reemplazando el gen de la cápsida de ORF2 de PCV1 con el de PCV2 en la estructura central genómica de PCV1 no patógena en el vector pSK. El clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco se construye reemplazando el gen de la cápsida de ORF2 de PCV2 patógeno con el del PCV1 no patógeno en la estructura central genómica de PCV2 en el vector pSK. Ambos clones son dímeros en el vector pSK. Las flechas representan las localizaciones relativas de los cebadores de PCR para la detección de viremia de PCV1, PCV2, PCV1-2 y PCV2-1 en animales inoculados.

Figuras 7A-7J demuestran que los clones de ADN de PCV1, PCV2, PCV1-2 quimérico y PCV2-1 quimérico recíproco son infecciosos y expresan los antígenos virales respectivos cuando se transfectan *in vitro* en células PK-15. El panel izquierdo (7A, 7C, 7E, 7G y 7I) se tiñe con anticuerpo monoclonal contra el ORF2 de PCV1. El panel derecho (7B, 7D, 7F, 7H y 7J) se tiñe con anticuerpo monoclonal contra PCV2. Los paneles 7A y 7B son células PK-15 transfectadas simuladas. Los paneles 7C y 7D son células PK-15 transfectadas con el clon de ADN de PCV1. Los paneles 7E y 7F son células PK-15 transfectadas con el clon de ADN de PCV2. Los paneles 7G y 7H son células PK-15 transfectadas con el clon de ADN de PCV1-2 quimérico. Los paneles 7I y 7J son células PK-15 transfectadas con el clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco.

Figura 8 representa la secuencia de ADN de longitud completa del ADN molecular de PCV2 clonado (que corresponde a la SEC ID N°:1).

Figura 9 representa la secuencia de ADN de longitud completa del ADN de PCV1-2 quimérico clonado (que corresponde a la SEC ID N°:2).

Figura 10 representa la secuencia de ADN del gen de la cápsida de ORF2 inmunogénica del ADN de PCV1-2 quimérico clonado (que corresponde a la SEC ID N°:3).

Figura 11 representa la traducción de aminoácidos supuestos del gen de la cápsida de ORF2 inmunogénica del ADN de PCV1-2 quimérico (que corresponde a la SEC ID N°:4).

### Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se describen moléculas de ácido nucleico quimérico y molecular infeccioso y de circovirus porcino (PCV), virus quiméricos vivos producidos a partir de la molécula de ácido nucleico quimérico y vacunas veterinarias para proteger cerdos de infección viral o síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS) provocado por PCV2. La memoria descriptiva además describe productos de expresión polipeptídicos inmunogénicos que se pueden usar como vacunas.

La nueva molécula de ADN quimérico, infeccioso no virulento de PCV (PCV1-2) comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV1 infeccioso, no patógeno que contiene un gen de marco abierto de lectura 2 (ORF2) inmunogénico de un PCV2 patógeno en lugar de un gen de ORF2 en el genoma de PCV1. De este modo, el clon de ADN de PCV1-2 quimérico infeccioso contiene el gen de la cápsida (ORF2) inmunogénico del ADN de PCV2 clonado en la estructura central genómica del clon de ADN de PCV1 infeccioso, no patógeno. El gen de la cápsida del ADN de PCV2 reemplaza el gen de ORF2 del ADN de PCV1 en la estructura genómica de PCV1 no patógena y se describe una diversidad de permutaciones posicionales construidas mediante ingeniería genética para obtener otros clones de ADN quiméricos no virulentos o atenuados. El clon de ADN de PCV2-1 recíproco quimérico infeccioso entre PCV1 y PCV2 se divulga como un control para analizar el clon de PCV1-2 quimérico de la invención y se construye reemplazando el gen de la cápsida de PCV2 con el de PCV1 en la estructura central del clon de ADN infeccioso de PCV2 patógeno. Además de ser un modelo experimental, el clon de ADN de PCV2-1 recíproco quimérico puede encontrar uso en la preparación de vacunas confeccionadas especialmente.

El ADN genómico clonado de PCV2 descrito en el presente documento se muestra que es infeccioso *in vitro* e *in vivo* cuando se transfecta en células PK-15 y se proporciona a los cerdos. El clon de ADN de PCV2 infeccioso produce lesiones patológicas características de PMWS en cerdos permitiendo una caracterización mejorada de enfermedad clínica y se entiende de distribución de virus en las células de tejido. Este nuevo agente patógeno reproducible fácilmente se presta el mismo al desarrollo de un programa de vacunación adecuado para prevenir PMWS en cerdos.

El nuevo clon de ADN de PCV1-2 quimérico es también infeccioso tanto mediante transfección de células PK-15 *in vitro* como administración *in vivo* a cerdos. En células PK-15 transfectadas, el clon de ADN de PCV1-2 quimérico expresa el antígeno de la cápsida de PCV2 (la proteína de la cápsida inmunogénica de PCV2) mientras que el clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco expresa el antígeno de la cápsida de PCV1, que se demuestra mediante

ensayo de inmunofluorescencia (IFA) usando anticuerpos específicos para el antígeno de la cápsida de PCV1 o PCV2. La seroconversión a anticuerpo específico de PCV2 se detecta en cerdos inoculados con el clon de PCV2 infeccioso así como el clon de PCV1-2 quimérico. La detección de la seroconversión a anticuerpo específico de PCV2 establece que el clon de ADN quimérico de PCV1-2 induce el anticuerpo específico de PCV2 en cerdos infectados y, por consiguiente, actúa para proteger cerdos inoculados de la infección con PCV2.

Los ejemplos de más adelante describen la evaluación de la inmunogenicidad y patogenicidad de los clones de ADN quimérico en cerdos inoculados en más detalle. Básicamente, las seroconversiones a anticuerpos contra antígeno de ORF2 de PCV2 se detectan en cerdos inoculados con el clon de ADN de PCV2 (Grupo 3) y el clon de ADN de PCV-12 quimérico (Grupo 4). Todos los cerdos inoculados con el clon de PCV1 y el clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco (Grupos 2 y 5, respectivamente) seroconvertidos al anticuerpo de PCV1. Los virus recuperados de cerdos seleccionados en cada grupo están parcialmente secuenciados y confirmados que son los clones de ADN infecciosos respectivos auténticos en la inoculación. Las lesiones macroscópicas y microscópicas en diversos tejidos de animales inoculados con el clon de ADN de PCV2 son significativamente más graves que las encontradas en cerdos inoculados con clones de ADN de PCV1, PCV1-2 quiméricos y de PCV2-1 quiméricos recíprocos.

Sorprendente y ventajosamente, el clon de ADN de PCV1-2 infeccioso que tiene el gen de la cápsida inmunogénica (ORF2) del PCV2 patógeno clonado en la estructura central genómica de PCV1 no patógena induce una respuesta de anticuerpo específica al antígeno de la cápsida de PCV2 patógeno mientras únicamente retiene la naturaleza no patógena de PCV1 en cerdos. Los animales inoculados con el clon de ADN de PCV1-2 infeccioso quimérico desarrollan una infección suave que se parece a la de los animales inoculados con PCV1 mientras se seroconvierten al anticuerpo contra la proteína de la cápsida de ORF2 del PCV2 patógeno. La duración media de la viremia observada en animales inoculados con PCV1 y PCV1-2 quimérico es más corta, 0,625 semanas y 1 semana respectivamente, que la de animales inoculados con PCV2 patógeno 2,12 semanas. La carencia de viremia de PCV1-2 quimérica detectable en algunos animales inoculados no afecta a la seroconversión a anticuerpo contra la proteína de la cápsida de ORF2 de PCV2 en los cerdos inoculados con PCV1-2 (Grupo 4). Los resultados indican que, incluso aunque la viremia de PCV1-2 quimérica es corta o indetectable en algunos animales inoculados, el virus de PCV1-2 quimérico es capaz de inducir respuesta de anticuerpo contra la proteína de la cápsida de ORF2 de PCV2. La facultad especial del clon de ADN infeccioso de PCV1-2 quimérico de inducir la respuesta inmune específica para la proteína de la cápsida de ORF2 inmunogénica de PCV2 que incluso permanece no patógena para los cerdos hace que el clon de PCV1-2 quimérico sea particularmente útil como una vacuna atenuada viva modificada por ingeniería genética y otros tipos de vacunas.

Las moléculas de ácido nucleico novedosas, purificadas y aisladas de esta invención comprenden la secuencia de ADN de longitud completa de la secuencia de ADN de PCV1-2 quimérica clonada establecida en la SEC ID N° :2, mostrada en la Figura 9 y depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo bajo la Designación de Depósito de Patente PTA-3912; su hebra complementaria (*es decir*, pares de bases inversas y opuestas) o las secuencias de nucleótidos que tienen al menos 95% de homología con la secuencia de nucleótidos quiméricas (*es decir*, una parte significativa activa del gen completo). Los procedimientos convencionales que se conocen bien en la técnica se pueden usar para preparar las hebras complementarias o las secuencias de nucleótidos que poseen alta homología, por ejemplo, mediante técnicas de hibridación de rigurosidad estándar o alta reconocida en la técnica. La molécula de ácido nucleico purificada y aislada que comprende la secuencia de ADN del gen de la cápsida inmunogénica del ADN de PCV1-2 clonado quimérico también se establece en la SEC ID N°:3 y Figura 10.

Las células adecuadas que contienen la molécula de ácido nucleico quimérico únicamente producen circovirus vivos, infecciosos porcinos quiméricos. Los virus vivo, infecciosos quiméricos se derivan del clon de ADN transfectando las células PK-15 mediante transfecciones *in vitro* e *in vivo* como se ilustra en el presente documento. Un ejemplo preferente del ADN de PCV1-2 quimérico es la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID N°:2 y la Figura 9. La invención además prevé que el virus quimérico se deriva de la hebra complementaria de las secuencias de nucleótidos que tienen una alta homología, al menos 95% de homología, con la secuencia de nucleótidos quimérica.

También se describen en el presente documento plásmidos biológicamente funcionales, vectores virales y similares que contienen las nuevas moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en el presente documento, las células huésped adecuadas transfectadas por los vectores que comprenden los clones de ADN quiméricos y moleculares y los productos de expresión de polipéptidos inmunogénicos, tal como la proteína inmunogénica que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID N°:4 y la Figura 11. También se pueden producir sus variantes biológicamente activas. Los expertos en la técnica conocerían cómo modificar, sustituir, suprimir, etc., aminoácido (s) de la secuencia de polipéptidos y producirían variantes biológicamente activas que retienen la misma o sustancialmente la misma actividad que la secuencia precursora sin un esfuerzo excesivo.

Para producir los productos de polipéptido inmunogénicos como se ha descrito en el presente documento, el procedimiento puede incluir las siguientes etapas: crecimiento, en condiciones nutritivas adecuadas, células huésped procarióticas o eucarióticas transfectadas con las nuevas moléculas de ácidos nucleicos recombinantes descritas en el presente documento de una manera que permite la expresión de dichos productos de polipéptidos, y aislar los productos de polipéptidos deseados de la expresión de dichas moléculas de ácidos nucleicos mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Se contempla que las proteínas inmunogénicas se pueden preparar mediante otras técnicas tales como, por ejemplo, síntesis bioquímica y similares.

Las vacunas de los clones de ADN virales y moleculares quiméricas, y sus usos, también están incluidos dentro del ámbito de la presente invención. Los cerdos inoculados están protegidos de la infección viral y PMWS graves provocadas por PCV2. El uso protege a los cerdos en necesidad de protección contra infección viral o PMWS mediante la administración al cerdo de una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna de acuerdo con la invención, tal como, tal como, por ejemplo, una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica del ADN de PCV1-2 quimérico, el virus quimérico clonado, o un plásmido o vector viral que contiene el ADN quimérico de PCV1-2, etc. Otros antígenos tales como PRRSV, PPV, otros agentes porcinos infecciosos y estimulantes inmunes se pueden proporcionar simultáneamente al cerdo para proporcionar un amplio espectro de protección contra infecciones virales.

5  
10  
15  
Las vacunas comprenden, por ejemplo, el ADN de PCV1-2 infeccioso quimérico, el genoma de ADN quimérico de PCV clonado en plásmidos o vectores adecuados tales como, por ejemplo, el vector pSK, un virus no virulento, virus quimérico, un virus quimérico inactivado, etc. en combinación con un vehículo no tóxico, fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más adyuvantes. El ADN de PCV1-2 quimérico infeccioso, el ADN de plásmido que contiene el genoma viral quimérico infeccioso y el virus quimérico vivo se prefieren, siendo el virus quimérico vivo el más preferente. La vacuna viral no virulenta, viva de la presente invención proporciona una ventaja sobre las vacunas virales tradicionales que usan o bien virus atenuados, vivos que corren el riesgo de volver a revertir al estado virulento o virus enteros propagados de cultivo de células muertas que no inducen suficiente respuesta inmune de anticuerpo para protección contra la enfermedad viral.

20  
25  
30  
El adyuvante, que se puede administrar conjuntamente con la vacuna de la presente invención, es una sustancia que incrementa la respuesta inmunológica del cerdo a la vacuna. El adyuvante se puede administrar al mismo tiempo y en el mismo sitio que la vacuna, o en un tiempo diferente, por ejemplo, como un refuerzo. Los adyuvantes también se pueden administrar ventajosamente al cerdo de una manera o en un sitio diferente de la manera o sitio en la que la vacuna se administra. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio (alum), complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), polímeros o copolímeros de bloqueo no iónicos, citoquinas (como IL-1, IL-2, IL-7, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , etc.), saponinas, monofosforil lípido A (MLA), muramil dipéptidos (MDP) y similares. Otros adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, sulfato de aluminio y potasio, enterotoxina termolábil o termoestable aislado de *Escherichia coli*, toxina colérica o su subunidad B, toxina diftérica, toxina tetánica, toxina pertussis, adyuvante incompleto o completo de Freund, etc. Los adyuvantes basados en toxinas, tales como toxina diftérica, toxina tetánica y toxina pertussis también se pueden inactivar antes de uso, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído.

Las vacunas pueden además contener antígenos adicionales para promover la actividad inmunológica de los clones de ADN de PCV quimérico infeccioso, tales como, por ejemplo, virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), parvovirus porcino (PPV), otros agentes de cerdo infecciosos y estimulantes inmunes.

35  
Las vacunas de la presente invención no están restringidas a ningún tipo o procedimiento particular de preparación. Las vacunas virales clonadas incluyen, pero no se limitan a, vacunas de ADN infecciosas (es decir, que usan plásmidos, vectores u otros vehículos convencionales para inyectar directamente el ADN en los cerdos), vacunas vivas, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivadas, vacunas atenuadas, vacunas modificadas por ingeniería genética, etc. Estas vacunas se preparan mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica.

40  
45  
50  
La vacuna viral viva es en general la vacuna más deseable ya que todas las respuestas inmunes posibles están activadas en el receptor de la vacuna, incluyendo respuestas inmunes sistémicas, locales, humorales y mediadas por células. Por otra parte, una vacuna muerta puede solamente inducir respuesta inmune humoral. Aunque lo más deseable, sin embargo, ya que las vacunas virales tienen varias desventajas, tal como el riesgo potencial de contaminación con los agentes virales adventicios o el riesgo de que el virus pueda revertir a virulencia en el campo. De manera notable, el único ADN quimérico de PCV1-2 de la presente invención supera esas desventajas. Usando solamente genes inmunogénicos de PCV2 patógeno, el ADN quimérico construye un virus vivo, quimérico, que es no patógeno ya que provoca las respuestas inmunes completas, beneficiosas de las vacunas virales vivas contra el virus de PCV2 patógeno. La vacuna de virus vivo basada en el virus quimérico tendrá poca oportunidad, si la tiene, para reversión a un fenotipo patógeno. De este modo, el nuevo virus quimérico basado en la estructura del PCV1 no patógeno tiene una enorme ventaja sobre cualquier virus de ADN de PCV2 recombinante, cualquier vacuna de PCV2 vivo, atenuado o cualquier otro tipo de vacuna predicada únicamente sobre PCV2 para inmunidad contra las infecciones por PCV2.

55  
Aunque la vacuna viral viva es la más preferente, otros tipos de vacunas se pueden usar para inocular cerdos con el nuevo virus quimérico y otros antígenos descritos en el presente documento. Para preparar vacunas de virus inactivadas, por ejemplo, la propagación de virus a partir del clon de ADN infeccioso se hace mediante procedimientos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento. La inactivación del virus en serie después se optimiza mediante protocolos en general conocidos por los expertos en la técnica.

60  
Las vacunas de virus inactivadas se pueden preparar mediante tratamiento del virus quimérico derivado del ADN de PCV con agentes de inactivación tales como formalina o disolventes hidrófobos, ácidos, etc., mediante irradiación con luz ultravioleta o rayos X, mediante calentamiento, etc. La inactivación se lleva a cabo de una manera entendida en la técnica. Por ejemplo, en inactivación química, una muestra de virus adecuado o muestra de suero que contiene

el virus se trata durante un tiempo suficiente con una cantidad o concentración suficiente de agente de inactivación a una temperatura suficientemente alta (o baja dependiendo del agente de inactivación) o pH para inactivar el virus. La inactivación mediante calentamiento se lleva a cabo a una temperatura y durante un tiempo suficiente para inactivar el virus. La inactivación mediante irradiación se lleva a cabo usando una longitud de onda de luz u otra fuente de energía durante un tiempo suficiente para inactivar el virus. El virus se considera inactivado si es incapaz de infectar una célula susceptible a infección.

La preparación de subunidades de vacunas generalmente difiere de la preparación de una vacuna viva modificada o una vacuna inactivada. Antes de la preparación de una subunidad de vacuna, deben ser identificados los componentes de protección o antígenos de la vacuna. Tales componentes de protección o antígenos incluyen ciertos segmentos de aminoácido o fragmentos de las proteínas de la cápsida viral que inducen una respuesta particularmente inmune o protectora más fuerte en cerdos: proteínas de la cápsida viral únicas o múltiples de los mismos, oligómeros del mismo, y asociaciones de orden superior de las proteínas de la capsida viral que forman subestructuras de virus o partes identificables o unidades de tales subestructuras; oligoglicosidos, glicolípidos o glicoproteínas presentes en o cerca de la superficie del virus o en subestructuras virales tales como las lipoproteínas o grupos de lípidos asociados con el virus, etc. Preferentemente, una proteína de la capsida, tal como la proteína codificada por el gen de ORF2, se emplea como el componente antigénico de la subunidad de vacunas. Otras proteínas codificadas por el ADN infeccioso se pueden usar también. Estos componentes inmunogénicos son fácilmente identificados por procedimientos conocidos en la técnica. Una vez identificados, las partes protectoras o antígenos del virus (es decir, la "subunidad") son posteriormente purificadas y/o clonadas por procedimientos conocidos en la técnica. La subunidad de vacunas proporciona una ventaja sobre otras vacunas basada en el virus vivo desde la subunidad, tal como subunidades del virus sumamente purificadas, es menos tóxica que el virus completo.

Si la subunidad de vacunas se produce a través de técnicas de genética recombinante, expresión de la subunidad clonada, tal como el gen de ORF2 (capsida), por ejemplo, se puede optimizar por procedimientos conocidos para aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, MA., 1989). Si siendo empleada la subunidad representa un rasgo estructural intacto del virus, tal como una proteína de la capsida entera, el procedimiento para su aislamiento del virus debe ser entonces optimizado. En cualquier caso, después de la optimización del protocolo de inactivación, el protocolo de purificación de la subunidad puede ser optimizado antes de la fabricación.

Para preparar vacunas atenuadas a partir de clones patógenos, el PCV2 de cultivos de tejidos adaptados, vivos, patógenos primero se atenúa (se hace no patógeno o inocuo) mediante procedimientos conocidos en la técnica, típicamente hechos mediante pasaje en serie mediante cultivos de células. La atenuación de clones patógenos también se puede preparar mediante supresiones de genes o mutaciones de genes que producen virus. Después, los virus de PCV2 atenuados se pueden usar para construir virus de PCV1-2 quiméricos que mantienen el fenotipo no patógeno de PCV1 pero pueden variar en la longitud de los caracteres de inmunogenicidad seleccionados entre el genoma de PCV2 mediante tecnología recombinante.

La vacuna más preferente emplea el clon de ADN del virus quimérico vivo que contienen los genes inmunogénicos de PCV2 clonado en la estructura central de PCV1 no patógeno. Ventajosamente, el virus quimérico vivo, que es por naturaleza no virulento cuando se construye mediante ingeniería genética, no requiere procedimientos de atenuación que requiere mucho tiempo. El virus únicamente sirve como un virus de replicación vivo pero no patógeno que produce proteínas inmunogénicas contra PCV2 durante la replicación del virus, que después puede provocar un intervalo completo de respuestas inmunes contra el PCV2 patógeno.

