

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 838**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2005 E 05746811 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 1727915**

54 Título: **Clones de ADN infecciosos quiméricos, circovirus porcinos quiméricos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

25.03.2004 US 808964

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

24.08.2015

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 2 543 838 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 infecciosos quiméricos, circovirus porcinos quiméricos y usos de los mismos

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a clones de ADN infecciosos de PCV1-2 quiméricos y a virus quiméricos derivados de clones de ADN quiméricos útiles como vacunas. La invención se refiere adicionalmente a dos mutaciones en el gen de la cápside inmunogénica del PCV 2 y la proteína y a la introducción de mutaciones del ORF2 en los clones quiméricos.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 El circovirus porcino (PCV) se aisló originalmente como un contaminante de cultivo de células no citopáticas de una línea celular de riñón porcina PK-15 I. Tischer y col., "A very small porcine virus with circular single-stranded DNA," Nature 295:64 - 66 (1982); I. Tischer y col., "Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines," Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Otg. A. 226 (2):153 - 167 (1974)). El PCV es un pequeño virus icosaédrico sin envuelta que contiene un genoma de ADN circular monocatenario de aproximadamente 1, 76
- 15 kb. El PCV está clasificado en la familia de *Circoviridae*, junto con otros circovirus de animales diferentes tales como el virus de la anemia del pollo (CAV), el virus de la enfermedad de pico y pluma de Psittacine (PBFVDV) y los posibles miembros del circovirus de colúmbidos (CoCV) descubierto en palomas, el circovirus del ganso y el circovirus del canario) y tres circovirus de plantas (virus del cogollo racimoso del banano, virus de la podredumbre foliar del cocotero y virus de malformación del trébol subterráneo) (K.V. Phenix y col., "Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus circovirus of the family Circoviridae," J. Gen. Virol. 82:2805 - 2809 (2001); Todd y col., "Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon," Virology 286:354 - 362 (2001); M. R. Bassami y col., "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 y col., "Transcription analysis of porcine circovirus (PCV)," Virus Genes 16:267 - 276 (1998); A. Mankertz y col., "Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons," Arch. Virol. 145:2469 - 2479 (2000); B. M. Meehan y col., "Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses," J. Gen. Virol. 78:221 - 227 (1997); B. M. Meehan y col., "Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs," J. Gen. Virol. 79:2171 - 2179 (1998); D. Todd y col., "Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes," Arch. Virol. 117:129 - 135 (1991)).

- Los miembros de los tres circovirus animales reconocidos previamente (PCV, CAV y PBFVDV) no comparten la homología de secuencias de nucleótidos o determinantes antigénicos entre sí (M. R. Bassami y col., 1998, citado anteriormente; D. Todd y col., 1991, citado anteriormente). El genoma del CoCV recientemente identificado compartía aproximadamente el 40 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la de PCV (A. Mankertz y col.,
- 35 "Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons," Arch. Virol. 145:2469 - 2479 (2000)). Recientemente se ha identificado un nuevo circovirus humano con un genoma circular, denominado virus transmitido por transfusión o virus TT (TTV) en individuos asociado a hepatitis después de transfusión (H. Miyata y col., "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 y col., "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, se ha identificado un minivirus humano de tipo TTV (TLMV) a partir de sangre de donantes normales P. Biagini y col., "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 y col., "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 - 93 (2000)) y también se ha descubierto un tercer circovirus humano nuevo, conocido como virus SEN (SENV) en seres humanos con hepatitis postransfusional (T. Umemura y col., "SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis," Hepatology 33:1303 - 1311 (2001)). La organización genómica tanto del TTV como del TLMV humanos es similar al del CAV CAV (P. Biagini y col., 2001, citado anteriormente; H. Miyata y col., 1999, citado anteriormente; K. Takahashi y col., 2000, citado anteriormente).
- 50 Aunque se encontraron anticuerpos contra el PCV en diversas especies animales incluyendo seres humanos, ratones, ganado vacuno y cerdos (G. M. Allan y col., "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 y col., "Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses," Can. Vet. J. 40:277 - 278 (1999); I. Tischer y col., "Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms," Arch. Virol. 140:737 - 743 (1995); I. Tischer y col.,

"Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle," *Arch. Virol.* 140:1427 - 1439 (1995)), se sabe poco con relación a la patogenia del PCV en estas especies animales. La infección experimental de cerdos con el PCV derivado de células PK-15 no produjo enfermedad clínica y, por tanto, este virus no se considera que sea patógeno para los cerdos (G. M. Allan y col., "Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material," *Vet. Microbiol.* 44:49 - 64 (1995); I. Tischer y col., "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 de tipo 1 o PCV1.

El síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS), descubierto por primera vez en 1991 (J. C. Harding and E.G. Clark, 1997, citado anteriormente), es una enfermedad compleja de los lechones de destete que está cada vez más extendida. Con la amenaza de un potencial impacto económico serio para la industria del cerdo, se hace urgente desarrollar una vacuna contra el PCV2, el principal agente causante del PMWS. El PMWS afecta directamente a cerdos de entre 5 y 18 semanas de edad. Los signos clínicos del PMWS incluyen pérdida de peso progresiva, disnea, taquipnea, anemia, diarrea, e ictericia. La tasa de mortalidad puede variar entre el 1 % y el 2 %, y llegar hasta el 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 del PMWS incluyen neumonía intersticial granulomatosa, linfadenopatía, hepatitis y nefritis (G. M. Allan and J. A. Ellis, "Porcine circoviruses: a review," *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:3 - 14 (2000); J. C. Harding and E.G. Clark, 1997, citado anteriormente). El PMWS se ha reconocido actualmente en cerdos en Canadá, Estados Unidos (G. M. Allan y col., "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes," *Vet. Rec.* 142:467 - 468 (1998); G. M. Allan y col., "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, citado anteriormente; J. Ellis y col., "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome," *Can. Vet. J.* 39:44 - 51 (1998); A. L. Hamel y col., "Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs," *J. Virol.* 72:5262 - 5267 (1998); M. Kiupel y col., "Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana," *Vet. Pathol.* 35:303 - 307 (1998); R. Laroche y col., "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 y col., 1998, citado anteriormente; I. Morozov y col., "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 y col., "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, citado anteriormente; S. Edwards and J. J. Sands, 1994, citado anteriormente; S. Kennedy y col., "Porcine circovirus infection in Northern Ireland," *Vet. Rec.* 142:495 - 496 (1998); A. Mankertz y col., "Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France," *Virus Res.* 66:65 - 77 (2000); C. Rosell y col., "Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome," *Vet. Rec.* 146:40 - 43 (2000); P. Spillane y col., "Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland," *Vet. Rec.* 143:511 - 512 (1998); G. J. Wellenberg y col., "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 en algunos países en Asia (C. Choi y col., "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 y col., "Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan," *J. Vet. Med. Sci.* 61:1119 - 1123 (1999)). El PMWS potencialmente tiene un serio impacto económico en la industria del cerdo en todo el mundo.

El agente causante principal del PMWS es una cepa patógena de PCV denominada circovirus porcino de tipo 2 o PCV2 (G. M. Allan y col., "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes," *Vet. Rec.* 142:467 - 468 (1998); G. M. Allan y col., "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 y col., "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 and J. A. Ellis, 2000, citado anteriormente; J. Ellis y col., 1998, citado anteriormente; A. L. Hamel y col., 1998, citado anteriormente; B. M. Meehan y col., 1998, citado anteriormente; I. Morozov y col., 1998, citado anteriormente). La secuencia genómica completa del PCV2 asociado al PMWS se ha determinado (R. Laroche y col., "Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions," *Virus Res.* 90:101 - 112 (2002); M. Fenaux y col., "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 y col., 1998, citado anteriormente; J. Mankertz y col., 1998, citado anteriormente; B. M. Meehan y col., 1997, citado anteriormente; B. M. Meehan y col., 1998, citado anteriormente; I. Morozov y col., 1998, citado anteriormente).

El 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 la secuencia revela que el PCV2 asociado al PMWS normalmente solo comparte aproximadamente un 75 % de identidad de secuencia de nucleótidos con el PCV1 no patógeno. Algunas otras cepas pueden variar algo desde aproximadamente 74 % a aproximadamente 76 % de identidad de secuencia de nucleótidos. Tanto el PCV1 como el PCV2 tienen una organización genómica muy similar y son pequeños virus sin cubierta con un genoma de ADN circular monocatenario de aproximadamente 1,76

kb. El genoma del PCV contiene al menos dos marcos de lectura abiertos (ORF) funcionales: ORF1 (930 pb) codifica las proteínas Rep, implicadas en la replicación viral (A. K. Cheung, "Transcriptional analysis of porcine circovirus," *Virology* 305: 168 - 180 (2003)) y ORF2 (699 bp) codifica la principal proteína de la cápside iral inmunogénica (A. K. Cheung, 2003, citado anteriormente; P. Nawagitgul y col., "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.* 9 (1):33 - 40 (January 2002); P. Nawagitgul y col., "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein," *J. Gen. Virol.* 81:2281 - 2287 (2000)).

Los intentos iniciales de reproducir el PMWS en cerdos convencionales mediante inoculación del PCV2 no tuvieron éxito (M. Balasch y col., "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 y col., "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 del PMWS clínico en cerdos gnotobióticos y cerdos convencionales con homogeneizados de tejidos de cerdos con PMWS de origen natural y con PCV2 propagado de cultivo de células produjo resultados mixtos. El PMWS clínico se reprodujo en cerdos gnotobióticos (SPF) y cerdos desprovistos de calostro y obtenidos por cesárea coinfectados con PCV2 y parvovirus porcino (PPV) (G. M. Allan y col., "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 y col., "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)), and in PCV2-inoculated gnotobiotic pigs when their immune system was activated by keyhole hemocyanin in incomplete Freund's adjuvant (S. Krakowka y col., "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)).

El PMWS clínico también se reprodujo en cerdos obtenidos por cesárea/desprovistos de calostro (CD/CD) a los que se inoculó el PCV2 solo (P. A. Harms y col., "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 coinfectados con PCV2 y o parvovirus porcino (PPV) o virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) (A. Rivora y col., "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 coinfección con PRRSV/PCV2, los signos patológicos característicos del PMWS, tales como agotamiento linfóide, inflamación granulomatosa y hepatitis necrotizante, están inducidos por el PCV2 y no por el PRRSV (P. A. Harms y col., 2001, citado anteriormente). Sin embargo, el PMWS clínico no se reprodujo en cerdos gnotobióticos infectados con el PCV2 solo (G. M. Allan y col., "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 y col., "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 y col., "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 y col., 1999, citado anteriormente; J. Ellis y col., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets," *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:3 - 14 (1999); S. Kennedy y col., "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 y col., 2001, citado anteriormente; S. Krakowka y col., 2000, citado anteriormente; R. M. Pogranichnyy y col., "Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection," *Viral. Immunol.* 13:143 - 153 (2000)). Los inóculos usados en estos estudios eran homogeneizados de tejidos de cerdos con PMWS natural o virus propagado en cultivos de células PK-15 clínico no se reprodujo en cerdos gnotobióticos infectados con el PCV2 solo (G. M. Allan y col., "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 y col., "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 y col., "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 y col., 1999, citado anteriormente; J. Ellis y col., 1999, citado anteriormente; S. Kennedy y col., 2000, citado anteriormente; S. Krakowka y col., 2001, citado anteriormente; S. Krakowka y col., 2000, citado anteriormente; R. M. Pogranichnyy y col., 2000, citado anteriormente). Ya que los homogeneizados de tejidos pueden contener otros agentes porcinos frecuentes tales como el PPV y el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (G. M. Allan y col., "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 y col., "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, citado anteriormente; J. A. Ellis y col., "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 y col., 2000, citado anteriormente), y dado que la línea celular ATCC PK-15 utilizada para la propagación PCV" se infectó de forma persistente con PCV1 (G. C. Dulac and A. Afshar, 1989, citado anteriormente), la enfermedad clínica y las lesiones patológicas reproducidas en estos estudios pueden no atribuirse

exclusivamente a la infección por PCV2 (G. M. Allan y col., "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 y col., "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 y col., "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, citado anteriormente; J. A. Ellis y col., 2000, citado anteriormente).