Como beneficio adicional, el virus quimérico vivo preferente de la presente invención proporciona una vacuna genéticamente estable que es más fácil de preparar, almacenar y distribuir que otros tipos de vacunas atenuadas. Las vacunas no virulentas o atenuadas basadas en los virus quiméricos se consideran en general tan seguras como, si no más seguras que, las vacunas vivas tradicionalmente modificadas (J. Arroyo et al., "Molecular basis for attenuation of neurovirulence of a yellow fever Virus/Japanese encephalitis virus chimera vaccine (ChimeriVax-JE)," J. Virol. 75 (2): 934 - 942 (2001); F. Guirakhoo et al., "Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates," J. Virol. 74 (12): 5477 - 5485 (2000); S. Tang et al., "Toward a poliovirus-based simian immunodeficiency virus vaccine: correlation between genetic stability and immunogenicity," J. Virol. 71 (10): 7841 - 7850 (1997)). Por ejemplo, the ChimeriVax-JE vacuna contra virus de encefalitis Japonesa (JEV), que es un derivado modificado por ingeniería genética de la vacuna del virus de la fiebre amarilla YFV17D en el que los genes que codifican las proteínas prM y E estructurales de YFV17D se reemplazan con los genes correspondientes de la cepa JEV SA14-14-2 atenuada, se ha mostrado que es genéticamente estable después de pasajes prolongados tanto *in vitro* como *in vivo* (J. Arroyo et al., 2001, *supra*). Otra vacuna de virus quimérico ChimeriVax-D2 contra virus Dengue tipo 2, que es un virus quimérico de fiebre amarilla (YF) - tipo 2 dengue (dengue-2), también se ha encontrado que es genéticamente estable; sus secuencias se reseñan que están inalterados después de 18 pasajes en células Vero (F. Guirakhoo et al., 2000, *supra*).

Otra vacuna preferente de la presente invención utiliza plásmidos adecuados para administrar el clon de ADN quimérico no patógeno a cerdos. Al contrario que la vacuna tradicional que usa virus entero propagado de cultivo de células vivas o muertas, esta invención proporciona la inoculación directa de cerdos con el ADN de plásmido que

contiene el genoma viral quimérico infeccioso.

Las vacunas adicionales modificadas por ingeniería genética, que son deseables en la presente invención, se producen mediante técnicas conocidas en la técnica. Tales técnicas implican, pero no se limitan a, manipulación adicional del ADN recombinante, modificación de o sustituciones a las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes y similares.

Las vacunas modificadas por ingeniería genética basadas en tecnología de ADN recombinante se preparan, por ejemplo, mediante identificación de partes alternativas del gen viral que codifica las proteínas responsables para inducir una respuesta inmune o protectora más fuerte en cerdos (*por ejemplo*, proteínas derivadas de ORF3, ORF4, *etc.*). Tales genes identificados o fragmentos inmuno dominantes se pueden clonar en vectores de proteína de expresión estándar, tal como el vector de baculovirus, y usarse para infectar en células huésped apropiadas (véase, por ejemplo, O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman y CO., 1992). Las células huésped se cultivan, expresando de esta manera las proteínas de vacuna deseadas, que se pueden purificar hasta el grado deseado y se formulan en un producto de vacuna deseado.

Si los clones retienen cualesquiera habilidades no deseables de enfermedades causantes, también es posible indicar con precisión las secuencias de nucleótidos en el genoma viral responsable de la virulencia, y modificar por ingeniería genética la no virulencia del virus mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio. La mutagénesis dirigida al sitio es capaz de añadir, suprimir o cambiar uno o más nucleótidos (véase, por ejemplo, Zoller et al., DNA 3: 479 - 488, 1984). Un oligonucleótido se sintetiza conteniendo la mutación deseada e hibridada a una parte de ADN viral de una sola hebra. La molécula híbrida, que se produce a partir de ese procedimiento, se emplea para transformar bacterias. Después el ADN de doble cadena, que se aísla conteniendo la mutación apropiada, se usa para producir ADN de longitud completa mediante ligación a un fragmento de restricción del último que se transfecta posteriormente en un cultivo de células adecuado. La ligación del genoma en el vector adecuado para transferencia se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica estándar conocida por los expertos en la técnica. La transfección del vector en células huésped para la producción de progenie viral se puede hacer usando cualquiera de los procedimientos convencionales tales como transfección mediada por fosfato de calcio o DEAE-dextrano, electroporación, fusión de protoplastos y otras técnicas bien conocidas (*por ejemplo*, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El virus clonado después muestra la mutación deseada. De manera alternativa, se pueden sintetizar dos oligonucleótidos que contienen la mutación apropiada. Éstos se pueden hibridar para formar ADN de doble cadena que se pueden insertar en un ADN viral para producir ADN de longitud completa.

Las proteínas modificadas por ingeniería genética, útiles en vacunas, por ejemplo, se pueden expresar en células de insecto, células de levadura o células de mamífero. Las proteínas modificadas por ingeniería genética, que se pueden purificar o aislar mediante procedimientos convencionales, se pueden inocular directamente en cerdos para conferir protección contra infección viral o síndrome de desmedro multisistémico post- destete (PMWS) provocado por PCV2.

Una línea celular de insectos (como HI-FIVE) se puede transformar con un vector de transferencia que contenga las moléculas de ácido nucleico obtenidas a partir del virus o copiadas a partir del genoma viral que codifica una o más de las proteínas inmuno- dominantes del virus. El vector de transferencia incluye, por ejemplo, ADN de baculovirus linealizado y un plásmido que contiene los polinucleótidos deseados. La línea de células huésped se puede cotransfectar con el ADN de baculovirus linealizado y un plásmido con el fin de preparar un baculovirus recombinante.

De manera alternativa, el ADN de un cerdo que sufre PMWS, que codifica una o más proteínas de la cápsida, el clon de ADN de PCV2 molecular infeccioso o el genoma de ADN quimérico de PCV se pueden insertar en vectores vivos, tal como un poxvirus o un adenovirus y usarse como una vacuna.

Una cantidad inmunológicamente eficaz de las vacunas de la presente invención se administra a un cerdo en necesidad de protección contra infección viral o PMWS. La cantidad inmunológicamente eficaz o la cantidad inmunogénica que inocular el cerdo se puede determinar fácilmente o valorar prontamente mediante ensayo de rutina. Una cantidad eficaz es una en la que una respuesta inmunológica suficiente para la vacuna se alcanza para proteger el cerdo expuesto al virus que provoca PMWS. Preferentemente, el cerdo se protege hasta un grado en el que uno a todos de los síntomas o efectos fisiológicos adversos de la enfermedad viral se reducen, mejoran de manera significativa o se evitan totalmente.

La vacuna se puede administrar en una sola dosis o en dosis repetidas. Las dosificaciones pueden variar, por ejemplo, entre 1 y 1.000 microgramos del ADN de plásmido que contiene el genoma de ADN quimérico infeccioso (dependiendo de la concentración del componente inmunoadactivo de la vacuna), pero no debe contener una cantidad de antígeno basado en virus que dé como resultado una reacción adversa o síntomas fisiológicos de infección viral. Se conocen en la técnica procedimientos para determinar o valorar las dosificaciones adecuadas de agente activo antigénico basadas en el peso del cerdo, concentración del antígeno y otros factores típicos. Preferentemente, el clon de ADN viral quimérico infeccioso se usa como una vacuna, o un virus quimérico infeccioso vivo se puede generar *in vitro* y después el virus quimérico vivo se usa como una vacuna. En ese caso, 100 a 200 microgramos del

ADN de PCV quimérico clonado o aproximadamente 10.000 de 50% de dosis infectiva de cultivo de tejidos (TCID<sub>50</sub>) del virus quimérico vivo que se puede proporcionar a un cerdo.

5 Deseablemente, la vacuna se administra a un cerdo no expuesto todavía al virus de PCV. La vacuna que contiene el clon de ADN quimérico de PCV1-2 infeccioso u otras de sus formas antigénicas se pueden de manera conveniente administrar por vía intranasal, transdérmica (*es decir*, aplicada a o en la superficie de la piel para absorción sistémica), parenteral, *etc.* La vía de administración parenteral incluye, pero no se limita a, las vías intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica (*es decir*, inyectada o de otra manera colocada bajo la piel) y similares. Ya que las vías intramuscular e intradérmica de inoculación han sido exitosas en otros estudios usando clones de ADN virales infecciosos (E. E. Sparger et al., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," *Virology* 238: 157 - 160 (1997); L. Willems et al., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," *Virology* 189: 775 - 777 (1992)), estas vías son las más preferentes, además de la vía intranasal de administración. Aunque menos conveniente, también se contempla que la vacuna se proporciona al cerdo a través de la vía intralinfoide de inoculación. Un procedimiento único altamente preferente de administración implica directamente la inyección del ADN de plásmido que contiene la quimera de PCV1-2 en el cerdo por vía intramuscular, intradérmica, intralinfoide, *etc.*

20 Cuando se administra en forma de líquido, la presente vacuna se puede preparar en la forma de una solución acuosa, jarabe, un elixir, una tintura y similares. Tales formulaciones son conocidas en la técnica y típicamente se preparan mediante disolución del antígeno y otros aditivos típicos en los sistemas de vehículo o disolvente apropiados. Los vehículos o disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, etanol, etilen glicol, glicerol, *etc.* Los aditivos típicos son, por ejemplo, tintes certificados, aromas, edulcorantes y conservantes antimicrobianos tal como timerosal (etilmercuritiosalicilato de sodio). Tales soluciones pueden estar estabilizadas, por ejemplo, mediante adición de gelatina parcialmente hidrolizada, sorbitol o medio de cultivo de células, y pueden estar tamponadas mediante procedimientos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como fosfato ácido de sodio, fosfato diácido de sodio, fosfato ácido de potasio, fosfato diácido de sodio, una de sus mezclas, y similares.

Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión y emulsión y en combinación con otros co-formulantes. Estos tipos de formulaciones líquidas se pueden preparar mediante procedimientos convencionales. Las suspensiones, por ejemplo, se pueden preparar usando un molino coloidal. Las emulsiones, por ejemplo, se pueden preparar usando un homogeneizador.

30 Las formulaciones parenterales, diseñadas para inyección en sistemas de fluidos corporales, requieren isotonicidad apropiada y tamponación de pH con los niveles correspondientes de fluidos corporales porcinos. La isotonicidad se puede ajustar de manera apropiada con cloruro de sodio y otras sales según sea necesario. Los disolventes adecuados, tales como etanol o propilen glicol, se pueden usar para incrementar la solubilidad de los ingredientes en la formulación y la estabilidad de la preparación líquida. Los aditivos adicionales que se pueden emplear en la vacuna presente incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales tales como ácido etilen diamino tetra acético (EDTA). Las formas de dosificación parenteral también se pueden esterilizar antes del uso.

40 Un procedimiento de preparación de una molécula de ácido nucleico quimérico de PCV1-2 infeccioso no patógeno comprende la eliminación de un gen del marco abierto de lectura 2 (ORF2) de una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV1 infeccioso no patógeno, reemplazando la misma posición con un gen de ORF inmunogénico de molécula de ácido nucleico que codifica un PCV2 infeccioso patógeno, y recuperación de la molécula de ácido nucleico quimérico. La molécula de ácido nucleico es típicamente ADN. De este modo, el procedimiento reemplaza el gen de ORF2 del ADN de PCV1 no patógeno con el gen de la cápsida de ORF2 inmunogénico del ADN molecular patógeno de PCV2 descrito en el presente documento. Se contempla que otras posiciones de ORF o sus fragmentos inmunogénicos se pueden intercambiar entre el ADN de PCV1 y PCV2 para construir los clones de ADN quimérico infeccioso de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

50 La molécula de ácido nucleico recombinante se usa después para construir el virus quimérico vivo, infeccioso, de replicación de la presente invención que ventajosamente retiene la naturaleza no patógena de PCV1, incluso expresa la proteína de ORF2 inmunogénica del PCV2 patógeno y provoca una completa respuesta inmune contra el PCV2 patógeno. Deseablemente, el clon de ADN de PCV1-2 sirve como una vacuna no virulenta modificada por ingeniería genética, viva, contra la infección con PCV2 y PMWS en cerdos.

55 Un clon de ADN de PCV2 infeccioso se construye, como se describe en el presente documento, de manera que una reserva de virus infeccioso biológicamente pura y homogénea se pueda generar para estudios de patogénesis y el desarrollo de vacunas no patógenas quiméricas. El curso de la enfermedad clínica, distribución de virus y lesiones patológicas asociadas a infección por PCV2 están caracterizadas definitivamente por el uso de este clon de ADN molecular y una reserva de virus PCV2 infeccioso biológicamente pura y homogénea derivada del clon de ADN molecular que se han observado en el pasado, que se presta él mismo al desarrollo de los productos de vacuna deseados de la presente invención.

El clon molecular de PCV2 se genera ligando dos copias del genoma de PCV2 completo en tándem en el vector

pSK. En brusco contraste con el genoma de única copia divulgada en la técnica, el clon de PCV2 de ADN infeccioso hecho mediante los procedimientos descritos en el presente documento contiene dos copias completas de genoma de PCV2 ligadas completamente en repetición en tándem. Ligando dos copias de genoma en tándem proporciona un genoma similar circular que imita al genoma circular usual circular de PCV2. La ventaja de tener dos copias del genoma en tándem en el clon de PCV2 de ADN infeccioso es ser capaz de maximizar la replicación cuando el clon de ADN infeccioso se transfecta *in vitro* e *in vivo*. De este modo, el clon funciona más eficientemente y eficazmente que el genoma de una sola copia anterior.

La infección de animales con el clon viral molecular es extremadamente útil para estudiar los determinantes genéticos de replicación viral y virulencia en el huésped. El circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) se ha incriminado como el agente causante del síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS). PMWS es un síndrome de enfermedad complejo en cerdo y múltiples factores están implicados en la presentación clínica de PMWS. Sin embargo, la dificultad en producir una forma de PCV2 biológicamente pura debido a la presencia de otros agentes porcinos comunes en los homogenatos de tejidos de cerdos enfermos ha impedido una caracterización definitiva de la enfermedad clínica y lesiones patológicas solamente atribuibles a infección por PCV2. Esta es la primera vez que un clon de ADN molecular infeccioso de PCV2 se ha construido y usado para caracterizar la enfermedad y lesiones patológicas asociadas a infección por PCV2 mediante transfección directa *in vivo* de cerdos con el clon molecular.

La reserva de virus vivo homogénea de PCV2 derivado del clon molecular se muestra que es infecciosa *in vitro* cuando se transfecta en células PK-15. El ADN genómico de PCV2 clonado es también infeccioso cuando se inyecta directamente en los hígados y ganglios linfáticos ilíacos superficiales de cerdos sin patógenos específicos (SPF). Los animales inyectados con el ADN de plásmido de PCV2 desarrollan una infección y enfermedad que se parecen a las inducidas por inoculación intranasal con una reserva de virus vivo homogénea de PCV2 infeccioso. La seroconversión a anticuerpo específico de PCV2 se detecta en la mayoría de cerdos de los grupos inoculados a los 35 días después de la inoculación (DPI).

La aparición y duración de viremia en cerdos inoculados con el clon de ADN de PCV1-2 quimérico son similares a las de los cerdos inoculados con el clon de ADN de PCV1 no patógeno, mientras que la viremia en cerdos inoculados con el clon de PCV2 aparece antes y dura más tiempo. Comenzando el 14 DPI y durando aproximadamente 2 - 4 semanas, la viremia se detecta en la mayoría de los animales inoculados con PCV2. De manera similar, la mayoría de los cerdos inoculados a los que se les practicó necropsia el 35 DPI se seroconvirtieron a anticuerpos PCV2. El antígeno de PCV2 se detecta en diversos tejidos y órganos en cerdos inoculados. Las lesiones macroscópicas se limitan a los pulmones y ganglios linfáticos, y se caracterizan por ganglios linfáticos sistemáticamente coloreados de color castaño agrandados, los pulmones que no se pliegan, y focos que están coloreados por múltiples focos de color castaño suave de consolidación. Las lesiones macroscópicas que afectan a los ganglios linfáticos en tanto los cerdos inoculados con PCV1 no patógeno como el PCV1-2 quimérico son suaves y se limitan a solamente unos pocos animales, mientras que los cerdos inoculados con PCV2 todos tienen inflamación moderada a grave y decoloración de tejidos linfoides (Tabla 9, más adelante). El análisis estadístico revela que las puntuaciones de las lesiones macroscópicas en los ganglios linfáticos de los animales inoculados con PCV1-2 quimérico son similares a las de en cerdos inoculados con PCV1 no patógeno. En 21 DPI, cerdos inoculados con PCV2 tienen lesiones macroscópicas que son estadísticamente más graves que las de los cerdos inoculados con PCV1 y el PCV1-2 quimérico. Las lesiones histopatológicas y antígeno específico de PCV2 se detectan en numerosos tejidos y órganos que incluyen, pulmón, corazón, riñón, tonsila, ganglios linfáticos, bazo, íleo e hígado de los cerdos inoculados (infectados). Las lesiones histopatológicas en tejidos múltiples y órganos similares a los de PMWS se reproducen con el clon de ADN de PCV2 molecular así como con el virus infeccioso preparado *in vitro* a partir de del clon de ADN molecular. Microscópicamente, en tanto 21 como 49 DPI, animales inoculados con PCV1-2 quimérico tienen estadísticamente menos lesiones microscópicas que los animales inoculados con PCV2. Las puntuaciones de lesiones microscópicas en ganglios linfáticos de los cerdos inoculados con PCV1-2 quimérico son similares a las del PCV1 no patógeno, el PCV2-1 quimérico recíproco y los animales control no inoculados. Las lesiones moderadas a graves microscópicas se encuentran en múltiples tejidos de animales inoculados con PCV2 patógeno incluyendo pulmón, hígado, linfoide, bazo, cerebro, corazón, riñón y tejido de tonsila. Sin embargo, en animales inoculados con PCV1-2 quimérico, las lesiones microscópicas suaves a moderadas se limitan solamente a hígado, ganglios linfáticos y tejidos de riñón (véase la Tabla 10, más adelante).

No existen signos clínicos notables de PMWS en el control o cualquiera de los cerdos inoculados. Aunque los síntomas clínicos característicos de PMWS no se observan en el ADN de plásmido de PCV2 clonado (el clon de ADN de PCV2 infeccioso) o con una reserva biológicamente pura de virus PCV2 infeccioso, PCV2 es claramente responsable de las lesiones histopatológicas de tipo PMWS reproducidos en los ejemplos ilustrativos más adelante. En general se cree que PCV2 es el principal pero no el único agente patógeno responsable de la aparición de PMWS clínico.

Esta memoria descriptiva permite una caracterización más definitiva del curso clínico y lesiones patológicas exclusivamente atribuibles a infección por PCV2. Los datos actuales en los ejemplos ilustrativos más adelante indican que el ADN genómico fácilmente reproducido, clonado de PCV2 está disponible para reemplazar el virus infeccioso para los estudios de patogénesis e inmunización de PCV2. Mientras que PCV2 se muestra como esencial para el desarrollo de PMWS, otros factores o agentes tales como PRRSV, PPV, etc. Se pueden requerir para inducir

el espectro completo de signos clínicos y lesiones asociadas a los casos avanzados de PMWS. Sin embargo, con el conocimiento de que PCV2 es un factor clave, el clon viral novedoso infeccioso, de replicación de la presente invención se puede después modificar o modificar por ingeniería genética para lograr el efecto inmunogénico óptimo deseado mediante los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica en inmunología y genética molecular.

5 La disponibilidad del clon de ADN infeccioso de PCV2 descrita en el presente documento hace posible desarrollar la vacuna atenuada modificada por ingeniería genética para prevenir la infección por PCV2 y PMWS en cerdos. Se sabe que PCV2 se replica en los ganglios linfáticos, pulmones e hígado durante la infección natural, y uno de los principales efectos patógenos es la alteración del sistema inmune mediante degradación de las estructuras linfoides (S. Krakowka *et al.*, 2001, *supra*; G. M. Allan y J. A. Ellis, 2000, *supra*; S. Kennedy *et al.*, 2000, *supra*; G. J. Wellenberg *et al.*, 2000, *supra*; G. M. Allan *et al.*, "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," J. Comp. Pathol. 121: 1 - 11 (1999); J. Ellis *et al.*, "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets," J. Vet. Diagn. Invest. 11: 3 - 14 (1999); J. C. Harding y E.G. Clark, 1997, *supra*). Mediante el uso de este clon de ADN molecular infeccioso de PCV2, la enfermedad clínica, lesiones patológicas y distribución de virus exclusivamente atribuibles a infección por PCV2 están más caracterizadas definitivamente.

Las relaciones estructurales y funcionales de los genes de PCV se entienden mejor debido a la disponibilidad de los clones de ADN infeccioso de PCV2, PCV1, PCV1-2 quimérico, y PCV2-1 quimérico descritos en el presente documento. Will *et al.*, "Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees," Nature 299: 740 - 742 (1982), primero demostraron la factibilidad de usar un virus ADN de virus de hepatitis B clonado para infectar chimpancés mediante inyección directa *in vivo*. Este planteamiento se ha usado desde entonces para estudiar la replicación viral y la patogénesis de varios otros virus (T. W. Dubensky *et al.*, "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7529 - 7533 (1984); R Girones *et al.*, "Complete nucleotide sequence of a molecular clone of woodchuck hepatitis virus that is infectious in the natural host," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1846 - 1849 (1989); N. L. Letvin *et al.*, "Risks of handling HIV," Nature 349: 573 35 (1991); C. Seeger *et al.*, "The cloned genome of ground squirrel hepatitis virus is infectious in the animal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 5849 - 5852 (1984); E. E. Sparger *et al.*, "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," Virology 238: 157 - 160 (1997); R Sprengel *et al.*, "Homologous recombination between hepadnaviral genomes following *in vivo* DNA transfection: implications for studies of viral infectivity," Virology 159: 454 - 456 (1987); H. Will *et al.*, 1982, *supra*; L. Willems *et al.*, "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," Virology 189: 775 - 777 (1992)).