El PMWS clínico también se ha reproducido en cerdos CDCD a los que se ha inoculado PCV2 cuando se vacunan con *Mycoplasma hyopneumoniae* (G. M. Allan y col., "Immunostimulation, PCV-2 and PMWS," Vet. Rec. 147:171 - 172 (2000)). Dos recientes estudios de campo realizados por G. M. Allan y col., "Neonatal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae* and postweaning multisystemic wasting syndrome: a field trial," Pig J. 48:34 - 41 (2001), y S. C. Kyriakis y col., "The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome," J. Comp. Pathol. 126:38 - 46 (2002), analizaron el efecto de la inmunomodulación mediante la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* sobre el desarrollo del PMWS en rebaños endémicos y mostraron 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 no pudo reproducir este efecto, lo que sugiere que las vacunaciones con *M. hyopneumoniae* pueden potencialmente influir en el desarrollo del PMWS clínico, pero claramente es una función secundaria a una infección de PCV2. Basándose en estos y otros estudios, no obstante, se considera que el PCV2 es el agente causante principal pero no exclusivo del PMWS.

La falta de una reserva de virus infeccioso de una forma biológicamente pura de PCV2 ha dificultado la comprensión de la patogenia de PCV2 y el papel etiológico del PCV2 en el PMWS. Las vacunaciones contra el PPV, y posiblemente el 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 pero potente dirigida de manera de manera específica al PMWS ha sido difícil. Existe una clara necesidad reconocida en la técnica en el campo veterinario de producir una vacuna eficaz y segura contra infecciones por PCV2 y el 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 a especies aviares, y del circovirus porcino (PCV). La patente proporciona composiciones de vacuna que comprenden ADN o ARNm desnudos y desvela un vector de ácido nucleico para la expresión transitoria de PCV en una célula eucariótica que comprende una secuencia reguladora de la transcripción o de la traducción de acción cis derivada del promotor o potenciador del gen inmediato o temprano del citomegalovirus humano unido funcionalmente a ácido nucleico de la secuencia. Sin embargo, ya que el ADN del PCV deriva únicamente de la línea celular PK-15, es probable que comprenda el PCV1 no patógeno descubierto hace casi 30 años por I. Tischer y col., 1974, citado anteriormente, y, por lo tanto, es probable que no sea capaz de provocar una respuesta inmune a PCV2 por infecciones provocadas por PCV2. Las vacunas de subunidades de proteínas recombinantes hechas a partir de vectores que comprenden marcos de lectura abiertos también se han sugerido en la patente, pero los marcos abiertos de lectura del PCV no están bien caracterizados ni se distinguen uno de otro. Ya que la fuente del ADN de PCV son las células de PK-15, las proteínas preparadas a partir de dichos vectores que comprenden los marcos lectura abiertos del PCV1 no poseerían propiedades inmunogénicas fiables, si las hay, contra PCV2.

El documento WO 03/049703 y Fenaux *et al.* (J Virol 77 (20): 11232 - 11243) describe clones de AND infeccioso quiméricos de PCV contruidos a partir de PCV1, en los que el gen del ORF inmunogénico del PVC2 sustituye a un gen en la misma posición en el PCV1.

La Patente de Estados Unidos N° (Allan *et al.*) y la Patente Francesa N° 2.781.159B se refiere 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 a su uso en combinación con al menos un antígeno de parvovirus porcino en composiciones inmunogénicas. Las proteínas codificadas por los marcos lectura abiertos (ORF) del PCV2 que consisten en de ORF1 a ORF13 se describen ampliamente en la patente, pero no es ilustración de cualquier proteína específica que muestra propiedades inmunogénicas. La patente divulga adicionalmente vectores que consiste en plásmidos de ADN, 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 Estados Unidos N° 6.391.314 B1; la Patente de Estados Unidos 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 de PCV1 o PCV2 o los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de diversas cepas.

Sin embargo, el PCV1 no patógeno no será útil contra las infecciones con PCV2 y las capas patógenas del 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 volver a 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 provocados 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 nuevo de la presente invención es capaz de satisfacer esa necesidad existente desde hace mucho tiempo mediante única y ventajosamente la retención del fenotipo no patógeno de PCV1 pero provocando una respuesta inmunitaria específica contra el PCV2 patógeno.

El PCV2 produce lesiones patológicas características del PMWS en cerdos libres de patógenos específicos (SPF, mientras que el PCV1 no lo hace (M. Fenaux y *col.*, 2002, citado anteriormente). Basándose en los estudios actuales, también se observa que el PCV1 derivado de cultivo celular se replica de manera más eficiente en las células PK-15 que el PCV2 (véase también M. Fenaux y *col.*, "Immunogenicity and pathogenicity of the chimeric infectious DNA clones between pathogenic type 2 porcine circovirus (PCV2) and non-pathogenic PCV1 in weaning pigs," J. Virol. 77:11232 - 11243 (2003)). Sin embargo, no se conocen los determinantes genéticos para la patogenicidad de PCV2 en cerdos y en la capacidad de crecimiento mejorada del PCV1 en células PK-15. Por lo tanto, otro conjunto de objetivos de la presente invención es identificar y caracterizar los determinantes genéticos para la patogenicidad PCV2 *in vivo* y para la replicación *in vitro*.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico quimérico de circovirus porcino (PCV1-2) como se define en las reivindicaciones adjuntas. La nueva línea quimérica, virus genéticamente avirulentos, están formados por la estructura genómica del PCV1 no patógeno en la que un gen de ORF2 inmunogénico de una cepa de PCV2 patogénica sustituye a un gen del CV1 en la misma posición correspondiente. La invención abarca los plásmidos, vectores virales y similares biológicamente funcionales que contienen las nuevas moléculas de ácido nucleico recombinante descritas en el presente documento, células huésped adecuadas transfectadas por los vectores que comprenden el ADN y los productos de expresión del polipéptido inmunogénicos. Dentro del alcance de la presente invención se incluye el uso de una vacunas de la invención en un nuevo procedimiento para proteger a los cerdos contra la infección viral o el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS) causados por el PCV2, que comprende administrar a un cerdo que necesite dicha protección una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna que comprende, por ejemplo, el ADN quimérico clonado en un plásmido, un virus quimérico derivado del clon de ADN quimérico, los productos polipeptídicos expresados a partir del ADN descrito en el presente documento etc. En el presente documento también se describen nuevos mutantes del gen y la proteína de la cápside inmunogénica del PCCV2. Dichas mutaciones están presentes en los clones quiméricos de la invención y facilitan el crecimiento del cultivo celular y garantizan la seguridad de la vacuna. En el presente documento también se describen nuevos clones de ADN molecular infecciosos del PCV2 y de ADN quimérico recíproco del PVC que encuentran uso como modelos experimentales en la obtención y caracterización de nuevas vacunas virales avirulentas.

Breve descripción de las figuras

Los antecedentes de la invención y su desviación con respecto a la técnica se describirán adicionalmente en el presente documento más adelante con referencia a las figuras que acompañan, en las que:

La 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 mediante 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 ha digerido previamente con la enzima *SacII* para producir un clon de ADN de PCV2 molecular.

Figuras 2A y 2B ilustran que el ADN plasmídico 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 plasmídico de PCV2 clonado. El inmunomarcaje intenso del antígeno de PCV2 se visualiza en el núcleo y, en un menor grado, en el citoplasma de las células transfectadas. La Figura 2B muestra las células PK-15 transfectadas de forma simulada.

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

La Figura 4A muestra un ganglio linfático normal de un cerdo de control. Hay que destacar los folículos linfoides bien definidos (flechas) (25X). La Figura 4B representa una sección microscópica del ganglio linfático traqueobronquial del cerdo de la Figura 3A al que se ha inoculado 21 días antes por vía intralinfoide el ADN genómico de PCV2 clonado. Los folículos linfoides están mal definidos, existe una depleción linfoide leve o moderada y una inflamación granulomatosa multifocal leve (25X). La Figura 4C representa una sección microscópica del ganglio linfático en la Figura 4B a un aumento mayor que se centra en un folículo. Hay que

destacar el folículo mal definido con macrófagos y células gigantes (flecha) sustituyendo a los linfocitos foliculares (64X). La Figura 4D ilustra la detección inmunohistoquímica del antígeno del PCV2 en el mismo ganglio linfático que la Figura 4B en macrófagos (flechas) y células gigantes (puntas de flecha pequeñas) y células de tipo dendrítico (puntas de flecha grandes) en los folículos (64X).

Figura 5 ilustra la construcción de un clon de ADN de PCV1-2 quimérico (PCV1/PCV2) con el genoma de PCV1 no patógeno portador del gen de la cápside del ORF2 inmunogénico del PCV2 patógeno. El clon de ADN dimerizado se usa para la transfección *in vitro* de células PK-15 para producir virus quimérico vivo que expresa la proteína de ORF2 del PCV2 y experimentos animales *in vivo* para confirmar la actividad.

La Figura 6 representa la construcción y organización de los 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, citado anteriormente). 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 cápside de ORF2 de PCV1 con el del PCV2 en la estructura central genómica del PCV1 no patógeno en el vector pSK. El Clon de ADN de PCV2 - 1 quimérico recíproco se construye reemplazando el gen de la cápside de ORF2 de PCV2 patógeno por el del PCV1 no patógeno en la estructura central genómica del PCV2 patógeno 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.

Las Figuras 7A-7J demuestran que los clones de ADN de PCV1, PCV2, PCV1-2 quiméricos 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 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 del 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.

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

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

La Figura 10 representa la secuencia de ADN de 702 pb (secuencia de 699 pb más el codón de terminación de 3 nucleótidos) del gen de la cápside de ORF2 inmunogénica del ADN de PCV1-2 quimérico clonado (que corresponde a la SEC ID N° 3).

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

La Figura 12 muestra las curvas de crecimiento en una etapa de PCV1, PCV2 VP1 y PCV2 VP120. Los cultivos de células PK-15 sincronizados por duplicado se infectan cada uno con PCV1, PCV2 VP1 or PCV2 VP120, todos ellos a un MOI de 0,1. Todos los virus tienen un título de aproximadamente 10^{15} DICT₅₀/ml a las 12 horas de la inoculación. PCV1 y PCV2 VP120 se replican de manera más eficiente *in vitro* que PCV2 VP1 ($p = 0,0053$).

La Figura 13 es un diagrama esquemático de las mutaciones de aminoácidos en la proteína de la cápside durante los pases en serie de PCV2 en células PK-15. El número de pases en serie se indican como VP1, VP30, VP60, VP90 y VP120. Los aislados de campo conocidos de PCV2 y PCV1 de diferentes orígenes geográficos también se comparan estas dos mutaciones.

La Figura 14 muestra los resultados de la PCR en tiempo real cuantitativa de cargas de copias genómicas virales de PCV2 VP1 y PCV2 VP120 en 1 ml de muestra de suero recogida -1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días después de la inoculación (DPI) de los cerdos de los grupos 1, 2 y 3. Los cerdos del grupo 2 a los que se ha inoculado PCV2 VP120 que son positivos para el ADN de PCV2 se indican con una σ . Los números (10, 9, 8, 6, 5, 5) dentro del símbolo Δ en el eje X indican el número de cerdos del Grupo 2 que son negativos para la viremia de PCV2 en la respectiva DPI. Los cerdos del grupo 3 a los que se ha inoculado PCV2 VP1 que son positivos para el ADN de PCV2 se indican con el símbolo O. Los números (3, 2, 2, 2, 2, 4) dentro del símbolo O en el eje X indican el número de cerdos del Grupo 3 que son negativos para la viremia de PCV2 en la respectiva DPI. Las cargas de copias genómicas de PCV2 se representan como un registro del número de copias por 1 ml de suero (eje Y).

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico quimérico y molecular infeccioso de circovirus porcino (PCV), virus quiméricos vivos producidos a partir de la molécula de ácido nucleico quimérico y vacunas veterinarias para proteger a los cerdos de la infección viral o del síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS) provocado por el PCV2. La invención además proporciona productos de expresión polipeptídicos inmunogénicos que se pueden usar como vacunas. También se describen dos nuevas mutaciones de nucleótidos del gen de la cápside inmunogénica del PCV2 que tiene como resultado en dos nuevas mutaciones de aminoácidos de la proteína de la cápside inmunogénica del PCV2 que se ha demostrado que son responsables del aumento de la tasa de crecimiento *in vitro* y la atenuación de la virulencia *in vivo* y, por lo tanto, se utilizan en la molécula quimérica de ácido nucleico de la presente invención.

La nueva molécula de ADN no virulenta, quimérica infecciosa de PCV (PCV1-2) comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV1 infeccioso no patógeno que contiene un gen de marco de lectura abierto (ORF) (de un PCV2 patógeno en lugar de un gen de ORF en el genoma de PCV1. El clon de ADN de PCV1-2 quimérico infeccioso contiene el gen de la cápside infecciosa (ORF2) del ADN de PCV2 clonado en la estructura central genómica del clon de ADN de PCV1 infeccioso, no patógeno. En el clon PCV1 - 2 quimérico de la invención, el gen de la cápside del ADN de PCV2 reemplaza el gen de ORF2 del ADN de PCV1 en la estructura genómica de PCV1 no patógeno. Adicionalmente se contempla que se puede construir una diversidad de permutaciones posicionales mediante ingeniería genética para obtener otros clones de ADN quiméricos no virulentos o atenuados. El clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco 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 cápside 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 quimérico recíproco puede encontrar uso en la preparación de vacunas confeccionadas especialmente.