La construcción de un clon de ADN molecular de PCV2 infeccioso, y la demostración de la infección por inyección directa de ADN de plásmido de PCV2 en el hígado y ganglios linfáticos de cerdos son ventajosas para estudios de PCV2. Este sistema de transfección *in vivo* potenciará el estudio de la relación estructural y funcional de los genes de PCV2 usando plásmidos recombinantes construidos *in vitro* para ensayar diferentes regiones o genes de PCV2 para sus papeles en la replicación y patogénesis del virus en el huésped. La replicación y patogénesis de PCV2 se puede estudiar *in vivo* sin tener que producir reservas de virus infecciosos mediante propagación de PCV2 en cultivos de células. Esto es ventajoso ya que los pases de cultivo de células en serie se pueden seleccionar para variantes virales. Otra ventaja de uso de ADN genómico de PCV2, en lugar de virus vivo, para estudios animales es relativamente fácil para la cuantificación de la dosis de inoculación. La cantidad del ADN de PCV2 clonado usado para inoculación animal se puede determinar fácilmente mediante un espectrofotómetro, mientras que la dosis de virus de PCV2 vivo requiere la titulación de la infectividad en cultivos de células y confirmación de infección por IFA. La inyección directa de animales con ADN de plásmido de PCV2 clonado elimina los problemas asociados a la presencia de otros agentes porcinos indígenas en inóculos de homogenatos de tejido en estudios animales.

En la presente invención, el gen de la cápsida de ORF2 inmunogénico se desvía entre el PCV2 patógeno y el PCV1 no patógeno para producir la única estructura del clon de ADN infeccioso de PCV1-2 quimérico infeccioso. Sorprendentemente y ventajosamente, el clon infeccioso de PCV1-2 quimérico replicado, expresó el antígeno de la cápsida de ORF2 inmunogénico *in vitro* e *in vivo*, e indujo una respuesta de anticuerpo específica contra ORF2 de PCV2 pero mantuvo la naturaleza no patógena de PCV1. El clon de ADN infeccioso de PCV1-2 quimérico tiene la capacidad de inducir una fuerte respuesta inmune contra PCV2 mientras que induce solamente una infección limitada con lesiones patológicas suaves similares a la del PCV1 no patógeno. Para el desarrollo de vacuna, el almacenaje y estabilidad relativamente fácil de ADN clonado, y la economía de ADN de plásmido de PCV2 recombinante a gran escala y producción del clon de ADN de PCV1-2 quimérico proporciona un medio atractivo de distribución de una vacuna de ADN viral viva, infecciosa o vacunas virales modificadas por ingeniería genética, atenuadas a cerdos. Por lo tanto, el clon de ADN de PCV1-2 infeccioso quimérico enseñado en esta invención es un candidato de vacuna útil contra infección con PCV2 y PMWS.

Debe apreciarse que todos los términos científicos y tecnológicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica. Para los propósitos de esta invención, el término "infeccioso" significa que el virus se replica en cerdos, independientemente de si o no el virus provoca cualesquiera enfermedades. "SPF" se refiere a cerdos sin patógenos específicos. Los cerdos "gnotobióticos" quieren decir cerdos sin gérmenes. Los términos "ADN de plásmido de PCV2," "ADN genómico de PCV2" y "ADN de PCV2 molecular" se usan indistintamente para referirse a la misma secuencia de nucleótidos clonada.

El clon de ADN quimérico de PCV1/PCV2 (designación de cepa "quimera de PCV1-2"), clon de ADN molecular de PCV2 infeccioso (designación de cepa "clon de PCV2") y la reserva de PCV2 biológicamente pura y homogénea derivada de una muestra Iowa de PCV2 que se ha aislado de un cerdo con PMWS grave e identificado como número de aislamiento 40895 (designación de cepa "PCV2 n° 40895") se depositan en las condiciones asignadas por mandato por 37 C.F.R. § 1.808 y mantenidas siguiendo el Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 Universidad Boulevard, Manassas, Virginia 20110 - 2209, Estados Unidos. Las secuencias de ADN descritas en el presente documento están contenidas dentro de los plásmidos de 6.490 pares de bases clonados en el vector pBluescript SK(+) (pSK) (Stratagene Inc., La Jolla, CA) y transformado en células competentes de *Escherichia coli* DH5a. Los plásmidos que contienen el clon de ADN de PCV1-2 quimérico infeccioso (identificado como "clon de ADN infeccioso de circovirus porcino quimérico Tipo 1 (PCV1) y Tipo 2 (PCV2)") y el clon de ADN molecular infeccioso de PCV2 (identificado como "clon de ADN infeccioso de circovirus porcino Tipo 2 (PCV2)") se han depositado en la ATCC el 7 de diciembre de 2001 y se han asignado Designación de Depósito de Patente de ATCC PTA-3912 y PTA-3913, respectivamente. Se debe apreciar que otros plásmidos se pueden construir fácilmente usando la mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas descritas en el presente documento. La muestra de PCV2 biológicamente pura y homogénea de número de aislamiento 40895 (identificada como "circovirus porcino de Tipo 2 (PCV2)") también se ha depositado en la ATCC el 7 de diciembre de 2001 y se ha asignado Designación de Depósito de Patente ATCC PTA-3914. La secuencia genómica de (nucleótidos) del número de aislamiento de PCV2 40895 se ha depositado con la base de datos de Genbank y está disponible públicamente desde el 23 de julio de 2000 con el número de acceso AF264042.

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. Sin embargo, se debe entender que estos ejemplos son para ilustración solamente y no tienen la intención de ser definitivos completamente según las condiciones y ámbito de esta invención. Se debe apreciar que cuando las condiciones de reacción típicas (*por ejemplo*, temperatura, tiempos de reacción, etc.) se han proporcionado, tanto las condiciones anteriores como más adelante los intervalos especificados también se pueden usar aunque en general de manera menos conveniente. Los ejemplos se llevan a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 23° aproximadamente 28°C) y a presión atmosférica. Todas las partes y los porcentajes mencionados en el presente documento están en base de peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados salvo que se especifique de otra manera.

Un entendimiento adicional de la invención se puede obtener a partir de los ejemplos no limitantes que siguen a continuación:

### 30 **Ejemplo 1**

#### **Generación de una línea de células PK-15 sin contaminación de PCV1**

La fuente del aislamiento de PCV2 era a partir de una muestra de tejido de bazo de un cerdo con PMWS de origen natural (número de identificación de serie PCV2 40895, denominado "aislamiento 40895") (M. Fenaux *et al.*, 2000, *supra*). Tinción inmunohistoquímica (IHC) con anticuerpo específico de PCV2 confirmó la presencia de antígeno de PCV2 en el tejido. Los tejidos de bazo se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La línea de células PK-15 comprada en la Colección Americana de Cultivos Tipo (número de acceso de ATCC CCL-33) se infectó de manera permanente con PCV1 (G. C. Dulac y A. Afshar, 1989, *supra*). Ya que solamente una subpoblación de células PK-15 estaba infectada de manera persistente (*id.*), se generó una línea de células PK-15 que está libre de contaminación por PCV1 mediante dilución de punto final. El protocolo procedió como sigue: células PK-15 se desarrollaron en MEM con sales de Earle y L- glutamina (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) y 1X antibiótico (Life Technologies, Inc.). Se triptinizaron monocapas de células confluentes, y después las células se contaron y se diluyeron en serie hasta un punto final con una célula por 0,2 ml. La dilución de punto final se sembró en placas de 96 pocillos y se dejó crecer en una monocapa partiendo de una única célula. Las células de cada pocillo se ensayaron para determinar ADN de PCV1 usando un ensayo de PCR- RFLP capaz de detectar y diferenciar PCV1 y PCV2 (M. Fenaux *et al.*, 2000, *supra*). Células PK-15 que después se probó que eran negativas para PCV1 mediante el ensayo de PCR-RFLP se expandieron posteriormente. La línea de células PK-15 sin PCV1 se subcultivó con cinco pases adicionales y se encontró que era negativa para el ADN de PCV1 mediante PCR en cada pasaje.

Cuatro líneas celulares que eran negativas para contaminación por PCV1 se produjeron mediante dilución hasta el punto final de las células PK-15 de ATCC. Las líneas de células permanecieron negativas para PCV1 mediante PCR después de cinco pases adicionales. Una de las líneas celulares se expandió posteriormente y se mostró que era capaz de soportar la replicación de PCV2 cuando las células se transfectaron con clon de ADN de PCV2 molecular (Fig. 2) y se infectaron con virus de PCV2. Las células clonadas se usaron adicionalmente para la transfección *in vitro* de clon de ADN de PCV2 molecular para generar una reserva de virus infeccioso de PCV2 biológicamente pura para el experimento de inoculación animal.

### **Ejemplo 2**

#### **Construcción del clon de ADN infeccioso de PCV2**

Para construir un clon de ADN molecular de PCV2, se diseñó un par de cebadores de PCR de acuerdo con la secuencia publicada del aislamiento 40895 de PCV2 (M. Fenaux *et al.*, 2000, *supra*): cebador directo F-PCVSAC2 (5'- GAACCGCGGGCTGGCTGAACTTTTAAAAGT-3'), establecido en la SEC ID N°:5, y cebador inverso R-PCVSAC2 (5'-GCACCGCGGAAATTTCTGACAAACGTIACA-3'), establecido en la SEC ID N°:6. Este par de cebadores amplifica el genoma completo de PCV2 con una región de superposición que contiene en único sitio de enzima de restricción SacII (Fig. 1). ADN usando el minikit QIAamp ADN (Qiagen, Inc., Valencia, CA) de una muestra de tejido de bazo de un cerdo con PMWS de origen natural (aislamiento 40895) (M. Fenaux *et al.*, 2000, *supra*). El ADN se amplificó mediante PCR con AmpliTaq Gold polimerasa (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). La reacción de PCR constaba de una etapa de activación de enzima inicial a 95°C durante 9 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 48°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 3 min, y una extensión final a 72°C durante 7 min. El producto de PCR de tamaño esperado se separó mediante electroforesis en gel y se purificó con el procedimiento de polvo de cristal con un Kit GeneClean Kit (Bio 101, Inc., La Jolla, CA).

Para construir un clon de ADN molecular que contiene un dímero tándem de genoma de PCV2, el producto de PCR que contiene el genoma completo de PCV2 se ligó primero en el vector de plásmido advanTAge (Clontech, Palo Alto, CA). Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los plásmidos recombinantes se verificaron mediante digestión con enzima de restricción. El ADN genómico de PCV2 de longitud completa se escindió del vector advanTAge mediante digestión con la enzima de restricción SacII. El ADN genómico de PCV2 digerido se ligó con ADN ligasa de T4 a 37°C durante solamente 10 min, que favorece la producción de dímeros en tándem. Los dímeros en tándem se clonaron posteriormente en el vector pBluescript SK(+) (pSK) (Stratagene Inc., La Jolla, CA) (Fig. 1). Los plásmidos recombinantes que contienen dímeros en tándem del genoma de PCV2 (denominado en el presente documento clon de ADN molecular de PCV2) se confirmaron mediante digestión con enzima de restricción de PCR, y secuenciación de ADN. La concentración de ADN de los plásmidos recombinantes se determinó espectrofotométricamente.

De manera específica, el genoma completo de PCV2 (aislamiento 40895) se amplificó mediante PCR para construir el clon de ADN molecular de PCV2 infeccioso. Dos copias del genoma de PCV2 completo se ligaron en tándem en el vector pSK para producir el clon de ADN molecular de PCV2 (Fig. 1). La infectividad del clon de ADN molecular de PCV2 se determinó mediante transfección *in vitro* de las células PK-15. IFA con anticuerpo específico de PCV2 confirmó que el clon de ADN molecular es infeccioso *in vitro* y que aproximadamente 10 - 15% de las células PK-15 se transfectaron. El antígeno específico de PCV2 se visualizó mediante IFA en el núcleo, y hasta un menor grado, citoplasma de las células transfectadas (Fig. 2). Las células transfectadas de manera simulada con el vector pSK vacío permanecieron negativas para antígeno de PCV2.

### Ejemplo 3

#### Transfección *In Vitro* con el Clon de ADN Molecular de PCV2 y Generación de una Reserva de Virus Infeccioso de PCV2 Biológicamente Pura y Homogénea

Para ensayar la infectividad del clon de ADN molecular *in vitro*, células PK-15 sin contaminación de PCV1 se desarrollaron en portaobjetos de cámara LabTek de 8 pocillos. Cuando las células PK-15 alcanzaron aproximadamente el 85% de confluencia, las células se transfectaron con el clon de ADN molecular usando reactivos Lipofectamine Plus de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante (Life Technologies, Inc). Las células transfectadas de manera simulada con vector pSK vacío se incluyeron como controles. Tres días después de la transfección, las células se fijaron con una solución que contenía 80% de acetona y 20% de metanol a 4° C durante 20 min., y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia usando un antisuero policlonal de conejo específico de PCV2 para determinar la infectividad *in vitro* del clon de ADN molecular (véase más adelante).

Para generar una de virus infeccioso biológicamente pura y homogénea de PCV2 para el experimento de inoculación animal, células PK-15 sin contaminación de PCV1 se cultivaron en matraces de cultivo T-25 y se transfectaron con clon de ADN molecular de PCV2. Células PK-15 se desarrollaron hasta un 85% de confluencia en matraces T-25. Las células se lavaron una vez con tampón PBS estéril antes de transfección. Para cada reacción de transfección en un matraz T-25, 12  $\mu$ g del ADN de plásmido de PCV2 se mezclaron con 16  $\mu$ l de Reactivo Plus en 0,35 ml de medio MEM. Un matraz de células transfectadas de manera simulada con el vector pSK vacío se incluyó como control negativo. Después de incubación a temperatura ambiente durante 15 min., se añadieron 50  $\mu$ l de Reactivo Lipofectamine diluido en 0,35 ml de medio MEM a la mezcla y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 15 min. La mezcla de transfección después se añadió a un matraz T-25 de células PK-15 que contenía 2,5 ml de MEM reciente. Después de incubación a 37° C durante 3 horas, el medio se reemplazó con medio MEM reciente que contenía 2 % de FBS y 1 X antibióticos. Las células transfectadas se recogieron a los 3 días después de la transfección y se almacenaron a - 80° C hasta uso. La titulación infecciosa de reserva de virus se determinó mediante IFA (véase más adelante).

Básicamente, reserva de virus infeccioso biológicamente pura y homogénea de PCV2 se generó mediante transfección de células PK15 con el clon de ADN molecular de PCV2. Los viriones PCV2 producidos mediante transfección *in vitro* eran infecciosos ya que los lisados de células transfectadas se usaron exitosamente para infectar las células PK-15. De este modo, el clon de ADN molecular de PCV2 es capaz de producir viriones de PCV2 infeccioso cuando se transfectan *in vitro*. La titulación infecciosa de la reserva de virus de PCV2 homogénea

preparada a partir de células transfectadas se determinó que era  $1 \times 10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Esta reserva de virus se usó para inocular cerdos en el Grupo 2. Los lisados de las células transfectadas de manera simulada con el vector pSK vacío eran incapaces de infectar las células PK-15.

#### Ejemplo 4

##### 5 Titulación de virus mediante ensayo de Inmunofluorescencia (IFA)

Para determinar la titulación infecciosa de la reserva de virus de PCV2 homogénea, células PK-15 se cultivaron sobre portaobjetos de cámara LabTek de 8 pocillos. La reserva de virus se diluyó en serie 10 veces en MEM, y cada dilución se inoculó en 10 pocillos de las monocapas de las células PK-15 que se desarrollan en portaobjetos de cámara LabTek. Los pocillos de las células no inoculadas se incluyeron como controles. Las células infectadas se fijaron a los 3 días después de la inoculación con una solución que contenía 80% de acetona y 20% de metanol a 4°C durante 20 min. Después de lavar las células con tampón PBS, las células infectadas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo específico de PCV2 diluido a 1:1.000 (S. D. Sorden et al., "Development of a polyclonal-antibody based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue," J. Vet. Diagn. Invest. 11: 528 - 530 (1999)) a 37°C durante 1 hora. Las células después se lavaron tres veces con tampón PBS, y se incubaron con una IgG secundaria anti conejo de cabra marcada con FITC (Laboratorios Kirkegaard y Perry Inc, Gaithersburg, MD) a 37°C durante 45 min. Después de lavar los portaobjetos tres veces con tampón PBS, y los portaobjetos se montaron con fluoromount-G, con cubreobjetos y se examinaron en un microscopio de fluorescencia. Se calculó la dosis infecciosa de cultivo de tejidos al 50% por ml (TCID<sub>50</sub>/ml). Inicialmente, las células se transfectaron con una construcción de plásmido que contenía una única copia de genoma de PCV2 pero la titulación del PCV2 infeccioso de la única construcción de genoma es mucho menor que la que contiene el genoma en tándem. Por lo tanto, la construcción de plásmido que contiene la forma quimérica del genoma de PCV2 se usó para los experimentos de transfección *in vitro* e *in vivo*.

#### Ejemplo 5

##### 25 Transfección *In Vivo* de Cerdos con el clon de ADN molecular de PCV2 e Inoculación Experimental de Cerdos con la reserva de virus infeccioso de PCV2 homogénea

Cuarenta cerdos de 4 semanas de edad sin patógenos específicos (SPF) se asignaron de manera aleatoria en 4 habitaciones de 10 animales cada una. Antes de la inoculación, los cerdos SPF se ensayaron para determinar anticuerpos para PCV, PRRSV, PPV y virus de hepatitis E de cerdo. Los cerdos en el Grupo 1 estaban no inoculados y servían como controles negativos. Cerdos en el Grupo 2 se inocularon cada uno de ellos por vía intranasal con aproximadamente  $1,9 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub> de la reserva de virus infeccioso de PCV2 derivada del clon de ADN molecular de PCV2. Cerdos en el Grupo 3 recibieron inyección intrahepática directa del ADN de plásmido recombinante de PCV2. Cada cerdo se inyectó con un total de 200 µg de ADN de plásmido recombinante (el ADN de plásmido de PCV2 clonado), mediante una técnica guiada por ultrasonidos, en 6 sitios diferentes de hígado. Cerdos en el Grupo 4 cada uno de ellos se inyectó con un total de 200 µg del ADN de plásmido recombinante de PCV2 directamente en los ganglios linfáticos ilíacos superficiales, y cada ganglio linfático recibió dos inyecciones separadas. Los animales se controlaron diariamente para detectar signos clínicos de enfermedad. Se recogieron muestras de suero de cada animal en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 después de la inoculación (DPI). El 21 DPI, cinco cerdos se seleccionaron al azar de cada grupo y se les hizo necropsia. A los cinco animales restantes en cada grupo se les practicó necropsia el 35 DPI. Se recogieron diversos tejidos y órganos durante la necropsia y se procesaron para examen histológico y tinción inmunohistoquímica (véase más adelante).

Los resultados se muestran en la Tabla 1 más adelante. Todos los cerdos inoculados de los Grupos 2, 3 y 4 eran negativos para anticuerpos de PCV2 el 0 DPI. Dos cerdos en el Grupo 1 de control no inoculado tenían anticuerpo materno de PCV2 detectable el 0 DPI. El anticuerpo materno en estos dos lechones disminuyó el 7 DPI. No se detectó seroconversión a anticuerpo PCV2 en cualquiera de los 10 cerdos de control inoculados. En el Grupo 2 cerdos inoculados por vía intranasal con virus PCV2 infeccioso, 1 lechón seroconvertido a anticuerpo de PCV2 el 21 DPI. El 35 DPI, 4 de los 5 cerdos del Grupo 2 restantes se habían seroconvertido. La seroconversión en animales transfectados de los Grupos 3 y 4 primero aparecieron el 28 DPI. El 35 DPI, 5 de 5 los cerdos restantes del Grupo 3 y 3 de los 5 cerdos restantes del Grupo 4 se habían seroconvertido a anticuerpo de PCV2.

Los anticuerpos de PPV se ensayaron los 3 y 21 DPI para todos los cerdos, y el 35 DPI para los cerdos restantes. Los anticuerpos maternos para el PPV de agente de cerdo ubicuo se detectaron en los lechones SPF. Las valoraciones de los anticuerpos de PPV HI en todos los lechones excepto uno disminuyeron significativamente a partir del 3 DPI (una titulación media de 1:2.665) para el 21 DPI (una titulación media de 1:246), que indica que el anticuerpo detectado en estos lechones se derivó de manera pasiva. Un lechón tenía un ligero incremento de la titulación de PPV HI desde 1:32 a 3 DPI a 1:64 el 21 DPI, que es probable que se deba a la variación del ensayo. Muestras de suero recogidas de todos los cerdos en 0, 21, y 35 DPI se ensayaron después para detectar ADN de PPV con un ensayo publicado de PCR (J. M. Soucie et al., "Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate: C porcine factor VIII concentrate," Transfusion 40: 708 - 711 (2000)). No se detectó viremia de PPV de ningún cerdo en cualquier DPI, indicando además que los cerdos no estaban infectados por PPV.