Se muestra que el ADN genómico clonado de PCV2 descrito en el presente documento 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 del PMWS en cerdos, lo que permite una caracterización mejorada de la enfermedad clínica y el conocimiento de la 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 el 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 mediante la administración *in vivo* a cerdos. En células PK-15 transfectadas, el clon de ADN de PCV1-2 quimérico expresa el antígeno de la cápside de PCV2 (la proteína de la cápside inmunogénica de PCV2), mientras que el clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco expresa el antígeno de la cápside de PCV1, que se demuestra mediante ensayo de inmunofluorescencia (IFA) usando anticuerpos específicos para el antígeno de la cápside de PCV1 o PCV2. La seroconversión al anticuerpo específico de PCV2 se detecta en cerdos a los que se ha inoculado 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 anticuerpos específicos de PCV2 en cerdos infectados y, por consiguiente, actúa protegiendo a los cerdos inoculados frente a la infección con PCV2.

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

Sorprendentemente y ventajosamente, el clon de ADN de PCV1-2 infeccioso quimérico que tiene el gen de la cápside inmunogénica (ORF2) del PCV2 patógeno clonado en la estructura central genómica de PCV1 no patógeno induce una respuesta de anticuerpos específicos del antígeno de la cápside de PCV2 patógeno, al tiempo que únicamente retiene la naturaleza no patogénica de PCV1 en cerdos. Los animales a los que se ha inoculado el clon de ADN de PCV1-2 infeccioso quimérico desarrollan una infección leve que se asemeja a la de los animales a los que se ha inoculado PCV1, al tiempo que seroconvierten al anticuerpo contra la proteína de la cápside de ORF2 del PCV2 patógeno. La duración promedio de la viremia observada en animales a los que se ha inoculado PCV1 y PCV1-2 quimérico es más corta, 0,625 semanas y 1 semana respectivamente, que la de los animales a los que se ha inoculado PCV2 patógeno, que es de aproximadamente 2,12 semanas. La falta de viremia de PCV1-2 quimérica detectable en algunos animales inoculados no afecta a la seroconversión a anticuerpo contra la proteína de la cápside de ORF2 de PCV2 en los cerdos a los que se ha inoculado PCV1-2 (Grupo 4). Los resultados indican que, incluso aunque la viremia de PCV1-2 quimérico es corta o indetectable en algunos animales inoculados, el virus de PCV1-2 quimérico es capaz de inducir respuesta de anticuerpos contra la proteína de la cápside de ORF2 de PCV2. La capacidad específica del clon de ADN infeccioso de PCV1-2 quimérico para inducir la respuesta inmune específica de la proteína de la cápside de ORF2 inmunogénica de PCV2 aunque permanece no patogénica 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 nuevas moléculas de ácido nucleico purificadas y aisladas de la presente invención comprenden la secuencia de ADN de longitud completa del ADN de PCV1-2 quimérico clonado 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 cadena complementaria (es decir, los pares de bases inversos y opuestos) o las secuencias de nucleótidos que tienen al menos un 95 % de homología con la secuencia de nucleótidos quimérica (es decir, una parte significativa activa del gen completo) y comprenden además mutaciones en el gen de ORF2 de PCV2 que incluye una guanina en la posición del nucleótido 328 (mutación C a G) y una citosina en la posición nucleotídica 573

(mutación A a C). Los procedimientos convencionales que se conocen bien en la técnica se pueden usar para preparar las cadenas complementarias o las secuencias de nucleótidos que poseen alta homología, por ejemplo, mediante técnicas de hibridación de rigurosidad estándar o alta reconocidas en la materia. La molécula de ácido nucleico purificada y aislada que comprende la secuencia de ADN del gen de la cápside inmunogénica del ADN de PCV1-2 quimérico clonado también se establece en la SEC ID N° 3 y la Figura 10.

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

También se incluyen dentro del alcance de la presente invención plásmidos, vectores virales biológicamente funcionales y similares que contienen las nuevas moléculas de ácido nucleico recombinante descritas en el presente documento, células huésped adecuadas transfectadas por los vectores que comprenden los clones de ADN quiméricos y moleculares y los productos de expresión del polipéptido inmunogénicos. Una proteína inmunogénica particularmente preferida tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 4 y la Figura 11 y comprende las mutaciones P110A y R191S en la secuencia de aminoácidos. Las variantes biológicamente activas de la misma también están abarcadas por la invención. El experto en la técnica conocerá cómo modificar, sustituir, suprimir, etc, aminoácido(s) de la secuencia de polipéptidos y producirá variantes biológicamente activas que retienen la misma, o sustancialmente la misma, actividad que la secuencia parental sin un esfuerzo excesivo.

Para producir los productos de polipéptido inmunogénicos de la presente invención, el procedimiento puede incluir las siguientes etapas: crecimiento, en condiciones nutritivas adecuadas, células huésped procariotas o eucariotas transfectadas con las nuevas moléculas de ácidos nucleicos recombinantes descritas en el presente documento de una manera que permita la expresión de dichos productos de polipéptidos, y aislar los productos polipeptídicos 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 similar.

La presente invención se refiere a nuevas mutaciones de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen de la cápside y la proteína inmunogénica de PCV2. El PCV2 es el agente causal principal de síndrome multisistémico de desmedro posdestete (PMWS), mientras que el circovirus porcino de tipo 1 derivado de cultivos en células PK-15 (PCV1) es no patógeno para los cerdos. Los mecanismos moleculares de la replicación y la patogenia de PCV2 se conocen poco. Como se describe completamente en el presente documento, la identificación y el aislamiento importantes de dos mutaciones de aminoácidos dentro de la proteína de la cápside de PCV2 que son vitales para la patogenicidad de PCV2 *in vivo* y la capacidad mejorada del crecimiento en células PK-15 proporciona un mecanismo viable mediante el cual la vacuna de PCV1 - 2 quimérico la presente invención puede crecer mejor en cultivos celulares o hacerse más segura en las vacunas.