Tabla 1. Seroconversión a anticuerpos específicos de PCV2 en cerdos inoculados con Virus vivo de PCV2 o directamente inyectados con ADN de plásmido de PCV2 clonado

Grupo	Inóculo	Vía de inoculación	Días después de inoculación					
			0	7	14	21	28	35
1	Ninguno		2/10 <sup>a</sup>	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5
2	Virus PCV2 vivo <sup>b</sup>	Intranasal	0/10	0/10	0/10	1/10	1/5	4/5
3	ADN de PCV2 <sup>c</sup>	Intrahepático	0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	5/5
4	ADN de PCV2 <sup>c</sup>	Intralinfoide	0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	3/5

<sup>a</sup> Anticuerpo PCV2 se midió con un ELISA, número de positivos/ número ensayado.

5 <sup>b</sup> Una reserva de virus PCV2 biológicamente pura y homogénea generada mediante transfección de células PK-15 con clon de ADN molecular de PCV2.

<sup>c</sup> ADN genómico de PCV2 clonado en plásmido pSK.

### Ejemplo 6

#### Análisis de PCR-RFLP

10 Para medir la viremia de PCV2 en cerdos transfectados con el clon de ADN molecular de PCV2 y en cerdos infectados con reserva de virus infeccioso de PCV2, muestras de suero recogidas en diferentes DPI se ensayaron para determinar la presencia de ADN de PCV2 mediante los procedimientos generales de un ensayo de PCR-RFLP descrito previamente (M. Fenaux *et al.*, 2000, *supra*). ADN viral se extrajo a partir de 50 µl de cada muestra de suero usando el reactivo DNAzol® de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante (Molecular Research Center, Cincinnati, OH). El ADN extraído se volvió a suspender en agua sin ADNasa-, ARNasa-, y proteinasa y se ensayó para determinar el ADN de PCV2 mediante PCR-RFLP (*id.*). Los productos de PCR de animales seleccionados se secuenciaron para verificar el origen de los cerdos infectados con virus.

20 Se recogieron muestras de suero de todos los animales control e inoculados a 0, 7, 14, 21, 28, y 35 DPI y se ensayaron para determinar la viremia de PCV2 mediante detección de ADN de PCV2 (*id.*). Los resultados se muestran en la Tabla 2 más adelante. No se detectó ADN de PCV2 en el Grupo 1 de cerdos de control no inoculados en cualquier DPI. Viremia se detectó en 7/10 cerdos del Grupo 2 en 14 DPI y 8/10 en 35 DPI. Viremia duró solamente una pocas semanas ya que el ADN de PCV2 no era detectable en 28 DPI y 35 DPI en los 5 cerdos restantes del Grupo 2. En el Grupo 3 los cerdos que se inyectaron por vía hepática con el clon de ADN molecular de PCV2, 8/10 cerdos eran virémicos el 14 DPI, y 9/10 cerdos tenían viremia detectable el 35 DPI. Cerdo del grupo 4 se inyectaron con el clon de ADN molecular de PCV2 en los ganglios linfáticos. Dos de 10 cerdos el 14 DPI y 8 de 10 cerdos el 21 DPI del Grupo 4 eran virémicos. Los resultados muestran que el clon de ADN molecular de PCV2 es infeccioso cuando se inyecta directamente en el hígado y ganglios linfáticos ilíacos superficiales de cerdos SPF. Los productos de PCR amplificados a partir de animales seleccionados se secuenciaron. La secuencia de los productos de PCR amplificados a partir de animales seleccionados era idéntica a la región correspondiente del clon de ADN molecular de PCV2.

Tabla 2. Detección de Viremia (ADN de PCV2) por PCR en suero de Cerdos inoculados y de Control

Grupo	Inóculo	Vía de inoculación	Días después de inoculación						Total
			0	7	14	21	28	35	
1	Ninguno		0/10 <sup>a</sup>	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/10
2	Virus PCV2 vivo <sup>b</sup>	Intranasal	0/10	0/10	7/10	5/10	0/5	0/5	8/10
3	ADN de PCV2 <sup>c</sup>	Intrahepático	0/10	0/10	8/10	6/10	3/5	3/5	9/10
4	ADN de PCV2 <sup>c</sup>	Intralinfoide	0/10	0/10	2/10	8/10	2/5	0/5	8/10

<sup>a</sup> 10 cerdos en cada grupo, número de positivos/número ensayados.

35 <sup>b</sup> Una reserva de virus PCV2 biológicamente pura y homogénea generada mediante transfección de células PK-15 con clon de ADN molecular de PCV2.

<sup>c</sup> ADN genómico de PCV2 clonado en plásmido pSK.

### Ejemplo 7

#### Evaluación clínica

Cerdos se pesaron el 0 DPI y en el tiempo de necropsia. Las temperaturas y puntuaciones de la enfermedad respiratoria clínica, que varían entre 0 y 6 (0 = normal, 6 = grave) (P. G. Halbur et al., "Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus," Vet. Pathol. 32: 648 - 660 (1995)), se registraron en días diferentes entre 0 y 35 DPI. Las observaciones clínicas que incluyen evidencia de enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad del hígado (ictericia), enfermedad músculo esquelética, y cambios en la condición del cuerpo, también se registraron diariamente.

Para evaluar la patología e histopatología general, cinco cerdos de cada grupo se seleccionaron al azar para necropsias en 21 y 35 DPI. El equipo de necropsia era ciego para el estado de infección de los cerdos en la necropsia. Se realizaron necropsias completas en todos los cerdos. Un porcentaje estimado del pulmón con neumonía manifiestamente visible se registró para cada cerdo basándose en un sistema de puntuación descrito anteriormente (*id.*). El sistema de puntuación se basa en el volumen aproximado que cada lóbulo de pulmón contribuye al pulmón entero: el lóbulo craneal derecho, lóbulo medio derecho, parte craneal del lóbulo craneal izquierdo, y la parte caudal del lóbulo craneal izquierdo cada uno contribuye al 10% del volumen total del pulmón, el lóbulo accesorio contribuye al 5%, y los lóbulos caudales derecho e izquierdo cada uno de ellos contribuye al 27,5%. Otras lesiones tal como agrandamiento de los ganglios linfáticos se notaron de manera separada. Las secciones para examen histopatológico se tomaron de turbinado nasal, pulmones (siete secciones) (*id.*), corazón, cerebro, ganglios linfáticos (traqueobronquial, iliaco, mesentérico, sublingual), tonsila, timo, hígado, vesícula biliar, bazo, articulaciones, intestino delgado, colon, páncreas, y riñón. Los tejidos se examinaron de una manera ciega y proporcionaron una puntuación subjetiva de la gravedad de lesiones de pulmón, ganglio linfático, e hígado. Las puntuaciones de pulmón variaban entre 0 (normal) a 3 (neumonía intersticial linfocítica grave). Las puntuaciones de hígado variaban entre 0 (normal) y 3 (hepatitis linfocítica grave). Las puntuaciones de los ganglios linfáticos eran para una cantidad estimada de supresión linfocítica de folículos que varía entre 0 (normal o sin supresión linfocítica) a 3 (supresión linfocítica grave y reemplazo histiocítico de folículos).

El protocolo serológico implicado en la recogida de sangre en la llegada los días 11 a 12 de edad, y de todos los cerdos el 0, 7, 14, 21,28, y 35 DPI. Los anticuerpos de suero PRRSV se ensayaron usando Herd Check PRRSV ELISA (IDEXX Laboratorios, Westbrook, MA). Los anticuerpos de suero para PCV2 se detectaron mediante ensayo de hemaglutinación (HI) (H. S. Joo et al., "A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody," Aust. Vet. J. 52: 422 - 424 (1976)). Los anticuerpos de suero para PCV2 se detectaron mediante un ELISA indirecto modificado basado en la proteína ORF2 recombinante de PCV2 (P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV," Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1: 33 - 40 (2002)). Un antígeno de PCV2 parcialmente purificado se preparó a partir de células Hi Five (Invitrogen, Carlsbad, CA) infectadas con baculovirus recombinantes que contenían la proteína de ORF2 de la cápsida principal de PCV2 (P. Nawagitgul et al., "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein," J. Gen. Virol. 81: 2281 - 2287 (2000)). Los lisados de células de Hi Five infectados con baculovirus de tipo salvaje de prepararon de manera similar y sirvieron como antígeno de control negativo. Las placas de microvaloración de poliestireno Immulon 2 HB (Dyner Technologies Inc, Chantilly, VA) se recubrieron con concentraciones óptimas de antígenos positivos y negativos a 4°C durante 36 horas. Cien µl de cada muestra de suero diluida 1:100 en 5% de diluyente de leche (Laboratorios Kirkegaard y Perry, Inc.) se añadió a cada pocillo. Las muestras de suero se ensayaron por cuadruplicado: 2 pocillos para antígeno de control negativo y 2 pocillos paralelos para antígeno de PCV2. El suero de control positivo y control negativo se incluyeron en cada placa. El suero se incubó a 37°C durante 30 min y se lavó después 5 veces con 0,1 M tampón PBS que contenía 0,1% de Tween-20. Una IgG anti cerdo secundaria marcada con peroxidasa (Sigma Co, S1. Louis, MO) se incubó a 37°C durante 30 min. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con 2,2'-azino-di- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (Laboratorios Kirkegaard y Perry Inc) a 37°C durante 15 min. para desarrollo de color. La densidad óptica (DO) se leyó a 405 nm. La DO corregida de cada suero ensayado y de control se calculó restando el valor medio de DO de los pocillos que contenían antígeno negativo de la de los pocillos paralelos que contenían antígeno de PCV2. Los datos se normalizaron dividiendo el valor de DO corregido de una muestra de suero ensayada (S) con la del suero de control positivo (P) y se reseña como relaciones S/P. Las muestras con relaciones S/P ≤ 0,12, 0,12 a 0,2, y > 0,2 se consideraron como negativos, equívocos y positivos, respectivamente.

A partir de los resultados de la evaluación clínica, ninguno de los cerdos control e inoculados mostraron signos obvios de enfermedad que se parecen a PMWS clínico. No existía diferencia en ganancia de peso o temperaturas rectales medias entre cualquiera de los cuatro grupos. Los cerdos control del Grupo 1 permanecieron normales a lo largo del experimento. Se observó enfermedad respiratoria transitoria suave en la mayoría de los cerdos en grupos infectados con virus PCV2 y transfectados con ADN de PCV2 entre 8 y 14 DPI. Esto se caracterizó por disnea suave (puntuaciones respiratorias clínicas 1 a 2) de uno a dos días de duración en cerdos individuales y 5 - 6 días de duración para el grupo.

No se observaron lesiones macroscópicas en los cerdos control en la necropsia. Cerdos en los tres grupos inoculados tenían lesiones macroscópicas limitadas a los pulmones y ganglios linfáticos (véase la tabla 3, más adelante). Las lesiones eran similares entre los cerdos en los grupos transfectados por ADN de plásmido de PCV2 e infectados por virus de PCV2. Los pulmones que no se pliegan y tenían áreas al azar, multifocales, moderadamente bien demarcadas de consolidación tostado a púrpura que implica 0 -2 % del pulmón (Fig. 3) en 21 DPI, y 0 - 13% del pulmón en 35 DPI. Ganglios linfáticos se agrandaron sistemáticamente 2 a 5 veces el tamaño normal, sólido, y

tostado (Fig. 3) a tanto 21 como 35 DPI en la mayoría de los cerdos de los tres grupos inoculados con PCV2.

El examen microscópico no reveló lesiones en ningún tejido de los cerdos control excepto para los hígados. Ocho de diez cerdos control tenían inflamación linfoplasmática multifocal muy suave predominantemente en las regiones periportales del hígado, como se observa comúnmente en cerdos normales y se considera antecedente normal (P. G. Halbur *et al.*, 2001, *supra*).

Cerdos de los dos grupos transfectados con ADN de plásmido de PCV2 (intrahepático e intralinfoide) y el grupo infectado con virus PCV2 (intranasal) tenían lesiones similares en cerebro, pulmón, corazón, riñón, tejidos linfoides (tonsila, ganglios linfáticos, bazo), íleo, e hígado (véase la Tabla 4, más adelante). Se observaron lesiones de cerebro en 23/30 de los cerdos de los tres grupos inoculados y se caracterizaron como meningoencefalitis linfoplasmocítica multifocal suave a moderada con acumulación perivascular y gliosis. Se observaron lesiones pulmonares en 28/30 cerdos inoculados con PCV2 y caracterizados como neumonía peribronquiolar linfoplasmocítica suave a moderada y broncointersticial histiocítica (Fig. 3C). A un cerdo del Grupo 2 infectado con virus PCV2 se le practicó necropsia 21 DPI, y un cerdo de cada uno de los dos grupos transfectados con ADN de plásmido de PCV2 se le practicó necropsia 35 DPI tenían bronquiolitis ulcerosa y proliferativa con fibroplasia e inflamación granulomatosa en la lámina propia y regiones peribronquiales de los bronquios. Miocarditis linfoplasmocítica multifocal suave también se observó en 18/30 cerdos inoculados con PCV2. En 14/30 de los cerdos inoculados con PCV2, se observó nefritis linfoplasmocítica intersticial multifocal suave a moderada. No se observaron lesiones en los timos. Agotamiento linfoide suave a moderado (Fig. 4B) y reemplazo histiocítico de folículos se observó en la tonsila de 8/30, en el bazo de 7/30, y en los ganglios linfáticos de 26/30 de los cerdos inoculados con PCV2. Linfadenitis granulomatosa moderada con células gigantes (Fig. 4C) se observó el 21 DPI en tres cerdos inoculados por vía intranasal con virus PCV2, y en un cerdo el 35 DPI en cada uno de los grupos transfectados con ADN de plásmido de PCV2. Enterocolitis linfoplasmocítica e histiocítica suave se observaron en 3/5 cerdos en el grupo infectado con virus PCV2, en 3/5 cerdos en el grupo transfectado por vía intrahepática con ADN de plásmido de PCV2, y 1/5 cerdos en el grupo transfectado por vía intralinfoide con ADN de plásmido de PCV2 el 35 DPI. Un cerdo en cada uno de los grupos transfectados con ADN de plásmido de PCV2 tenía agotamiento linfoide suave con reemplazo histiocítico y números bajos de células gigantes en parches de Peyer. Se observó hepatitis linfoplasmocítica suave a moderada y 29/30 de los tres cerdos inoculados con PCV2. Se observaron bajos números de hepatocitos necróticos individualmente y ampliamente dispersos rodeados de inflamación linfocítica en un cerdo de cada uno de los grupos transfectados con ADN de plásmido de PCV2 el 21 DPI. Las lesiones en otros tejidos no eran notables.

Se puntuaron lesiones microscópicas en el pulmón, hígado y ganglios linfáticos de acuerdo con los sistemas de puntuación publicados (Tabla 4, más adelante) (P. G. Halbur *et al.*, 2001, *supra*; P. G. Halbur *et al.*, 1995, *supra*). No existían sistemas de puntuación aceptables para otros tejidos y órganos. Las puntuaciones medias de las lesiones en pulmón y ganglios linfáticos en cerdos de los tres grupos inoculados con PCV2 eran estadísticamente significativas de los cerdos control del Grupo 1. Las puntuaciones medias de las lesiones de hígado en cerdos de los tres grupos inoculados con PCV2 no eran estadísticamente diferentes de los cerdos control.

Tabla 3. Lesiones macroscópicas de Pulmón y Ganglios linfáticos en cerdos Control e inoculados con PCV2

Grupo	Inóculo	Vía de inoculación	21 DPI		35 DPI	
			Ganglios linfáticos	Pulmón	Ganglios linfáticos	Pulmón
1	Ninguno		0/5 <sup>a</sup>	0/5	0/5	0/5
2	Virus vivo de PCV2 <sup>b</sup>	Intranasal	5/5	1/5 (0 - 1) <sup>c</sup>	5/5	4/5 (0 - 5)
3	ADN de PCV2 <sup>d</sup>	Intrahepática	2/5	2/5 (0-2)	5/5	2/5 (0-13)
4	ADN de PCV2 <sup>d</sup>	Intralinfoide	4/5	5/5 (0 - 1)	3/5	1/5 (0 - 9)

<sup>a</sup> A cinco cerdos de cada grupo se les practicó necropsia 21 DPI, y a los 5 cerdos restantes se les practicó necropsia el 35 DP Número de positivos / Número de ensayados.

<sup>b</sup> Un reserva de virus de PCV2 biológicamente pura y homogénea generada mediante transfección de células PK-15 con clon de ADN molecular de PCV2

<sup>c</sup> Número con lesiones / Número de ensayados (intervalo del porcentaje estimado del pulmón afectado por lesiones de neumonía manifiestamente visibles, 0 - 100%)

<sup>d</sup> ADN genómico de PCV2 clonado en plásmido de pSK.

Tabla 4. Distribución de Lesiones Histopatológicas en cerdos control e inoculados con PCV2

Grupo	Inóculo	Vía de inoculación	DPI <sup>a</sup>	Pulmón <sup>b</sup>	Hígado <sup>c</sup>	Ln <sup>d</sup>	Bazo	Timo	Ileo	Cerebro	Corazón	Riñón	Tonsila
1	Ninguno		21 35	0/5 (0,0) 0/5 (0,0)	4/5 (0,8) 4/5 (0,8)	0/5 (0,0) 0/5 (0,0)	0/5 0/5						
2	Virus de PCV2	Intranasal	21 35	5/5 (1,6) 3/5 (0,6)	5/5 (1,2) 4/5 (1,0)	3/5 (1,2) 4/5 (0,8)	1/5 3/5	0/5 0/5	0/5 3/5	4/5 4/5	3/5 0/5	1/5 1/5	0/5 3/5
3	ADN de de PCV2	Intrahepática	21 35	5/5 (1,0) 5/5 (1,2)	5/5 (1,0) 5/5 (1,0)	5/5 (1,0) 4/5 (1,0)	1/5 2/5	0/5 0/5	0/5 3/5	5/5 3/5	4/5 4/5	1/5 5/5	0/5 3/5
4	ADN de de PCV2	Intra linfoide	21 35	5/5 (1,2) 5/5 (1,0)	5/5 (1,0) 5/5 (1,2)	5/5 (0,8) 5/5 (1,4)	0/5 0/5	0/5 0/5	0/5 1/5	4/5 3/5	4/5 3/5	3/5 3/5	0/5 2/5

<sup>a</sup> Días después de inoculación (DPI): a 5 animales de cada grupo se les practicó necropsia 21 DPI y a los 5 animales restantes de cada grupo se les practicó necropsia 35 DP

<sup>b</sup> Número de positivos / Número de ensayados (puntuación promedio de pulmón histológica: 0 = normal, 1 = neumonía intersticial suave, 2 = moderada, 3 = grave)

<sup>c</sup> Número de positivos / Número de ensayados (puntuación promedio de hígado histológica: 0 = normal, 1 = hepatitis suave, 2 = moderada, 3 = grave)

<sup>d</sup> Número de positivos / Número de ensayados (puntuación promedio de agotamiento linfoide histológico (LN): 0 = normal, 1 = suave, 2 = moderada, 3 = grave)

**Ejemplo 8****Inmunohistoquímica**

5 La detección inmunohistoquímica (IHC) de antígeno específico de PCV2 se realizó en todos los tejidos recogidos durante las necropsias 21 y 35 DPI. Un antisuero específico de PCV2 policlonal de conejo se usó para la IHC, y los procedimientos generales que se han descrito anteriormente (S. D. Sorden *et al.*, 1999, *supra*).

10 Para la detección y distribución de tejidos de antígeno de PCV2, se realizó tinción de IHC de antígeno de PCV2 en cerebro, pulmones, turbinado, corazón, riñones, tonsila, ganglios linfáticos, bazo, timo, íleo, hígado, vesícula biliar y páncreas de todos los cerdos a los que se les practicó necropsia 21 y 35 DPI. Todos los tejidos de los cerdos control eran negativos para antígeno de PCV2. La distribución de antígeno de PCV2 en tejidos en los tres grupos inoculados con PCV2 era similar (véase la Tabla 5, más adelante). En el cerebro, el antígeno de PCV2 se encontró predominantemente en células mononucleares, células de tipo fibroblasto, y células endoteliales en las meninges y plexus coroides y menos a menudo en células endoteliales y células mononucleares perivasculares en el cerebro y cerebelo. En los pulmones, se detectó antígeno de PCV2 dentro de los macrófagos alveolares y septales y en células de tipo fibroblasto en la lámina propia de las vías respiratorias (Fig. 3D). En el corazón, antígeno de PCV2 se detectó en macrófagos ampliamente dispersas y células endoteliales. En riñones, antígeno de PCV2 se detectó dentro de células epiteliales tubulares y células mononucleares en el intersticio. En los tejidos linfoides (ganglios linfáticos, bazo, tonsila, y parches de Peyer), antígeno de PCV2 se detectó principalmente dentro de los macrófagos y células de tipo dendríticas y células gigantes dentro de los folículos (Fig. 4D). Antígeno de PCV2 también se detectó dentro de macrófagos en la lámina propia del intestino delgado. En el hígado, antígeno de PCV2 se detectó dentro de células mononucleares y células de Kupffer. El antígeno de PCV2 no se detectó en turbinado, timo, o vesícula biliar.