Para identificar determinantes genéticos de la virulencia y la replicación, un aislado de PCV2 patógeno se somete a pases en serie 120 veces en células PK-15 y los virus que se cosechan a partir de los pases 1 (VP1) y 120 (VP120) se caracterizan biológicamente, genéticamente y experimentalmente. Una curva de crecimiento de una etapa se utiliza para comparar las características de crecimiento de PCV1, PCV2 VP1 y PCV2 VP120. Los resultados muestran que el virus PCV2 VP120 se replica a un título similar al de PCV1 pero con más eficiencia que PCV2 VP1 en células PK-15 con al menos 1 log de diferencia. Se determinan las secuencias genómicas completas de los virus en los pases 0, 30, 60, 90 y 120. Se identifican dos nuevas secuencias de aminoácidos en el gen de la cápside tras 120 pases y se muestra que estas dos mutaciones son responsables del incremento de la tasa de crecimiento *in vitro* y de la atenuación de la virulencia *in vivo*. Solo existen dos diferencias nucleotídicas también citosina a guanina (C a G) y adenina a citosina (A a C), ambas mutaciones no silentes que tienen como resultado dos cambios de aminoácidos. La primera mutación se produce en el pase 30, en el que una prolina en la posición 110 de la proteína de la cápside está sustituida por una alanina (P110A), y esta mutación permanece en los pases posteriores. En la posición 328 de la secuencia de nucleótidos, la citosina cambia a guanina (C a G), lo que conduce a este cambio de aminoácidos de P110A. La segunda mutación, una sustitución de una arginina por una serina en la posición 191 de la proteína de la cápside (R191S), aparece en el pase 120, pero no en los pases anteriores. En la posición del nucleótido 573, la adenina cambia a citosina (A a C) que conduce a este segundo cambio de aminoácido de R191S.

Para caracterizar la patogenicidad del virus VP120, 31 cerdos sin patógenos específicos (SPF) se dividen aleatoriamente en tres grupos. Diez cerdos del grupo 1 reciben solución salina tamponada con fosfato como controles negativos. Once cerdos del Grupo 2 fueron inoculados por vía intramuscular e intranasal con $10^{4.9}$ DICT₅₀ de PCV2 VP120. Diez cerdos del grupo 3 son inoculados con $10^{4.9}$ DICT₅₀ de PCV2 VP1. La viremia de PCV2 se detecta en 9/10 cerdos del Grupo PCV2 VP1, pero solo en 1/11 en el grupo PCV120. La viremia en el grupo de VP1 (media 3 semanas) dura más que la del grupo VP120 (media 1,6 semanas). Además, las cargas de la copia genómica de PCV2 en suero, determinadas mediante PCR cuantitativa en tiempo real, en el grupo de VP1 PCV2 son más altas que las del grupo PCV2 VP120 ($p < 0,0001$). Las lesiones macroscópicas e histopatológicas

encontradas en cerdos a los que se ha inoculado PCV2 VP1 son más graves que las de aquellos a los que se ha inoculado PCV2 VP120 en las necropsias 21 y 42 DPI ($p = 0,0032$ y $p = 0,0274$, respectivamente). En conjunto, los resultados demuestran que las mutaciones P110A y R191S en la cápside de PCV2 potencian la capacidad de crecimiento de PCV2 *in vitro* y atenúan el virus *in vivo*.

- 5 Como resultado de las mutaciones P110A y R191S en la proteína de la cápside, PCV2 VP120 se replica de manera más eficiente ($p = 0,0053$) en células PK-15 con al menos 1 log de diferencia en el título infeccioso en comparación con el virus del pase 1. PCV2 VP120 replica a un nivel similar con PCV1 adaptado al cultivo de células PK-15 y, por lo tanto, estas dos mutaciones, ya sea solas o en conjunto, son responsables del crecimiento potenciado de PCV2 VP120 *in vitro*. Allan *et al.* (G. M. Allan y *col.*, 1994, citado anteriormente) intentaron infectar células Vero humanas con PCV1. La tinción inmune intranuclear, característica de la replicación del PCV1, no se detectó hasta sexto pase de cultivo celular en células Vero. Para el pase 15, PCV1 se replicó en células Vero de manera similar a las células PK-15. Sin embargo, no se ha notificado previamente en la literatura que 120 pases del PCV2 en la línea celular PK-15 se traducirá en una eficiencia de la replicación significativamente mejorada para imitar el PCV1 adaptado al cultivo de células PK-15.
- 10
- 15 Sorprendentemente, cuando se inocula a los lechones SPF PCV2 VP120, un menor número de cerdos desarrollan viremia con menor duración y las cargas de copias genómicas de PCV2 se compararon con las de los cerdos a los que se ha inoculado PCV2 VP1. Se muestra que el PCV1 no patógeno adaptado a las células PK-15 tiene una corta duración de la viremia promedio de 0.625 semanas en cerdos infectados. Los análisis de las puntuaciones medias brutas, microscópicas y de IHQ revelan que los cerdos a los que se ha inoculado el virus PCV2 VP120 tienen
- 20 lesiones patológicas y signos clínicos más leves que los cerdos a los que se ha inoculado el virus PCV2 VP1. Tomados en conjunto, los resultados de la presente invención muestran que PCV2 VP 120 se ha adaptado ventajosamente para crecer mejor en células PK-15 y se atenúa en la patogenicidad *in vivo*.

Después de 120 pases en las células PK-15, solo dos mutaciones de aminoácidos se detectan en el genoma completo de PCV2, lo que sugiere que el genoma de PCV2 es relativamente estable. Esto puede explicar por qué las secuencias de todos los aislados de campo de PCV2 conocidos identificados hasta la fecha están muy conservadas (M. Fenaux y *col.*, 2002, citado anteriormente; R. Larochelle y *col.*, 2002, citado anteriormente). La mutación P110A se produce sorprendentemente temprano (pase 30) durante el pase en serie e implica en dos aminoácidos hidrófobos, prolina y alanina. El cambio de prolina a alanina puede alterar la estructura terciaria de la proteína de la cápside, ya que la prolina a menudo está implicada en las regiones de flexión de estructuras proteicas. Esta mutación P110A se mantiene después en los pases superiores posteriores, incluyendo el pase 120. La singularidad de la mutación P110A retenida a través del pase 120 en comparación con las secuencias de aislados de campo conocidos de PCV1 y PCV2 correlaciona fuertemente la mutación con una función biológica. La mutación R191S se produce muy tarde durante el pase en serie (entre los pases 90 y 120), y también es única para el VP120 dado que los aislados conocidos de PCV2 y PCV1 no tienen un residuo de serina en esta posición. Sólo las sustituciones de glicina, alanina y treonina en esta posición se han identificado previamente en aislados de campo de PCV1 y PCV2.