Tabla 5. Detección y Distribución de antígeno específico de PCV2, mediante inmunohistoquímica en cerdos control e inoculados con PCV2

Grupo	Inóculo	Vía de inoculación	DPI <sup>a</sup>	Pulmón	Hígado	Ln	Bazo	Timo	Ileo	Cerebro	Corazón	Riñón	Tonsila
1	Ninguno		21	0/5 <sup>b</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	Virus de PCV2	Intranasal	35	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
			21	4/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3/5	3/5	1/5	1/5	2/5
			35	1/5	2/5	3/5	2/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5
3	ADN de de PCV2	Intrahepática	21	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	1/5	0/5	2/5
			35	4/5	4/5	3/5	4/5	0/5	3/5	4/5	2/5	2/5	3/5
4	ADN de de PCV2	Intralinfoide	21	4/5	4/5	5/5	4/5	0/5	3/5	3/5	0/5	0/5	3/5
			35	3/5	4/5	5/5	4/5	0/5	2/5	3/5	1/5	0/5	4/5

<sup>a</sup> Días después de inoculación (DPI): a 5 animales de cada grupo se les practicó necropsia 21 DPI y a los 5 animales restantes de cada grupo se les practicó necropsia 35 DPI

<sup>b</sup> Número de positivos / Número de ensayados

**Ejemplo 9****Construcción del clon de ADN infeccioso de PCV1 no patógeno**

El procedimiento usado para construir un clon de ADN infeccioso de PCV1 es esencialmente el mismo que se ha descrito en el presente documento para PCV2. Un par de cebadores de PCR, KPNPCV1.U establecidos en la SEC ID N°:7 y KPNPCV1.L establecido en la SEC ID N°:8 (véase la Tabla 6, más adelante), se diseñó basándose en la secuencia publicada de PCV1. Este par de cebadores amplifica el genoma completo de PCV1 con una región de superposición que contiene un único sitio de enzima de restricción de *KpnI*. El ADN del virus PCV1 se extrajo de la línea celular ATCC PK-15 contaminada que se obtuvo de la Colección Americana de Cultivo Tipo (número de acceso de ATCC CCL-33). El ADN de PCV1 se extrajo de las células PK-15 de ATCC infectado persistentemente con PCV1, usando el minikit QIAmp DNA (Qiagen, Inc., Valencia, CA.). El ADN extraído se amplificó con AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin - Elmer, Norwalk, CT). Los ciclos de PCR constaban de una etapa inicial de 95°C durante 10 min., seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min., hibridación a 48°C durante 1 min., extensión a 72°C durante 2 min y una extensión final a 72°C durante 7 min. El producto de PCR de tamaño esperado se separó mediante electroforesis de gel y se purificó mediante el procedimiento de polvo de cristal usando un Kit GeneClean (Bio 101, Inc., La Jolla, CA). El producto de PCR purificado que contenía el genoma de PCV1 completo se ligó primero en el vector de plásmido advanTAge (Clontech, Palo Alto, CA). células de *Escherichia coli* DH5a competentes se usaron para transformación. Los plásmidos recombinantes se verificaron mediante digestión por enzima de restricción. El ADN genómico de PCV1 de longitud completa se escindió del vector advanTAge mediante digestión con la enzima de restricción *KpnI*. El ADN genómico de PCV1 de longitud completa se ligó en el vector pBluescript SK(+) (pSK) (Stratagene, La Jolla, CA) con ADN ligasa de T4 a 37°C durante toda una noche. Los plásmidos recombinantes que contienen en genoma de PCV1 de longitud completa se aisló con un mini kit de plásmido de Qiagen (Qiagen, Valencia, CA) y se verificaron mediante digestión con enzima de restricción y secuenciación de ADN. El ADN genómico de PCV1 de longitud completa se escindió del vector pSK mediante digestión por *KpnI*, y se dimerizó para preparar el clon de ADN de PCV1 infeccioso como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2 para el clon de PCV2 infeccioso. Estos dímeros en tándem se prepararon debido a que los clones de ADN en tándem dimerizados se encuentran ventajosamente que son más eficaces para transfectar las células y producir viriones infecciosos. Para preparar el dímero en tándem del ADN de PCV1, el ADN genómico de PCV1 digerido se ligó con ADN ligasa de T4 a 37°C durante solamente 10 min., que favorece la producción de dímeros en tándem. Los dímeros en tándem se clonaron posteriormente en el vector pBluescript SK(+) (pSK) (Stratagene, La Jolla, CA). Los plásmidos recombinantes que contienen los dímeros en tándem del genoma de PCV1 (denominados en el presente documento "clon de ADN de PCV1") se confirmaron mediante PCR, digestión con enzima de restricción, y secuenciación de ADN. La concentración de ADN de los plásmidos recombinantes se determinó espectrofotométricamente.

Tabla 6. Cebadores de oligonucleótidos empleados en esta invención

Cebador	Dirección	Secuencia de cebador	Aplicación
<i>Cebadores de construcción:</i>			
KPNPCV1.U.	> <sup>a</sup>	5'-TTTGGTACCCGAAGCCGATT-3' (corresponde a la SEC ID N°: 7)	Construcción del clon de ADN de PCV1
KPNPCV1.L	<	5'-ATTGGTACCTCCGTGGATTGTTCT-3' (corresponde a la SEC ID N°: 8)	Construcción del clon de ADN de PCV1
Hpa 1-2	<	5'-GAAATTAACCCCTAAATGAATAAAAAATAAAAAACCATACG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 9)	Construcción del clon de ADN de PCV1-2
Nar 1-3	>	5'-GGTGGCGCCCTCTGGATACGTCATCCTATAAAAAGTG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 10)	Construcción del clon de ADN de PCV1-2
Psi 1-5	>	5'-AGGTATAAGTGGGGGCTTTAAGATAA-3' (corresponde a la SEC ID N°: 11)	Construcción del clon de ADN de PCV1-2
Acl 1-6	<	5'-GGAAACGTTACCGCAGAAGAAGACACC-3' (corresponde a la SEC ID N°: 12)	Construcción del clon de ADN de PCV1-2
Bgl-II-ORF2	>	5'-ACTATAGATCTTTATTTCATTTAGAGGGTCTTTCAG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 13)	Construcción del clon de ADN de PCV2-1
SpH-I-ORF2	<	5'-TACGGGCATGCATGACGTGGCCAAAGGAGG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 14)	Construcción del clon de ADN de PCV2-1
Bgl-II-PCV2	<	5'-AGACGAGATCTATGAATAATAAAAAACCATACGAAG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 15)	Construcción del clon de ADN de PCV2-1
SpH-I-PCV2	>	5'-CGTAAGCATGCAGCTGAAACGAAAGGAGTG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 16)	Construcción del clon de ADN de PCV2-1
<i>Cebadores de detección</i>			
MCV1	>	5'-GCTGAACTTTTGAAAAGTGAGCGGG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 17)	Detección de PCV1 y PCV2
MCV2	<	5'-TCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCA-3' (corresponde a la SEC ID N°: 18)	Detección de PCV1 y PCV2
Orf.I.PCV1	<	5'-CCAACTTTGTAAACCCCTCCA-3' (corresponde a la SEC ID N°: 19)	Detección de PCV1 y PCV2-1
Gen.PCV1	>	5'-GTGGACCCACCCTGTGCC-3' (corresponde a la SEC ID N°: 20)	Detección de PCV1 y PCV1-2
Orf. PCV1 encajado	<	5'-CCAGCTGTGGCTCCATTTAA-3' (corresponde a la SEC ID N°: 21)	Detección de PCV1 y PCV2-1
Gen. PCV1 encajado	>	5'-TTCCCATATAAAAATAAATTAAGTCTTT-3' (corresponde a la SEC ID N°: 22)	Detección de PCV2 y PCV1-2
Orf.PCV2	<	5'-CAGTCAGAACGCCCTCCTG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 23)	Detección de PCV2 y PCV1-2
Gen.PCV2	>	5'-CCTAGAAAACAAGTGGGGATG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 24)	Detección de PCV2 y PCV2-1
Orf. PCV2 encajado	<	5'-TTGTAACAAAAGCCACAGC-3' (corresponde a la SEC ID N°: 25)	Detección de PCV2 y PCV1-2
Gen. PCV2 encajado	>	5'-GTGTGATCGATATCCATTGACTG-3' (corresponde a la SEC ID N°: 26)	Detección de PCV2 y PCV2-1

<sup>a</sup> Dirección de cebador

**Ejemplo 10****Evaluación de infectividad del clon de ADN de PCV1 cuando se transfecta en células PK- 15 sin contaminación de virus**

La infectividad del clon de ADN molecular de PCV1 se determinó mediante transfección *in vitro* de las células PK-15. IFA con anticuerpo monoclonal específico de PCV1 (un regalo del Dr. Gordon Allan, Belfast, Reino Unido.) confirmó que el clon de ADN molecular de PCV1 es infeccioso en las células PK-15. El antígeno específico de PCV1 se visualizó mediante IFA en el núcleo, y hasta un grado menor citoplasma de las células transfectadas. Las células transfectadas de manera simulada con el vector pSK vacío permanecieron negativas para antígeno de PCV1.

**Ejemplo 11****10 Construcción de un clon de ADN Viral de PCV1-2 Quimérico**

Un virus quimérico se construyó entre el PCV1 no patógeno y el PCV2 asociado a PMWS usando clones de ADN infecciosos de PCV1 y PCV2. Para construir un clon de ADN de PCV1-2 quimérico, el gen de la cápsida ORF2 del PCV1 no patógeno se eliminó del clon de ADN infeccioso de PCV1, y se reemplazó con el gen de la cápsida ORF2 inmunogénico del PCV2 patógeno en la estructura central del genoma de PCV1 (véanse las Figs. 5 y 6). Se diseñaron dos pares de cebadores de PCR. El primer par de cebadores para PCV2 ORF2, Psi 1-5 establecido en la SEC ID N°: 11 y Acll-6 establecido en la SEC ID N°: 12, se diseñó sin mutaciones puntuales en los extremos 5' de los cebadores para crear sitios de enzimas de restricción *AcI* y *PsiI* para amplificar el gen de ORF2 de PCV2 e introducir los sitios de enzimas de restricción *PsiI* y *AcI* flanqueantes mediante mutación puntual. La reacción de PCR para la amplificación de ORF2 de PCV2 consistía en una etapa inicial a 95°C durante 9 min., seguido de 38 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min., hibridación a 48°C durante 1 min., extensión a 72°C durante 1 min., y una extensión final a 72°C durante 7 min.

Un segundo par de cebadores de PCR, *Hpa* 1-2 establecido en la SEC ID N°:9 y *Nar* 1-3 establecido en la SEC ID N°:10, se diseñó para amplificación del vector pSK+ y su inserción de genoma de PCV1. Las mutaciones puntuales se introdujeron en los extremos 5' de los cebadores de PCR para crear sitios de enzimas de restricción flanqueantes *NarI* y *HpaI*. Este par de cebadores amplificó el vector pSK+ ADN genómico de PCV1 insertado que carece del gen de la cápsida ORF2, esto es, el genoma de PCV1 menos el ORF2 de PCV1 (pSK-PCV1 L10RF2) mediante el uso de clon de ADN infeccioso de PCV1 como el molde de PCR. La reacción de PCR consistía en una etapa inicial a 95°C durante 9 min., seguido de 38 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min., hibridación a 50°C durante 1 min., extensión a 72°C durante 3,5 min., y una extensión final a 72°C durante 7 min. El producto de PCR de ORF2 de PCV2 se digirió con la *AcI* y *PsiI* para eliminar las mutaciones puntuales introducidas. El producto pSK-PCV1 ΔORF2 (el producto de PCR del genoma de pSK-PCV1 PCR que carece del gen de ORF2 de PCV1) se digirió con la *NarI* y *HpaI* para eliminar las mutaciones puntuales introducidas por la PCR. La digestión posterior produjo un extremo cohesivo y un extremo ciego complementario con el producto de PCR de ORF2 de PCV2 digerido por las enzimas de restricción *AcI* y *PsiI*. El producto de ORF2 de PCV2 digerido y el producto de pSK-PCV1 suprimido de ORF2 se ligaron con la ADN ligasa de T4 para formar el clon de ADN genómico de PCV1-2 quimérico, en el que el gen de ORF2 de PCV1 se reemplaza con el gen de ORF2 de PCV2. Una vez que los dos productos de PCR se digirieron y se volvieron a ligar, todas las mutaciones puntuales introducidas por PCR usadas para facilitar la clonación se eliminaron en el clon quimérico resultante. Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α. Los plásmidos recombinantes que contenían el clon de ADN quimérico se aislaron y se confirmaron mediante PCR, digestión con enzima de restricción y secuenciación de ADN parcial. El genoma quimérico de PCV1-2 de longitud completa se escindió del vector pSK+ (el plásmido recombinante) con digestión con *KpnI*. El genoma de ADN quimérico después se dimerizó mediante una reacción corta de ligación de 10 minutos con la ADN ligasa de T4 que favorece la formación de dímeros lineales para producir el clon de ADN infeccioso de PCV1-2 quimérico (Fig. 6). Los plásmidos recombinantes que contienen dos copias del genoma viral quimérico se confirmaron mediante PCR, digestión con enzima de restricción y secuenciación de ADN.

**Ejemplo 12****Evaluación de la Infectividad *In Vitro* de clon de ADN de PCV1-2 quimérico**

La viabilidad del clon de ADN de PCV quimérico (PCV1 no patógeno con el gen de la cápsida inmunogénica de PCV2) se ensayó en células PK-15. Cuando las células PK-15 se transfectaron con el clon de ADN viral quimérico, antígeno viral específico para la cápsida ORF2 de PCV2 se detectó mediante IFA a aproximadamente 2 días después de la transfección. El antígeno de la cápsida de PCV1 no se detectó en células transfectadas. Este experimento indicó que el clon de ADN quimérico es infeccioso *in vitro*, se replica en las células PK-15 y produce la proteína de la cápsida inmunogénica de PCV2.

**Ejemplo 13****55 Construcción de un Clon de ADN de PCV2-1 Quimérico recíproco**

Para construir un clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco, el gen de la cápsida de ORF2 de PCV2 se

reemplaza por el de PCV1 no patógeno en la estructura central del genoma del PCV2 patógeno (Fig. 6). Se diseñaron dos pares de cebadores de PCR: el par, Bgl-II-ORF2 establecido en la SEC ID N°:13 y SpH-I-ORF2 establecido en la SEC ID N°:14, amplifica el gen de ORF2 de PCV1 e introduce los sitios de enzimas de restricción *BglII* y *SpHI* flanqueantes mediante mutación puntual. El Segundo par de cebadores de PCR, Bgl-II-PCV2 establecido en la SEC ID N°:15 y SpH-I-PCV2 establecido en la SEC ID N°:16, amplificaron el vector pSK y el genoma de PCV2 menos el gen de ORF2 (pSK-PCV2 ORF2) mediante el uso del clon de ADN infeccioso de PCV2 como el molde de PCR, e introdujeron sitios de enzimas de restricción flanqueantes *BglII* y *SpHI* mediante mutación puntual. El producto de  $\Delta$ ORF2 pSK-PCV2 y el producto de PCR PCV1 ORF2 se digirieron mediante las enzimas de restricción *BglII* y *SpHI* para producir extremos cohesivos y ciegos complementarios ligados conjuntamente. Después de la transformación en células de E. Coli, los plásmidos recombinantes auténticos se aislaron y confirmaron mediante digestión con enzimas y secuenciación de ADN parcial. El genoma de PCV2-1 quimérico de longitud completa recíproco se escindió del plásmido recombinante mediante digestión con *SacII*, y se dimerizaron como se describe en el presente documento para producir el clon infeccioso de PCV2-1 recíproco quimérico.

#### Ejemplo 14

##### Transfección *In vitro* de células PK-15 con clones de ADN de PCV1, PCV2, PCV1-2 y PCV2-1

La infectividad del clon de PCV2 *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado en los ejemplos anteriores 3 - 5. Para ensayar la infectividad del PCV1 y dos clones quiméricos *in vitro*, células PK-15 sin contaminación de PCV1 preparados por el procedimiento del Ejemplo 1 se desarrollaron en portaobjetos de cámara de 8 pocillos LabTek (Nalge Nunc Int., Dinamarca). Cuando las células PK-15 alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia, células se transfectaron con clones de ADN de PCV1, PCV2, PCV1-2 y PCV2-1 respectivamente, usando el reactivo Lipofectamine Plus de acuerdo con los protocolos suministrados por el fabricante (Life Technologies, Inc.). Las células transfectadas de manera simulada con el vector pSK vacío se incluyeron como controles. Tres días después de la transfección, las células se lavaron tres veces con tampón PBS y se incubaron con acetona y 20% de metanol a 4°C durante 20 min. La evidencia de infectividad y replicación de virus en las células transfectadas con los clones de ADN de PCV1 y PCV2-1 se confirmaron mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) usando anticuerpo monoclonal contra el gen de la cápsida de ORF2 de PCV1, amablemente suministrado por el Dr. G. M. Allan (G. M. Allan et al., "Production, preliminary characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus," Vet. Immunol. Immunopathol. 43: 357 - 371 (1994)). Las células fijadas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con anticuerpo monoclonal de PCV1 diluido 1:20 a 37°C durante 1 hora. Las células después se lavaron tres veces con tampón PBS y se incubaron con inmunoglobulina G anti-ratón de cabra marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Laboratorios Kirkegaard y Perry, Inc., Gaithersburg, Md.) a 37°C durante 45 min. Después de lavar tres veces con tampón PBS, los portaobjetos se montaron con Fluoromount-G, cubreobjetos y se examinaron en un microscopio de fluorescencia. La infectividad de las células transfectadas con los clones de ADN de PCV2 y PCV1-2 quiméricos se confirmaron mediante IFA usando anticuerpo específico de 25 PCV2, como se ha descrito previamente en el Ejemplo 4.

La infectividad del PCV1, del ADN de PCV1-2 quimérico y de los clones de ADN de PCV2-1 quiméricos recíprocos se sustanciaba mediante transfección *in vitro* de células PK-15. Dos copias idénticas de genoma de PCV1 completo se ligaron en tándem en el vector pSK para producir el clon de ADN de PCV1 (Fig. 6). El clon de ADN de PCV1-2 quimérico tenía el gen de la cápsida de ORF2 de PCV1 reemplazado por el de PCV2 patógeno en la estructura central del genoma de PCV1 no patógeno. El clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco tenía el gen de la cápsida de ORF2 de PCV2 reemplazado por el de PCV1 no patógeno en la estructura central del genoma de PCV2 patógeno. Si es infeccioso *in vitro*, el clon de ADN de PCV1-2 quimérico, producirá el antígeno de la cápsida de ORF2 de PCV2 y el clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco expresará el antígeno de la cápsida de ORF2 de PCV1 en células PK-15 transfectadas. Los resultados muestran que el PCV1, el PCV1-2 quimérico y los clones de ADN de PCV2-1 quiméricos recíprocos se mostraron sorprendentemente que eran infecciosos cuando se transfectaban en células PK-15 y expresaban las proteínas del antígeno de la cápsida viral respectivas como se demuestra por IFA usando anticuerpos específicos de PCV1 o PCV2. IFA que usa anticuerpos monoclonales contra ORF2 de PCV1 y anticuerpos contra PCV2 confirmaron que el ADN de PCV1 y los clones de ADN de PCV1-2 eran infecciosos. IFA que usa anticuerpo monoclonal específico de ORF2 de PCV1 mostró que el clon de ADN quimérico de PCV1-2 también era infeccioso. Aproximadamente 10 - 20% de las células PK-15 transfectadas eran positivas para el antígeno de la cápsida de PCV1 y antígeno de PCV2, y expresaban el antígeno de ORF2 de PCV1, dentro del núcleo de las células transfectadas (Fig. 7).