25

30

35

Las sustituciones de aminoácidos inducidas por el pase de cultivo celular o técnicas de mutagénesis químicas se han utilizado rutinariamente para la atenuación de muchos virus y han conducido a las producciones de muchas vacunas (G.F. Brooks y *col.*, "Pathogenesis & control of viral diseases," En: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 21^a Ed. (Publishers Appleton & Lange) 30: 363 - 365 (1998)). Una única sustitución de aminoácidos puede conducir a la atenuación de un virus. por ejemplo, anteriormente se ha informado que la sustitución de una prolina por una leucina en el residuo 101 de la proteína 4B no estructural del virus del dengue 4 transmitido por mosquitos (DEN4) tuvo como resultado la disminución de la replicación viral en mosquitos, pero un aumento proporcional de la replicación en células Vero humanas (K.A. Hanley y *col.*, "A trade-off in replication in mosquito versus mammalian systems conferred by a point mutation in the NS4B protein of dengue virus type 4," Virology. 312:222 - 232 (2003)). Por lo tanto, el control de equilibrio de la replicación eficiente de virus DEN4 en los mosquitos o en las células Vero humanas se mantuvo por un único cambio de aminoácido. En la familia *Circoviridae*, se encontró que una única mutación de aminoácido en la proteína de la cápside de VP1 del CAV era responsable de la patogenicidad del virus en pollos (S. Yamaguchi y *col.*, "Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus," J. Gen. Virol. 82: 1233 - 1238 (2001)). Tomados en conjunto, los resultados de la presente invención correlacionan fuertemente la mutación con la actividad biológica y demuestran que P110A, R191S o en conjunto, es responsable de la atenuación de PCV2 VP120 en cerdos o de la capacidad de crecimiento mejorada del PCV2 en células PK-15.

40

45

50

Dado que los resultados de la presente invención demuestran que las mutaciones P110A y R191S la cápside de PCV2 potencian la capacidad de crecimiento de PCV2 *in vitro* y atenúan el virus *in vivo*, las mutaciones P110A y R191S (tanto individualmente como colectivamente) se introducen ventajosamente en el gen de la cápside de la vacuna de la PCV1 - 2 quimérico y hacen que la vacuna de PCV1 - 2 quimérica de la invención crezca mejor en cultivos celulares o la convierten en más segura en cerdos. Esto se logra mediante la inserción del gen de la cápside inmunogénica mutado que contiene las nuevas mutaciones P110A y R191S en los clones quiméricos en lugar de utilizar el ORF2 de PCV2 patógeno. Las mutaciones se introducen en el gen de la cápside de la vacuna de PCV1 - 2 usando técnicas reconocidas en la materia tales como las que se encuentran en el manual de instrucciones para el kit QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit disponible comercialmente en Stratagene Inc., La Jolla, CA.

55

60

Como alternativa, el ORF2 de PCV2 mutado para su uso en el virus quimérico se puede hacer mediante procedimientos de síntesis bioquímica bien conocida para sustituir uno o ambos de los aminoácidos prolina y arginina por alanina y serina en las posiciones 110 y 191, respectivamente, de la proteína inmunogénica de la cápside. Los clones mutantes finales pueden secuenciarse fácilmente para asegurar que las mutaciones previstas P110A, R191S o ambas se introducen correctamente y no hay otra mutación insólita. La vacuna de PCV1 - 2 que contiene la mutación puede analizarse adicionalmente en cultivo celular mediante procedimientos de rutina para seleccionar la combinación que facilita el crecimiento de cultivo celular o asegura medidas de seguridad mejoradas cuando se vacuna a cerdos debido a la atenuación adicional de las propiedades virulentas de PCV2, si persiste alguna. Si bien el beneficio de la quimera PCV1 - 2 radica en su rasgo avirulento natural, el uso del ORF2 de PC2 murado para preparar la quimera PCV1 - 2 de la invención proporciona una alternativa que está disponible si es necesario más protector de la vacuna quimérica natural viva.

Las vacunas de los clones de ADN virales y moleculares quiméricos y los procedimientos de uso de los mismos también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Los cerdos inoculados son protegidos de la infección viral grave y del PMWA causado por el PCV2. El nuevo procedimiento protege a los cerdos que necesitan protección contra la infección viral o el PMWS mediante la administración al cerdo de una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna de acuerdo con la invención, tal como, por ejemplo, una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica del ADN de PCV1-2 quimérico, el virus quimérico clonado, un plásmido o vector viral que contiene el ADN quimérico de PCV1-2, los productos de expresión polipeptídicos, el ADN recombinante de PCV2 etc. Otros antígenos tales como PRRSV, PPV, otros agentes porcinos infecciosos y estimulantes inmunitarios se pueden administrar simultáneamente al cerdo para proporcionar un amplio espectro de protección contra infecciones virales.

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 quimérico vivo, un virus quimérico inactivado, etc. en combinación con un vehículo no tóxico fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más adyuvantes. La vacuna también puede comprender el clon de ADN molecular de PCV2 infeccioso descrita en este documento. Se prefieren el ADN de PCV1-2 quimérico infeccioso, el ADN plasmídico que contiene el genoma viral quimérico infeccioso y el virus quimérico vivo, siendo el virus quimérico vivo el más preferido. 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 su estado virulento o bien virus enteros propagados en cultivo de células muertas que no inducen suficiente respuesta inmunitaria de anticuerpos para la protección contra la enfermedad viral.

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 momento 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 el sitio en el que la vacuna se administra. Los adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, hidróxido de aluminio (alúmina), complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), polímeros o copolímeros de bloque no iónicos, citocinas (como IL-1, IL-2, IL-7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.), saponinas, monofosforil lípido A (MLA), dipéptidos de muramilo (MDP) y similares. Otros adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, sulfato de aluminio y potasio, enterotoxina termolábil o termoestable aislada de *Escherichia coli*, toxina del cólera o la subunidad B de la misma, toxina diftérica, toxina del tétanos, toxina de pertussis, adyuvante incompleto o completo de Freund, etc. Los adyuvantes basados en toxinas, tales como la toxina diftérica, la toxina de tétanos y la toxina pertussis también se pueden inactivar antes de usar, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído.