#### Ejemplo 15

##### Inoculación Experimental de Cerdos con PCV1, PCV2, PCV1-2 Quimérico y Clones de ADN quiméricos de PCV2-1 recíprocos

Para evaluar la inmunogenicidad y patogenicidad de los clones de ADN quiméricos, cuarenta cerdos sin patógenos específicos (SPF) de 4 - 6 semanas de edad se asignaron a azar en cinco habitaciones de 8 animales cada una. Antes de la inoculación, animales se ensayaron para evaluar anticuerpos para PCV, PRRSV, PPV, y virus de hepatitis E de cerdo. Además, muestras de suero antes de la inoculación se ensayaron mediante PCR para ácido nucleico de PCV1 y PCV2 para confirmar que los cerdos no están infectados naturalmente por cualquiera de los

5 virus. Los clones de ADN de PCV1, PCV2, PCV1-2 y PCV2-1 estaban todos inoculados por inyección directa del plásmido de ADN clonado en los ganglios linfáticos ilíacos superficiales de cerdos. Los cerdos en el Grupo 1 recibieron solución salina tamponada con fosfato (tampón de PBS) y sirvieron como control negativo. Los cerdos del grupo 2 se inyectaron cada uno en los ganglios linfáticos ilíacos superficiales de cerdos 200 µg de clon de ADN de PCV1 infeccioso. Los cerdos del grupo 3 se inyectaron cada uno de ellos con 200 µg de de clon de ADN de PCV2 infeccioso. Los cerdos del grupo 4 recibieron cada uno de ellos inyecciones de 200 µg de clon de ADN de PCV1-2 infeccioso quimérico. Los cerdos del grupo 5 recibieron cada uno de ellos 200 µg del clon de ADN de PCV2-1 infeccioso quimérico recíproco. Todos animales se controlaron diariamente para evaluar los signos clínicos de enfermedad. Se recogieron muestras de suero de cada animal a -2, 7, 14, 21,28, 35, 42 y 49 días después de la inoculación (DPI). El 21 DPI, cuatro animales seleccionados al azar de cada grupo se les practicó la autopsia. A los cuatro animales restantes en cada grupo se les practicó la necropsia a 49 DPI. Diversos tejidos y órganos se recogieron durante la necropsia como se ha descrito previamente en el Ejemplo 7, y se procesaron para examen histológico.

15 La inmunogenicidad del PCV1, el PCV2 y los clones de ADN quiméricos infecciosos se examinó en los cerdos. Se recogieron muestras control de todos los animales control e inoculados a -2 (0), 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DPI se ensayaron para evaluar viremia por PCV1, PCV2, PCV1-2 y PCV2-1 mediante detección por PCR de secuencias de ADN específicas de clon, para anticuerpo anti-PCV1 mediante IFA y para anticuerpo de ORF2 anti-PCV2 mediante ELISA. Antes de la inoculación a -2 DPI, animales de los 5 grupos se probaron que eran negativos mediante PCR para tanto ADN de PCV1 como PCV2.

20 Los animales de control negativo eran negativos para tanto viremia de PCV1 como de PCV2 a lo largo de todo el estudio (véase la Tabla 7, más adelante). Cinco cerdos del grupo de control no inoculado tenían anticuerpo maternal de PCV2 detectable en -2 DPI y 2 cerdos tenían anticuerpos maternos de PCV1 detectables en 7 DPI (véase la Tabla 8, más adelante). Los anticuerpos maternos para tanto PCV1 como PCV2 en estos lechones disminuían 21 DPI. No se detectó seroconversión a o bien PCV1 o PCV2 en cualquiera de los 8 cerdos de control no inoculados a lo largo del estudio.

25 En el grupo inoculado con PCV1, primero se detectó viremia en un cerdo inoculado en 7 DPI (Tabla 7, más adelante), y se detectó al final en 35 DPI. Cinco de 8 animales inoculados con clon de ADN infeccioso de PCV1 eran positivos para viremia de PCV1. La duración media de la viremia continua de PCV1 era 0,625 semanas. El 21 DPI, todos los animales en el grupo inoculado con PCV1 se había seroconvertido a PCV1 y permanecían positivos para anticuerpos de PCV1 hasta el final del estudio en 49 DPI.

35 El clon de ADN de PCV2 se muestra en el presente documento que es infeccioso en cerdos. En el grupo inoculado con el clon de ADN de PCV2, se detectó primero viremia por PCV2 en 7 DPI (Tabla 7, más adelante). El 21 DPI, todos los animales del Grupo 3 inoculados con PCV2 eran positivos para viremia por PCV2. La duración media de la viremia de PCV2 era 2,12 semanas. Dos cerdos en el grupo inoculado con PCV2 los niveles detectables de anticuerpos de PCV2 maternos en 7 DPI (Tabla 8, más adelante), y los anticuerpos maternos en estos lechones disminuían el 14 DPI. Primero se detectó seroconversión a PCV2, ensayada mediante un ELISA específico de PCV2, el 35 DPI. El 42 DPI, todos los cerdos inoculados con clon de ADN de PCV2 infeccioso se había seroconvertido a PCV2.

40 En los cerdos inoculados del Grupo 4 con clon de ADN de PCV1-2 quimérico infeccioso, viremia específica para el virus quimérico se detectó primero el 14 DPI (Tabla 7, más adelante). Cuatro de 7 animales inoculados llegaron a ser virémicos por PCV1-2 entre 14 DPI y 42 DPI. La duración media de viremia por PCV-2 quimérico era 1 semana. Un cerdo tenía niveles detectables de anticuerpos de PCV2 maternos el 7 y 14 DPI, pero el anticuerpo maternal disminuía 21 DPI (Tabla 8, más adelante). Primero se produjo la seroconversión a anticuerpo específico de ORF2 de PCV2 el 28 DPI. El 49 DPI, todos cerdos inoculados con clon de ADN de quimérico de PCV1-2 se había seroconvertido a anticuerpo específico de ORF2 de PCV2.

45 En cerdos inoculados con el ADN viral, clon quimérico de PCV2-1, específico para el virus quimérico de PCV2-1 no se detectó en muestras de suero (Tabla 7, más adelante). Sin embargo, el 21 DPI todos los animales en el Grupo 5 se seroconvirtieron a anticuerpo de PCV1. Los productos de PCR se amplificaron a partir de cerdos seleccionados en cada grupo se secuenciaron y se confirmaron que eran los clones infecciosos respectivos auténticos usados en la inoculación en cada grupo.

50

Tabla 7. Detección de Viremia mediante PCR anidada en sueros de Cerdos inoculados y de control

Grupo	Inóculo	DPI								Total
		-2	7	14	21	28	35	42	49	
1	PBS <sup>a</sup>	0/8 <sup>b</sup>	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8
2	ADN de PCV <sup>c</sup>	0/8	1/8	1/8	2/8	0/4	2/4	0/4	0/4	5/8
3	ADN de PCV2 <sup>c</sup>	0/8	3/8	6/8	7/8	1/4	2/4	2/4	0/4	8/8
4	ADN de PCV1-2 <sup>c</sup>	0/7	0/7	1/7	2/7	2/4	2/4	2/4	0/4	4/7
5	ADN de PCV2-1 <sup>c</sup>	0/8	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8

<sup>a</sup> Solución salina tamponada con fosfato (PBS) usada como control negativo

<sup>b</sup> Ocho cerdos en cada grupo; número de positivos / número de negativos

5 <sup>c</sup> PCV genómico clonado o ADN de PCV quimérico en plásmido pSK

Tabla 8. Seroconversión a anticuerpos contra PCV2 en cerdos inoculados con PCV2 o clones de ADN de PCV 1-2 quiméricos y seroconversión a anticuerpos contra PCV1 en cerdos inoculados con PCV1 o clones de ADN de PCV2-1

Grupo	Inóculo <sup>a</sup>	Anticuerpo ensayado para <sup>b</sup>	DPI <sup>c</sup>							
			-2	7	14	21	28	35	42	49
1	PBS	PCV1	ND	2/8	2/8	1/8	0/4	0/4	0/4	0/4
		PCV2	5/8	5/8	2/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4
2	PCV1 ADN	PCV1	ND	3/8	2/8	8/8	4/4	4/4	4/4	4/4
		ORF2								
3	ADN de PCV2	Virus completo dePCV2	3/8	2/8	0/8	0/8	0/4	3/4	4/4	4/4
4	ADN de PCV1-2	Virus completo dePCV2	2/8	1/8	1/8	0/8	1/4	1/4	3/4	4/4
5	ADN de PCV2-1	PCV1 ORF2	ND	3/8	3/8	8/8	3/4	3/4	4/4	4/4

10

<sup>a</sup> Solución salina tamponada con fosfato (PBS) usada como control negativo. Los inóculos eran PCV genómico clonado y ADN quimérico de PCV en plásmido pSK

<sup>b</sup> Anticuerpo de pCV1 para ORF2 se midió con un ensayo de inmunofluorescencia indirecta específico para antígeno de PCV1. El anticuerpo para PCV2 se midió con un ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima.

15 <sup>c</sup> Días después de la inoculación, número de positivos / número de negativos.

**Ejemplo 16**

**Evaluación Clínica**

20 Cerdos se pesaron el 0 DPI y en el tiempo de necropsias. Las temperaturas rectales y puntuaciones respiratorias clínicas, que varían entre 0 y 6 (0 = normal; 6 = grave) (P. G. Halbur et al., "Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus," Vet. Pathol. 32: 648 - 660 (1995)), se registraron cada día diferente entre 0 y 49 DPI. Observaciones clínicas, que incluyen las evidencias de enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad de hígado (ictericia), enfermedad del músculo esquelético y cambios en la condición del cuerpo, también se registraron en base diaria. Un equipo de dos personas realizó todas las evaluaciones clínicas.

25 Ninguno de los cerdos control o inoculados mostró signos obvios de PMWS clínico de espectro completo. No existían diferencias en ganancia de peso o temperaturas medias rectales entre cualquiera de los grupos. Uno de los cerdos del Grupo 3 inoculado con PCV1-2 murió un día después de inoculación. Después de la necropsia y análisis

clínico, no se detectó agente patógeno asociado y la muerte no se asoció con el procedimiento de inoculación del virus de PCV1-2 quimérico.

### Ejemplo 17

#### Patología e Histología General

5 A cuatro cerdos de cada grupo se les practicó necropsia 21 y 49 DPI, respectivamente. El equipo de necropsia era ciego al estado de infección de los cerdos en necropsia. Se realizaron las necropsias completas en todos los cerdos. Un porcentaje estimado del pulmón con neumonía extremadamente visible se registró para cada cerdo basándose en un sistema de puntuación previamente discreto (P. G. Halbur *et al.*, 1995, *supra*). Otras lesiones tal como  
10 agrandamiento de los ganglios linfáticos se indicaron separadamente. Las secciones para examen histopatológico se recogieron del turbinado nasal, pulmones (siete secciones) (*id.*), corazón, cerebro, ganglios linfáticos (traqueobronquial, ilíaco, mesentérico, subinguinal), tonsila, timo, hígado, vesícula biliar, bazo, articulaciones, intestino delgado, colon, páncreas, y riñón. Los tejidos se examinaron de una manera ciega y se proporcionó una puntuación subjetiva de la gravedad de pulmón, ganglio linfático, y lesiones de hígado como se describe en el Ejemplo 7. Las puntuaciones de pulmón varían entre 0 (normal) y 3 (neumonía intersticial linfocitocítica grave). Las  
15 puntuaciones de hígado varían entre 0 (normal) y 3 (hepatitis linfocitocítica grave). Las puntuaciones de ganglios linfáticos eran para una cantidad estimada de agotamiento de folículos que varían entre 0 (normal o sin agotamiento linfoide) a 3 (agotamiento linfoide grave y reemplazo histiocítico de folículos).

Para determinar la patogenicidad de PCV1, PCV2, PCV1-2 quimérico y clones de ADN de PCV2-1 recíproco quimérico en cerdos, se examinaron primero las lesiones macroscópicas. Los resultados se muestran en la Tabla 9  
20 más adelante. Ganglios linfáticos de animales del Grupo 1 de control no inoculados eran normales a tanto 21 como 49 DPI. Cerdos en los cuatro grupos inoculados tenían grados variables de lesiones macroscópicas limitadas a los Ganglios linfáticos. En los cerdos del Grupo 2 inoculados con PCV1, Ganglios linfáticos eran manifiestamente normales a 21 DPI, sin embargo, inflamación suave a moderada y decoloración de los ganglios linfáticos se detectó en 49 DPI. Todos los cerdos del Grupo 3 inoculados con PCV2 tenían los ganglios linfáticos agrandados de dos a  
25 cinco veces el tamaño normal, que estaban firmes y agrandados a tanto 21 como 49 DPI. Ganglios linfáticos de animales inoculados con PCV1-2 quimérico eran de inflamación de suave a moderada y decolorados a tanto 21 como 49 DPI en 5 de 7 cerdos. En los cerdos del Grupo 5, inoculados con el clon de PCV2-1, 1 de 8 animales tenían inflamación suave y decoloración de los ganglios linfáticos en 21 DPI. Las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas de los ganglios linfáticos en cerdos inoculados con clon quimérico de PCV1-2 no eran  
30 significativamente diferentes de las de los grupos 1, 2, y 5, pero estadísticamente diferentes de las de los cerdos del grupo 3 inoculados con PCV2 patógeno a tanto 21 como 49 DPI. Las puntuaciones promedio de lesiones linfoides macroscópicas el 49 DPI de los animales inoculados con PCV1, PCV2, y PCV1-2 no eran significativamente diferentes entre sí, pero eran significativamente diferentes de las puntuaciones medias de lesiones macroscópicas de los grupos 1 y 5.

35 A continuación, se examinaron las lesiones microscópicas. Los resultados se muestran en la Tabla 10 más adelante. No se detectaron lesiones microscópicas en ninguno de los cerdos de control del Grupo 1 no inoculados o cerdos del Grupo 2 inoculados con PCV1 en cualquier DPI. Las lesiones de control microscópicas caracterizadas por neumonía peribronquiolar linfoplasmocítica e histiocítica broncointersticial, se observaron en 1 de 8 de los cerdos inoculados con PCV2. En los animales inoculados con PCV1-2 y PCV2-1, se observaron lesiones microscópicas en los pulmones. No se observaron lesiones en los timos de ninguno de los cerdos inoculados. Miocarditis linfoplasmocítica multifocal suave se observó en 2 de 8 cerdos en el grupo inoculado con PCV2. Los tejidos cardíacos de animales inoculados con PCV1-2 y PCV2-1 estaban libres de lesiones microscópicas. Se observó nefritis intersticial multifocal linfoplasmocítica en 4 de 8 cerdos en el grupo inoculado con PCV2, en 2 de 7 cerdos inoculados con PCV1-2 y en 1 de 8 cerdos inoculados con PCV2-1. Agotamiento linfoide de suave a moderado y reemplazo histiocítico de folículos se observaron en la tonsila en 5 de 8 cerdos, en el bazo en 3 de 8 cerdos, y en los ganglios linfáticos en 8 de 8 cerdos en el grupo inoculado con PCV2. En los animales inoculados con PCV1-2 quimérico, se observaron agotamiento linfoide suave y reemplazo histiocítico de folículos en los ganglios linfáticos de 2 de 7 cerdos pero no se detectaron ni en el bazo ni tonsilas. No se observó supresión linfoide ni reemplazo histiocítico de folículos en los ganglios linfáticos, bazo o tonsilas de los animales inoculados con PCV2-1 quimérico  
45 recíproco. Se observó hepatitis linfoplasmocítica moderada a suave en 7 de los 8 cerdos inoculados con PCV2. Se observó en hepatitis linfoplasmocítica suave 2 de los 7 cerdos inoculados con PCV1-2 quimérico. No se observó hepatitis linfoplasmocítica en cerdos inoculados con PCV2-1 quimérico recíproco. Las lesiones en otros tejidos no eran importantes.

55 Las lesiones microscópicas en el pulmón, hígado, y ganglios linfáticos se puntuaron de acuerdo con un sistema de puntuación publicado (P. G. Halbur *et al.*, 1995, *supra*). Los resultados se muestran en la Tabla 10 más adelante. Las puntuaciones medias de lesiones en los ganglios linfáticos en cerdos del Grupo 4 inoculados con PCV1-2 quimérico eran similares a los de los grupos 1, 2 y 5 pero eran estadísticamente diferentes de los cerdos del Grupo 3 inoculados con PCV2 patógeno, a tanto 21 como 49 DPI. Las puntuaciones promedio de lesiones de hígado microscópicas del grupo de inoculado con PCV1-2 quimérico el 21 DPI eran estadísticamente diferentes de los animales del Grupo 3 inoculados con PCV2 pero eran similares a los de los cerdos de los Grupos 1, 2 y 5 en 21 DPI. El 49 DPI, las puntuaciones medias de hígado microscópicas de los cerdos inoculados con PCV1-2 quimérico del  
60

Grupo no eran estadísticamente diferentes de los cerdos de los Grupos 1, 2, 3 y 5. No existían sistemas de puntuación aceptables para los otros tejidos u órganos.

Tabla 9. Lesiones macroscópicas de ganglios linfáticos en Cerdos de Control e inoculados

Grupo	Inóculo <sup>a</sup>	DPI <sup>b</sup>	
		21	49
1	PBS	0/4(0,0)	0/4(0,0)
2	ADN de PCV1	0/4(0,0)	4/4(1,5)
3	ADN de PCV2	4/4(2,5)	4/4(2,25)
4	ADN de PCV1-2	2/3(0,66)	3/4(1,25)
5	ADN de PCV2-1	1/4(0,25)	0/4(0,0)

5           <sup>a</sup> Solución salina tamponada con fosfato (PBS) usada como control negativo. Los inóculos eran PCV genómico clonado o ADN quimérico de PCV en plásmido pSK

10           <sup>b</sup> A cuatro cerdos de cada grupo se les practicó necropsia el 21 DPI y a los cerdos restantes se les practicó necropsia el 49 DPI; número de positivos / número de ensayados. Número con lesiones / número de ensayados (intervalo de agrandamiento de de ganglios linfáticos de forma grave)

Tabla 10. Distribución de Lesiones histopatológicas en diferentes tejidos/Órganos de cerdos Control e inoculados

Grupo	Inóculo <sup>a</sup>	DPI <sup>b</sup>	Pulmón <sup>c</sup>	Hígado <sup>d</sup>	Ganglios linfáticos <sup>e</sup>	Bazo	Timo	Íleo	Cerebro	Corazón	Riñón	Tonsila
1	PBS	21	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
2	ADN de	21	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	PCV1	49	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3	ADN de	21	0/4 (0,0)	4/4 (1,5)	4/4 (1,75)	3/4	0/4	0/4	1/4	1/4	2/4	3/4
	PCV2	49	1/4 (0,25)	3/4 (0,75)	4/4 (1,0)	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	2/4
4	ADN de	21	0/3 (0,0)	1/3 (0,33)	1/3 (0,33)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	PCV1-2	49	0/4 (0,0)	1/4 (0,25)	1/4 (0,25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4
5	ADN de	21	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	PCV2-1	49	0/4 (0,0)	0/4 (0,0)	1/4 (0,25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

<sup>a</sup> Solución salina tamponada con fosfato (PBS) usada como control negativo. Los inóculos eran ADN de PCV genómico donado o quimérico de PCV en plásmido pSK

<sup>b</sup> A cuatro cerdos de cada grupo se les practicó necropsia el 21 DPI y a los cerdos restantes se les practicó necropsia el 49 DPI;

<sup>c</sup> Número de positivos / Número de ensayados (puntuación de pulmón histológica media: 0, normal; 1, neumonía intersticio suave; 2, moderada; 3, grave).

<sup>d</sup> Número de positivos / Número de ensayados (puntuación de hígado histológica media: 0, normal; 1, hepatitis suave; 2, moderada; 3, grave.)

<sup>e</sup> Número de positivos / Número de ensayados (puntuación de agotamiento linfoide histológico (ganglios linfáticos) media: 0, normal; 1, suave; 2, moderado; 3, grave.)

**Ejemplo 18****Serología**

Se recogió sangre de todos los cerdos en -2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DPI. Los anticuerpos en suero para PRRSV se ensayaron usando Herd Check PRRSV ELISA (Laboratorios IDEXX, Westbrook, MA). Los anticuerpos en suero para PPV se detectaron mediante un ensayo de inhibición de hemoaglutinación (HI) (H. S. Joo et al., "A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody," Aust. Vet. J. 52: 422 - 424 (1976)). Los anticuerpos en suero para PCV2 se detectaron mediante un ELISA indirecto modificado basado en la proteína de la cápsida de ORF2 recombinante de PCV2 como se ha descrito en el presente documento anteriormente (véase también P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV," Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1: 33 - 40 (2002)). Los anticuerpos en suero para PCV se detectaron mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecto (1 FA). Las células PK-15 infectadas con PCV1 se desarrollaron sobre portaobjetos de cámara de ocho pocillos LabTek. Cuando las células PK-15 infectadas alcanzaron aproximadamente el 95 - 100% de confluencia, las células infectadas se fijaron con una solución que contenía 80% de acetona y 20% de metanol a 4°C durante 20 min. Las células fijadas se lavaron una vez con tampón PBS. Cien microlitros de muestra de suero de cerdo diluida 1:10 en PBS se añadió a las cámaras, y se incubó durante 1 hora a 37°C. Las células después se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 45 min. a 37°C con anticuerpo secundario anti-cerdo de cabra marcado con FITC. Los portaobjetos se lavaron posteriormente tres veces con PBS, se montaron con Fluoromount-G, con cubreobjetos y se examinaron en un microscopio fluorescente. Para el control positivo, células infectadas con PCV1 se incubaron con un anticuerpo monoclonal específico de PCV1 diluido (regalo del Dr. G. M. Allan), seguido de una incubación con IgG anti-ratón de cabra marcado con FITC (Laboratorios Kirkegaard y Perry, Inc., Gaithersburg, Md.). Para el control negativo, células infectadas con PCV1 se incubaron con suero de cerdo diluido 1:10 sin anticuerpo PCV1 y PCV2, seguido de una incubación con IgG anti-cerdo de cabra marcado con FITC (Laboratorios Kirkegaard y Perry, Inc., Gaithersburg, Md.).

**Ejemplo 19****Detección de PCR**

Para detectar viremia de PCV1, PCV2, PCV1-2 quimérico y PCV2-1 quimérico recíproco en sueros de cerdos inoculados, muestras de suero recogidas en diferentes DPI se ensayaron mediante PCR. El ADN viral se extrajo de 100 µl de cada muestra de suero usando reactivo DNazol de acuerdo con el protocolo del fabricante (Molecular Research Center, Cincinnati, OH). El ADN extraído se volvió a suspender en agua sin ADNasa, ARNasa y proteinasa. Para amplificar las secuencias genómicas específicas de clon de PCV1, PCV2, PCV1-2 quimérico y PCV2-1 quimérico recíproco, se diseñaron dos conjuntos de pares de cebadores de PCR anidados (Tabla 6, anterior). El primer conjunto de cebadores anidados se diseñó basándose en las secuencias de PCV1 publicadas. Cebadores Gen.PCV1 establecidos en la SEC ID N°:20 y Orf.PCV1 establecidos en la SEC ID N°:19 amplificaron un fragmento de 400 pares de bases en la presencia del genoma PCV1. Los cebadores anidados. Gen.PCV1 anidado establecido en la SEC ID N°:22 y Orf.PCV1 anidado establecido en la SEC ID N°:21, amplificaron un fragmento de 220 pares de bases.

Para detectar viremia de PCV2, el par de cebadores de PCV2 Gen.PCV2 establecido en la SEC ID N°:24 y Orf.PCV2 establecido en la SEC ID N°:23 amplificaron un fragmento de 900 pares de bases en la presencia de PCV2 en la primera ronda de PCR. Los cebadores Gen.PCV2 anidados establecidos en la SEC ID N°: 26 y Orf.PCV2 anidados establecidos en la SEC ID N°:25 amplificaron un fragmento de 600 pares de bases en la PCR anidada.

Para detectar viremia de PCV1-2 quimérico, la primera ronda de la reacción de la PCR empleó el cebador específico de PCV1 Gen.PCV1 establecido en la SEC ID N°: 20 y el cebador específico de ORF2 de PCV2 Orf. PCV2 establecido en la SEC ID N°: 23 para amplificar un fragmento quimérico de 580 pares de bases. Para la PCR anidada, cebador específico de PCV1 .Gen.PCV1 anidado establecido en la SEC ID N°: 22 y el cebador específico de ORF2 de PCV2 anidado Orf.PCV2 establecido en la SEC ID N°: 25 se usaron para amplificar un fragmento quimérico de 370 pares de bases.

Para detectar viremia de PCV2-1 quimérico recíproco, la primera ronda de PCR empleó el cebador Gen.PCV2 específico de PCV2 establecido en la SEC ID N°: 24 y el cebador específico de ORF2 de PCV1 Orf.PCV1 establecido en la SEC ID N°: 19 para amplificar un fragmento quimérico de 700 pares de bases. Para la PCR anidada, el cebador específico de PCV2 anidado Gen.PCV2 establecido en la SEC ID N°: 26 y el cebador específico de ORF2 de PCV1 anidado Orf.PCV1 establecido en la SEC ID N°:21 se usaron para amplificar un fragmento de 460 pares de bases quimérico. Todos los parámetros de PCR eran esencialmente los mismos, que constan de 38 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 50 min., hibridación a 45°C durante 1 min., y extensión a 72°C durante 1,5 min. Las muestras de suero de cerdos de control negativos se ensayaron mediante un ensayo de diagnóstico PCR-RFLP, que puede detectar y diferenciar tanto PCV1 como PCV2 como se ha descrito anteriormente (M. Fenaux et al., "Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment

length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2, "J. Clin. Microbiol. 38: 2494 - 503 (2000)). Los productos de PCR de animales seleccionados en cada grupo se secuenciaron para verificar el origen del virus que infecta a los cerdos.

**Ejemplo 20**

**5 Inmunohistoquímica (IHC)**

La detección IHC de antígeno específico de PCV2 se realizó sobre tejidos de ganglios linfáticos recogidos de todos los cerdos a los que se les practicó necropsia 21 y 49 DPI. Un antisuero policlonal de conejo contra PCV2 se usó para la IHC, de acuerdo con los procedimientos generales descritos anteriormente (S. D. Sorden et al., "Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue," J. Vet. Diagn. Invest. 11: 528 - 530 (1999)).

Basándose en la tinción por IHC de antígeno específico de PCV2, tejidos linfoides de los cerdos control no inoculados, inoculados con PCV1 y PCV2-1 eran negativos para antígeno de PCV2. El antígeno de PCV2 se detectó en tejidos linfoides de 7 de 8 animales en el grupo inoculado por PCV2. El antígeno de PCV2 también se detectó en tejido linfoide de 1 de 7 cerdos del grupo inoculado con PCV1-2 quimérico.

15

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Meng, Xiang-Jin

Fenaux, Martijn

Halbur, Patrick G.

20

<120> Clones de ADN Infeccioso Quimérico, Circovirus Porcinos Quiméricos y sus usos

<130> AM100878 PCT

25

<140> PCT/US 02/39646

<141> 2002-12-11

<160> 26

30

<170> Versión de patente 3.1

<210> 1

<211> 1768

<212> ADN

35

<213> Circovirus porcino

<400> 1

ES 2 529 726 T3

aaatttctga caaacgttac aggggtgctgc tctgcaacgg tcaccagact cccgctctcc 60  
aacaaggtac tcacagcagt agacaggta ctcogttgtc cttgagatcg aggagctcca 120  
cattcaataa gtaagttgcc ttctttactg caatattctt tattctgctg atcagttcct 180  
ttggctttct cgatatggca gcgggcaccc aaataccact tcactttatt aaaagtttgc 240  
ttcttcacaa aattagcgaa cccttgagg tgaggtgttc gtccttctc attaccctcc 300  
tcgccaacaa taaaataatc aaatagggag attgggagct cccgtatfff cttgcgctcg 360  
tcttcggaag gattattcag cgtgaacacc caccttttat gtggttgggg tccgcttctt 420  
ccattcttct tgctgggcat gttgctgctg aggtgctgcc gaggtgctgc cgctgccgaa 480  
gtgcgctggt aatacttaca gcgcacttct ttcgttttca gctatgacgt atccaaggag 540  
  
gcgttaccgc agaagaagac accgcccccg cagccatctt ggccagatcc tccgcccgcg 600  
cccctggctc gtccaccccc gccaccgcta ccgttggaga aggaaaaatg gcactttcaa 660  
caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtcaaggct accacagtca gaacgccctc 720  
ctgggcggtg gacatgatga gatttaatat tgacgacttt gttcccccg gaggggggac 780  
caacaaaatc tctataccct ttgaatacta cagaataaga aaggtaaggt ttgaattctg 840  
gccctgctcc cccatcaccc agggatgatag gggagtgggc tccactgctg ttattctaga 900  
tgataacttt gtaacaaagg ccacagccct aaactatgac ccatatgtaa actactcctc 960  
ccgccataca atcccccaac cttctctcta ccaactccgt tacttcacac ccaaacctgt 1020  
tcttgactcc accattgatt acttccaacc aaataacaaa agaatcagc tttggatgag 1080  
gctacaaacc tctagaaatg tggaccacgt aggcctcggc actgcgttcg aaaacagtat 1140  
atagaccag gactacaata tccgtgtaac catgtatgta caattcagag aatttaatot 1200  
taaagacccc ccacttaaac cctaaatgaa taataaaaac cattacgaag tgataaaaaa 1260  
gactcagtaa tttatttcat atggaaatc agggcatggg ggggaaaggg tgacgaactg 1320  
gcccccttcc tccgtggatt gttctgtagc attcttccaa aataccaaga aagtaatcct 1380  
ccgatagaga gcttctacag ctgggacagc agttgaggag taccattcca acggggctctg 1440  
attgctggta atcagaatac tgcgggccaa aaaaggtaaca gttccacctt tagtctctac 1500  
agtcaatgga tatcgatcac acagtctcag tagatcatcc cacggcagcc agccataaaa 1560  
gtcatcaata acaaccactt cttcacatg gtaaccatcc caccacttgt ttctaggtgg 1620  
tttcagtat gtggtttccg ggtctgcaaa attagcagcc catttgcttt taccacaccc 1680  
aggtggcccc acaatgacgt gtacattggt cttccaatca cgcttctgca ttttcccgt 1740  
cactttcaaa agttcagcca gcccgcg 1768

ES 2 529 726 T3

<210> 2

<211> 17.73

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

5

<400> 2

```
ggtacctccg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga      60
tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggocctgattg    120
ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc    180
aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatccaag gtaaccagcc ataaaaatca    240
```

ES 2 529 726 T3

tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggcttc 300  
 cagtaggtgt ccctaggctc agcaaaaatta cgggccact ggctcttccc acaaccgggc 360  
 gggcccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact 420  
 ttcaaaagtt cagccagccc gcggaattt ctacatacag ttacaggaaa ctgctcggct 480  
 acagtcacca aagaccccgt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcmc 540  
 ttcccctggg tccgaggagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat 600  
 tctttattct gctggctcgg tcccttcgct ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac 660  
 cacttcacct tgttaaaagt ctgcttctta gcaaaaattcg caaacccctg gaggtgagga 720  
 gttctacct cttccaaacc ttctcgcga caaacaatat aatcaaaaag ggagattgga 780  
 agctcccgta tttgttttt ctctcctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840  
 ttatggggtt gcgggcccgt tttcttgctt ggcattttca ctgacgctgc cgaggtgctg 900  
 ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgcact tctttcactt ttataggatg 960  
 acgtatccaa ggaggcgtta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttgccag 1020  
 atcctccgcc gccgcccctg gctcgtccac ccccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080  
 aatggcatct tcaacaccgc cctctccgc accttcggat atactgtcaa ggctaccaca 1140  
 gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc 1200  
 ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata cctttgaaat actacagaat aagaaaggtt 1260  
 aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggctccact 1320  
 gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaacctt tgaccatat 1380  
 gtaaaactact cctccgcca tacaatcccc caaccctct cctaccactc ccgttacttc 1440  
 acaccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaataa caaaaggaat 1500  
 cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcy 1560  
 ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taaccatgta tgtacaattc 1620  
 agagaattta atcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaacccat 1680  
 tacgatgta taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacagggt 1740  
 gggctccactg cttcaaatcg gccttcgggt acc 1773

<210> 3

<211> 702

5 <212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 3

ES 2 529 726 T3

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60  
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120  
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180  
 acagtcagaa cgcctctctg ggcggtggac atgatgagat ttaatattga cgactttggt 240  
 cccccgggag gggggaccaa caaaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300  
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg agtgggctcc 360  
 actgctgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420  
 tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480  
 ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540  
 aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600  
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaacat gtatgtacaa 660  
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 4

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Circovirus porcino

<400> 4

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
 20 25 30  
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45  
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr  
 50 55 60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr

ES 2 529 726 T3

				100						105						110
Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn	
		115					120					125				
Phe	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val	Asn	Tyr	
	130					135					140					
Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Pro	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser	Arg	Tyr	
145					150					155					160	
Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	Pro	
				165					170					175		
Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Met	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	Arg	Asn	
			180					185					190			
Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Ile	Tyr	Asp	
		195					200					205				
Gln	Asp	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Met	Tyr	Val	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	
	210					215					220					
Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Lys	Pro								
225					230											

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Circovirus porcino

<400> 5

gaaccgcggg ctggctgaac tttgaaagt 30

<210> 6

10 <211> 30

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 6

gcaccgcgga aatttctgac aaacgttaca 30

15

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

20 <400> 7

tttggtagcc gaagccgat t 21

<210> 8

<211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

5 <400> 8  
 attggtacct ccgtaggattg ttct 24

<210> 9  
 <211> 39  
 10 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

<400> 9  
 15 gaagftaacc ctaaatgaat aaaaataaaa accattacg 39

<210> 10  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

20 <400> 10  
 ggtggcgct ccttgatac gtcacatctat aaaagtg 37

<210> 11  
 25 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

<400> 11  
 30 aggtataag tgggggtct ttaagattaa 30

<210> 12  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 35 <213> Circovirus porcino

<400> 12  
 ggaaacgfta ccgcagaaga agacacc 27

<210> 13  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

<400> 13  
 45 actatagatc ttattcatt tagagggtct ttcag 35

<210> 14  
 <211> 29  
 50 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

<400> 14  
 55 tacgggcatg catgacgtgg ccaaggagg 29

<210> 15  
 <211> 36  
 <212> ADN

ES 2 529 726 T3

<213> Circovirus porcino  
 <400> 15  
 5 agacgagatc tatgaataat aaaaccatt acgaag 36  
 <210> 16  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino  
 10  
 <400> 16  
 cgtaagcatg cagctgaaaa cgaaagaagt g 31  
 <210> 17  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino  
 15  
 <400> 17  
 20 gctgaacttt tgaaagtgag cggg 24  
 <210> 18  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 25 <213> Circovirus porcino  
 <400> 18  
 tcacacagtc tcagtagatc atccca 26  
 30 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino  
 35 <400> 19  
 ccaactttgt aaccccctcc a 21  
 <210> 20  
 <211> 18  
 40 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino  
 <400> 20  
 45 gtggaccac cctgtgcc 18  
 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino  
 50  
 <400> 21  
 ccagctgtgg ctccattaa 20  
 <210> 22  
 55 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

# ES 2 529 726 T3

<400> 22

ttcccatata aaataaatta ctgagtctt 29

<210> 23

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 23

10 cagtcagaac gccctcctg 19

<210> 24

<211> 22

<212> ADN

15 <213> Circovirus porcino

<400> 24

cctagaaaca agtgggtggga tg 22

<210> 25

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 25

25 ttgtaacaaa ggccacagc 19

<210> 26

<211> 23

<212> ADN

30 <213> Circovirus porcino

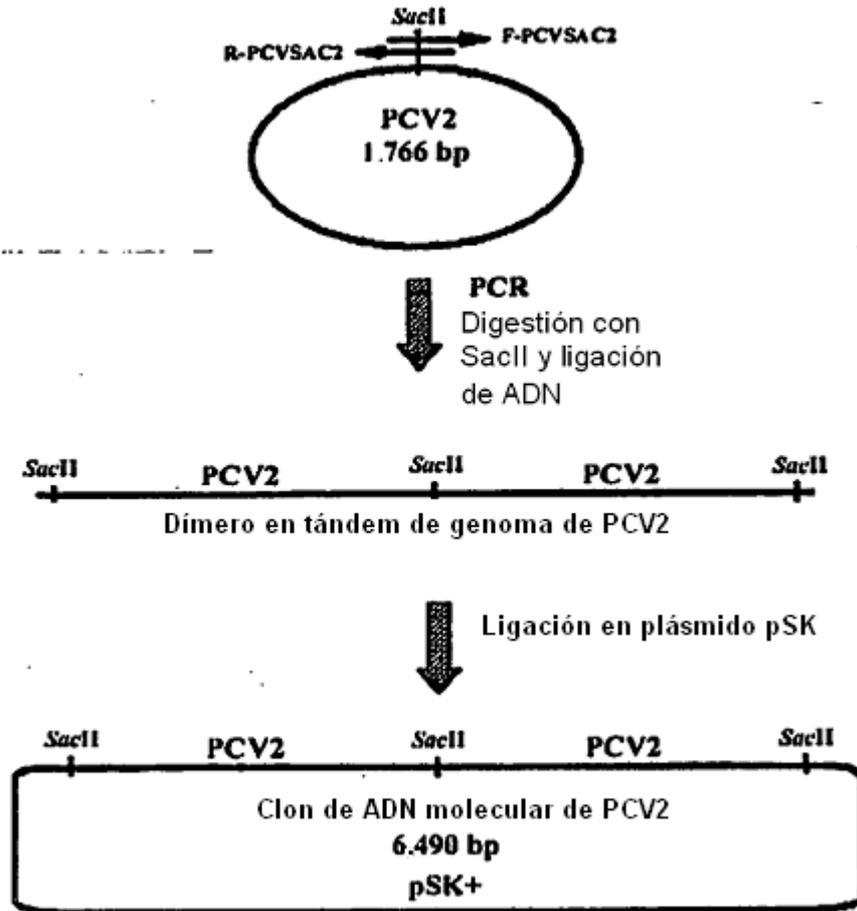
<400> 26

gtgtgatcga tatccattga ctg 23

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una vacuna viral que protege a un cerdo contra infección viral o síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS) provocado por PCV2 **caracterizada por** comprender un vehículo no tóxico fisiológicamente aceptable, uno o más adyuvantes y una cantidad inmunogénica de un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en:
- (a) una molécula de ácido nucleico quimérico de circovirus porcino (PCV1-2) **caracterizada por** tener una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV1 no patógeno, que contiene el gen del marco abierto de lectura 2 (ORF2) inmunogénico de un PCV2 patógeno en lugar del gen ORF2 de la molécula de ácido nucleico de PCV1;
- 10 (b) una molécula de ácido nucleico quimérico que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID N° 2, su hebra complementaria o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95 % de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2;
- (c) un plásmido o vector viral que contiene la molécula de ácido nucleico quimérico de circovirus porcino (PCV1-2), la hebra complementaria o la secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95 % de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2; y
- 15 (d) un circovirus porcino quimérico hecho de una molécula de ácido nucleico quimérico de PCV1-2, en la que el gen de la cápsida de ORF2 de un PCV1 no patógeno es reemplazado con el gen de la cápsida de ORF2 de un PCV2 patógeno,
- y, opcionalmente, una cantidad inmunogénica de al menos un antígeno porcino adicional.
- 20 2. La vacuna viral de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicha vacuna es una vacuna de ADN, una vacuna viva, una vacuna viva modificada, una vacuna inactivada o una vacuna atenuada.
3. La vacuna viral de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que el antígeno porcino adicional opcional es un virus de síndrome porcino reproductor y respiratorio (PRRSV), parvovirus porcino (PPV) o ambos.
- 25 4. La vacuna viral de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que el adyuvante es hidróxido de aluminio, complejos inmunoestimulantes, un polímero o copolímero de bloqueo no iónicos, una citoquina, saponina, monofosforil lípido A, muramil dipéptido, sulfato de aluminio y potasio, enterotoxina termolábil o termoestable aislada de *Escherichia coli*, toxina colérica o la subunidad B de la misma, toxina diftérica, toxina tetánica, toxina pertussis, adyuvante incompleto o completo de Freund o una combinación de los mismos.
- 30 5. La vacuna viral de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, para su uso en la protección de un cerdo contra infección viral o síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS) provocado por PVC2.

Fig. 1



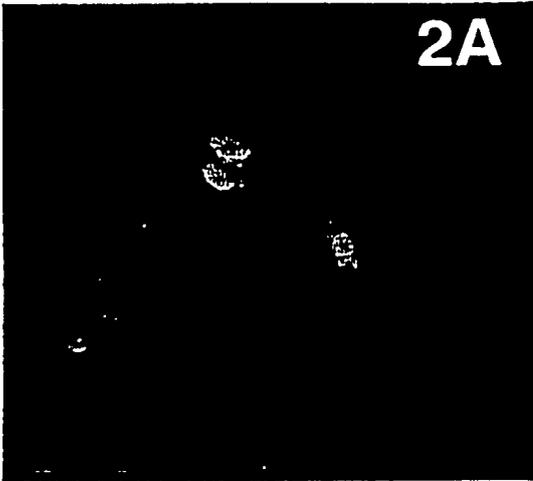


Fig. 2A

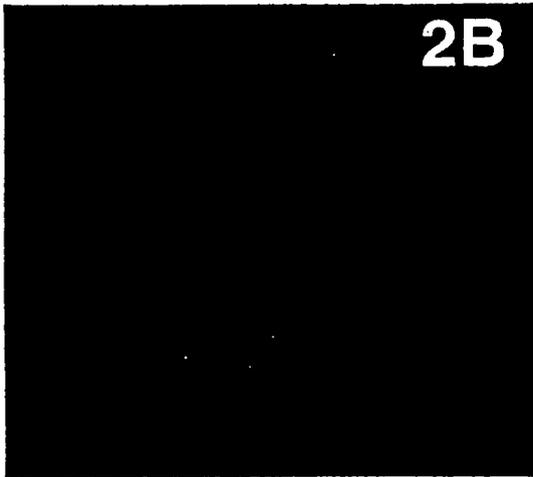


Fig. 2B

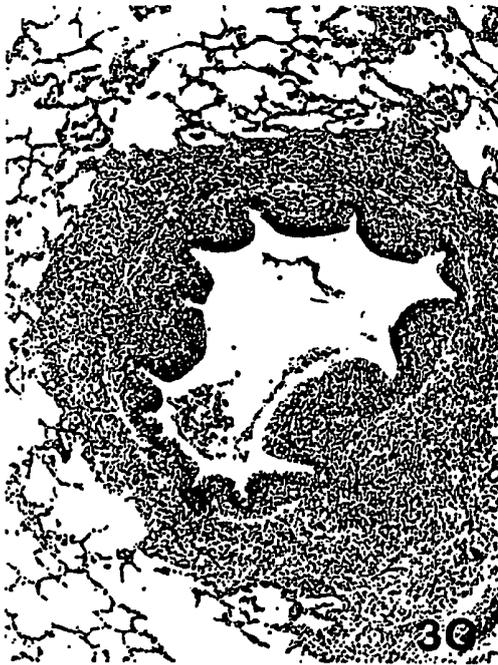
Figs. 3A - 3D



3A



3B



3C



3D

**Figs. 4A - 4D**

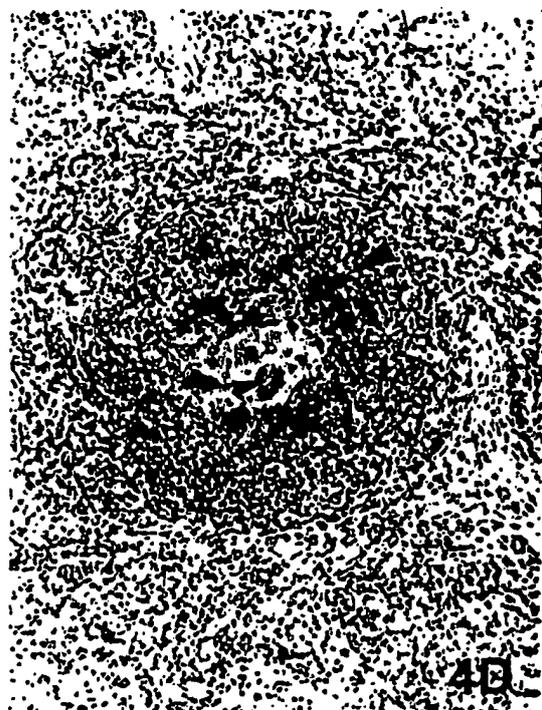
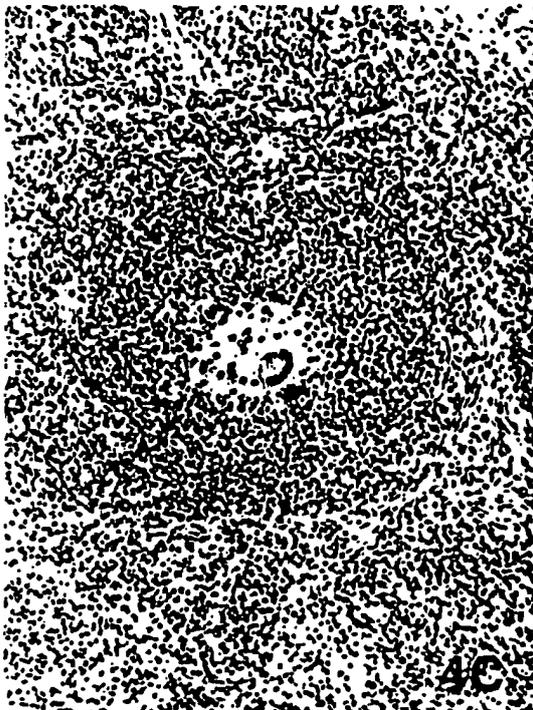
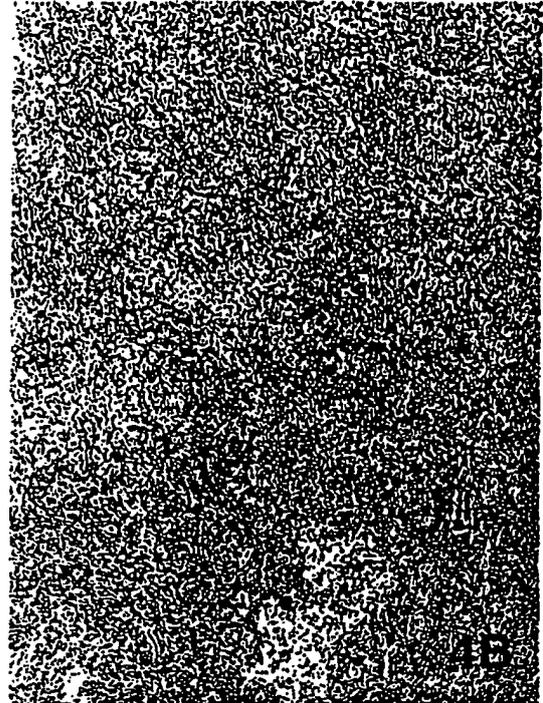
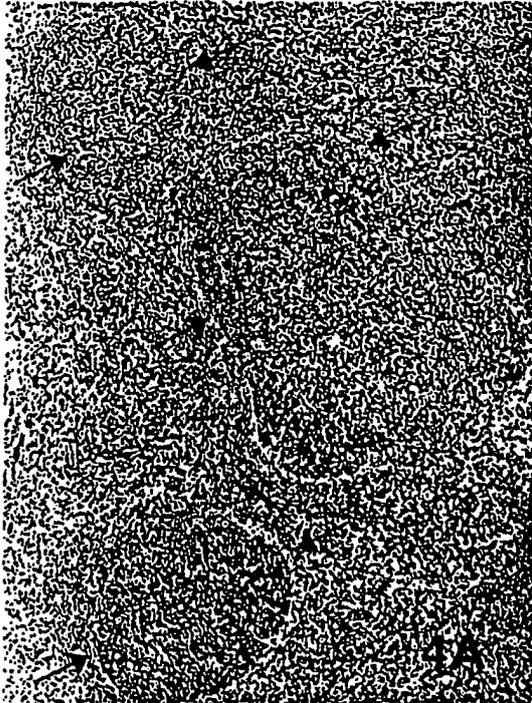


Fig. 5

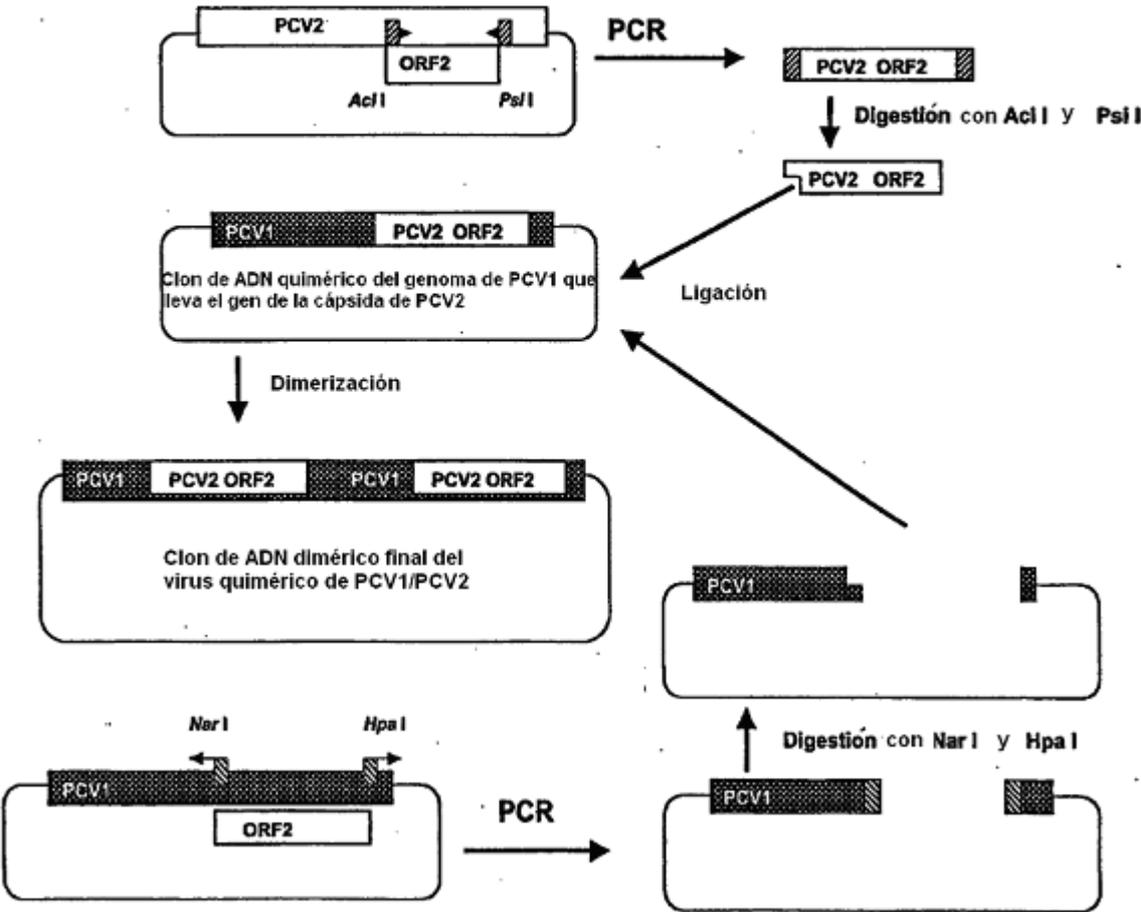
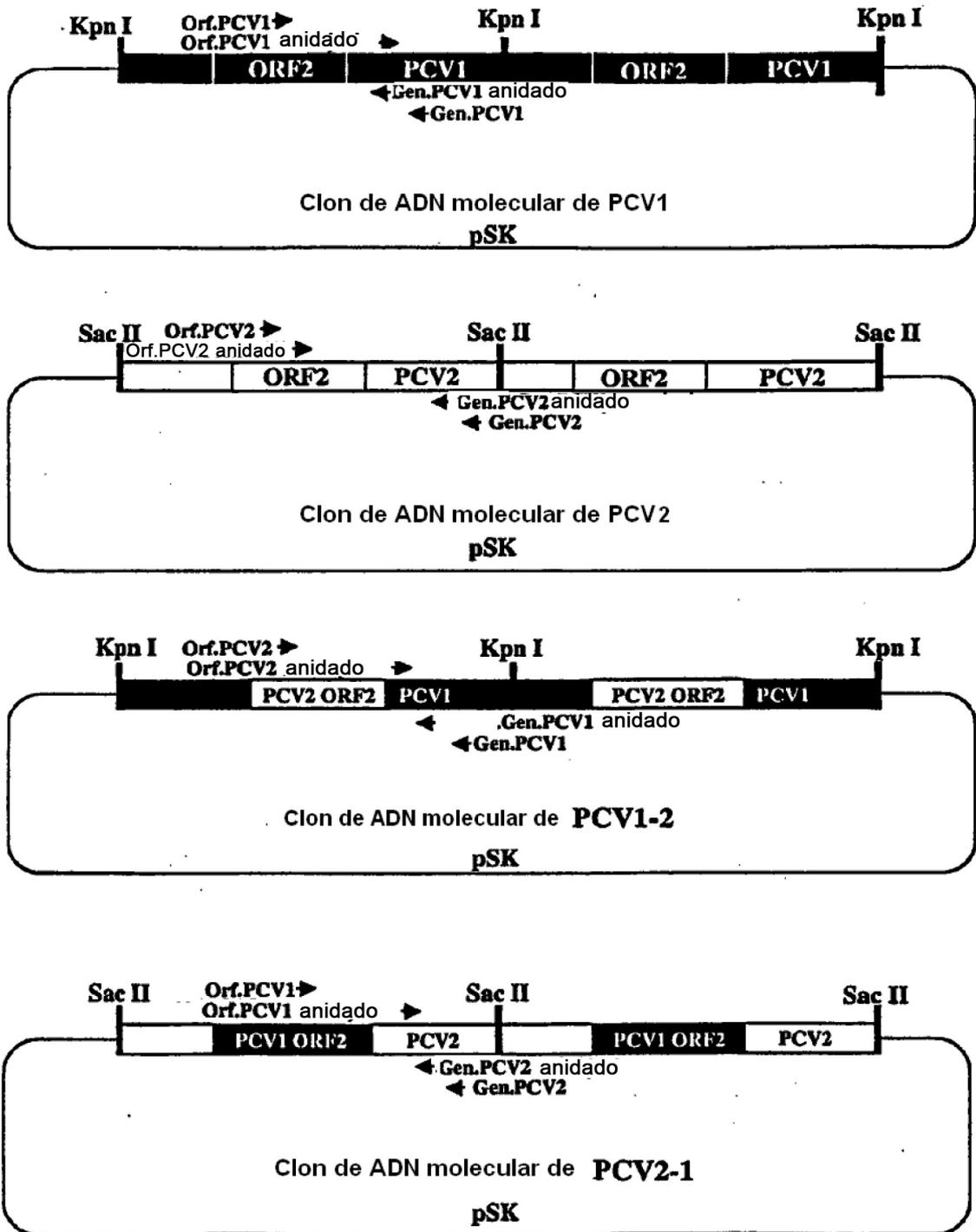


Fig. 6



Figs. 7A - 7J

IFA con  
anti-PCV1 ORF2

IFA con  
anti-PCV2

Fig. 7A



A

Fig. 7B



B

Fig. 7C



C

Fig. 7D



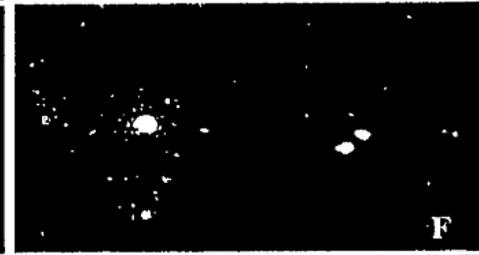
D

Fig. 7E



E

Fig. 7F



F

Fig. 7G



G

Fig. 7H



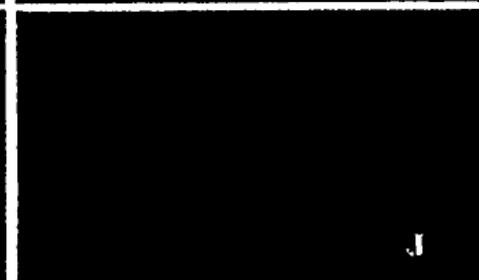
H

Fig. 7I



I

Fig. 7J



J

Fig. 8

AAATTTCTGACAAACGTTACAGGGTGCTGCTCTGCAACGGTCACCAGACTCCCGCTCTCC  
 AACAAAGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTCACTCCGTTGTCCTTGAGATCGAGGAGCTCCA  
 CATTCAATAAGTAAGTTGCCTTCTTACTGCAATATTCTTTATTCTGCTGATCAGTTCCT  
 TTGGCTTTCTCGATATGGCAGCGGGCACCCAAATACCACTTCACTTTATTA AAAAGTTTGC  
 TTCTTCACAAAATTAGCGAACCCCTGGAGGTGAGGTGTTTCGTCTTCTCATTACCCTCC  
 TCGCCAACAATAAAAATAATCAAATAGGGAGATTGGGAGCTCCCGTATTTCTTGCGCTCG  
 TCTTCGGAAGGATTATTCAGCGTGAACACCCACCTTTTATGTGGTTGGGGTCCGCTTCTT  
 CCATTCCTTCTTGCTGGGCATGTTGCTGCTGAGGTGCTGCCGAGGTGCTGCCGCTGCCGAA  
 GTGCGCTGGTAATACTTACAGCGCACTTCTTTCGTTTTAGCTATGACGTATCCAAGGAG  
 GCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTCCGCCGCCG  
 CCCCCTGGCTCGTCCACCCCCGCCACCGTACCGTTGGAGAAGGAAAATGGCATCTTCAA  
 CCCCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGCTACCACAGTCAGAACGCCCTC  
 CTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTGTTCCTCCCGGGAGGGGGGAC  
 CAACAAAATCTCTATACCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATTCTG  
 GCCCTGCTCCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGA  
 TGATAACTTTGTAAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCATATGTAACTACTCCTC  
 CCGCCATACAATCCCCAACCTTCTCCTACCCTCCCGTTACTTCACACCCAAACCTGT  
 TCTTGACTCCACCATTGATTACTTCCAACCAAATAACAAAAGGAATCAGCTTTGGATGAG  
 GCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCAGTAGGCCTCGGCACTGCGTTCGAAAACAGTAT  
 ATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCT  
 TAAAGACCCCCCACTTAAACCTAAATGAATAATAAAAACCATTACGAAGTGATAAAAAA  
 GACTCAGTAATTTATTTTCATATGGAAATTCAGGGCATGGGGGGGAAAGGGTGACGAACTG  
 GCCCCCTTCTCCGTGGATTGTTCTGTAGCATTCTTCCAAAATACCAAGAAAGTAATCCT  
 CCGATAGAGAGCTTCTACAGCTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCATTCCAACGGGGTCTG  
 ATTGCTGGTAATCAGAATACTGCGGGCCAAAAAGGTACAGTTCACCTTTAGTCTCTAC  
 AGTCAATGGATATCGATCACACAGTCTCAGTAGATCATCCACGGCAGCCAGCCATAAAA  
 GTCATCAATAACAACCACTTCTTACCATGGTAACCATCCCACCCTTGTCTTAGGTGG  
 TTTCCAGTATGTGGTTTCCGGGTCTGCAAATTAGCAGCCCATTTGCTTTTACCACACCC  
 AGGTGGCCCCACAATGACGTGTACATTGGTCTTCCAATCACGCTTCTGCATTTTCCCGCT  
 CACTTTCAAAAGTTTCAGCCAGCCCCGGG

Fig. 9

GGTACCTCCGTGGATTGTTCTCCAGCAGTCTTCCAAAATTGCAAAGTAGTAATCCTCCGA  
TAGAGAGCTTCTACAGCTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCATTCTGGGGGGCCTGATTG  
CTGGTAATCAAAAATACTGCGGGCCAAAAAGGAACAGTACCCCTTTAGTCTCTACAGTC  
AATGGATACCGGTCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCAAGGTAACCAGCCATAAAAATCA  
TCCAAAAACAACAATTCTTCTCCATGATATCCATCCCACCACTTATTTCTACTAGGCTTC  
CAGTAGGTGTCCCTAGGCTCAGCAAATTACGGGGCCACTGGCTCTTCCCACAACCGGGC  
GGGCCCACTATGACGTGTACAGCTGTCTTCCAATCACGCTGCTGCATCTTCCCGCTCACT  
TTCAAAAGTTCAGCCAGCCCGCGGAAATTTCTCACATACGTTACAGGAAACTGCTCGGCT  
ACAGTCAACAAAGACCCCGTCTCCAAAAGGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTGCGTGGC  
TTCCCTGGTTCCGCGGAGCTCCACACTCGATAAGTATGTGGCCTTCTTTACTGCAGTAT  
TCTTTATTTCTGCTGGTCGGTTCCTTTCGCTTCTCGATGTGGCAGCGGGCACAAAATAC  
CACTTCACTTGTAAAGTCTGCTTCTTAGCAAATTCGCAACCCCTGGAGGTGAGGA  
GTCTACCTTCTCCAAACCTTCTCGCCAAACAAAATAATCAAAAAGGAGATTGGA  
AGCTCCCGTATTTTGTCTTCTCCTCCTCGGAAGGATTATTAAGGGTGAACACCCACCTC  
TTATGGGGTTGCGGGCCGCTTTTCTTGCTTGGCATTCTTCACTGACGCTGCCGAGGTGCTG  
CCGCTGCCGAAGTGCGCTGGTAATACTACAGCAGCGCACTTCTTCACTTTTATAGGATG  
ACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCAG  
ATCCTCCGCGCCGCCCCCTGGCTCGTCCACCCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAA  
AATGGCATCTTCAACACCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGCTACCACA  
GTCAGAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTTGTTCCC  
CCGGGAGGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCCTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTT  
AAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCCACT  
GCTGTTATTTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCATAT  
GTAAACTACTCCTCCGCCATACAATCCCCAACCCCTTCTCCTACCACTCCCGTTACTTC  
ACACCCAAACCTGTTCTTGACTCCACCATTTGATTACTTCCAACCAAATAACAAAAGGAAT  
CAGCTTTGGATGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGCACTGCG  
TTCGAAAACAGTATATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTC  
AGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAAACCCTAAATGAATAAAAATAAAAACCAT  
TACGATGTGATAACAAAAAAGACTCAGTAATTTATTTTATATGGGAAAAGGGCACAGGTT  
GGGTCCACTGCTTCAAATCGGCCTTCGGGTACC

Fig. 10

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGC  
CAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGG  
AAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGCTACC  
ACAGTCAGAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTTGTT  
CCCCCGGAGGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAG  
GTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCC  
ACTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCA  
TATGTAAACTACTCCTCCCGCCATACAATCCCCAACCCTTCTCCTACCACTCCCGTTAC  
TTCACACCCAAACCTGTTCTTGACTCCACCATTGATTACTTCCAACCAAATAACAAAAGG  
AATCAGCTTTGGATGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGCACT  
GCGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAA  
TTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCCACTTAAACCCTAA

**Fig. 11**

**MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTFGYTVKAT  
TVRTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS  
TAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFYSYHSRYFTPKEVLDSTIDYFQPNNKR  
NQLWMRLQTSRNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLKP\***

\* Codón de terminación de traducción