Las vacunas pueden contener además antígenos adicionales para estimular la actividad inmunológica de los clones de ADN de PCV quimérico infeccioso, por ejemplo, el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), el parvovirus porcino (PPV), otros agentes porcinos infecciosos y estimulantes inmunitarios.

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

La vacuna viral viva es en general la vacuna más deseable, ya que todas las respuestas inmunitarias posibles están activadas en el receptor de la vacuna, incluyendo las respuestas inmunitarias sistémicas, locales, humorales y mediadas por células. Por otra parte, una vacuna muerta solo puede inducir respuesta inmunitaria humoral. Aunque las más deseables, sin embargo, las vacunas virales vivas tienen varias desventajas, tal como el riesgo potencial de contaminación con agentes virales adventicios vivos o el riesgo de que el virus pueda volver a ser virulento en el campo. De manera notable, el ADN quimérico de PCV1-2 único de la presente invención supera esas desventajas. Usando solamente los genes inmunogénicos del PCV2 patógeno, el ADN quimérico construye un virus quimérico vivo en replicación que es no patógeno, aunque provoca las respuestas inmunitarias completas y beneficiosas de las vacunas virales vivas contra el virus de PCV2 patógeno. La vacuna de virus vivos basada en el virus quimérico

tendrá pocas oportunidades, si tiene alguna, de volver 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 afirmada únicamente sobre PCV2 para inmunidad contra las infecciones por PCV2.

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

10 Las vacunas de virus inactivados se pueden preparar mediante tratamiento del virus quimérico derivado del ADN de PCV clonado 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 la 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 la luz u otra fuente de energía durante un tiempo suficiente para inactivar el virus. . El virus se considera inactivador si es incapaz de infectar una célula susceptible a infección.

20 La preparación de vacunas de subunidades típicamente difiere de la preparación de una vacuna viva modificada o una vacuna inactivada. Antes de la preparación de una vacuna de subunidad, se deben identificar los componentes de protección o antigénicos de la vacuna. Tales componentes protectores o antigénicos incluyen ciertos segmentos o fragmentos de aminoácidos de las proteínas de la cápside viral que provocan una respuesta protectora o inmunológica particularmente fuerte en cerdos; las propias proteínas de la cápside viral únicas o múltiples, oligómeros de las mismas asociaciones de orden superior de las proteínas de la cápside viral que forman subestructuras de virus o partes o unidades identificables de tales subestructuras; oligoglicósidos, 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. Preferiblemente, se usa una proteína de la cápside, tales como la proteína codificada por el gen de ORF2, como el componente antigénico de la vacuna de subunidad. También se pueden utilizar otras proteínas codificadas por el clon de ADN infeccioso. Estos componentes inmunogénicos se identifican fácilmente por procedimientos conocidos en la técnica. Una vez identificadas, las porciones protectoras o antigénicas del virus (es decir, el "subunidad") se purifican y/o se clonan posteriormente mediante procedimientos conocidos en la técnica. La vacuna de subunidad proporciona una ventaja sobre otras vacunas basadas en el virus vivo, ya que la subunidad, tales como subunidades altamente purificadas del virus, es menos tóxica que el virus completo.

Si la vacuna de subunidad se produce a través de técnicas genéticas recombinantes, la expresión de la subunidad clonada, tal como el gen ORF2 (cápside), por ejemplo, puede optimizarse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Maniatis y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, MA., 1989). Si la subunidad que se está empleando representa una característica estructural intacta del virus, tal como una proteína de la cápside entera, el procedimiento para su aislamiento del virus debe optimizarse después. En cualquier caso, después de la optimización del protocolo de inactivación, el protocolo de purificación de la subunidad puede optimizarse antes de la fabricación.

Para preparar vacunas atenuadas a partir de clones patógenos, el PCV2 patógeno vivo adaptado al cultivo tisular se atenúa primero (se hace no patógeno o inofensivo) mediante procedimientos conocidos en la técnica, típicamente hechos mediante pases en serie con cultivos celulares. La atenuación de clones patógenos también se puede realizar 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 adicionales que mantienen el fenotipo no patógeno de PCV1 pero pueden variar en la fuerza de los caracteres de inmunogenicidad seleccionados del genoma de PCV2 mediante tecnología recombinante. De acuerdo con invención, la atenuación del PCV2 se lleva a cabo mediante la obtención de la mutación P110A y la mutación R191S en el ORF2 y utilizando el PCV2 mutante para construir virus PCV1 - 2 quiméricos como se describe en el presente documento.

La vacuna más preferida emplea el clon de ADN del virus quimérico vivo en particular, el clon que contiene los genes inmunogénicos del PCV2 clonado en la estructura central de PCV1 no patógeno. De forma ventajosa, el virus quimérico vivo, que es por naturaleza no virulento cuando se construye mediante ingeniería genética, no requiere procedimientos de atenuación que requieren mucho tiempo. El virus sirve únicamente como un virus de replicación vivo pero no patógeno que produce proteínas inmunogénicas contra PCV2 durante la replicación del virus, que después puede provocar una serie completa de respuestas inmunitarias contra el PCV2 patógeno.

Como beneficio adicional, el virus quimérico vivo preferido de la presente invención proporciona una vacuna genéticamente estable que es más fácil de preparar, almacenar y liberar 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 (ChimeriVax-JE)," J. Virol. 75 (2):934 - 942 (2001); F. Guirakhoo y col., "Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates," J. Virol. 74 (12):5477 - 5485 (2000); S. Tang y col., "Toward a poliovirus-based simian immunodeficiency virus vaccine: correlation between genetic stability and immunogenicity," J. Virol. 71 (10):7841 - 7850 (1997)). por ejemplo, se ha demostrado que la vacuna ChimeriVax-JE contra el virus de la 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 estructurales prM y E de YFV17D se reemplazan con los genes correspondientes de la cepa JEV SA14-14-2 atenuada que es genéticamente estable después de pases prolongados tanto *in vitro* como *in vivo* (J. Arroyo y col., 2001, citado anteriormente). Otra vacuna de virus quimérico ChimeriVax-D2 contra el virus del dengue de tipo 2, que es un virus quimérico atenuado de la fiebre amarilla (FA) - dengue de tipo 2 (dengue-2) también se ha encontrado que es genéticamente estable; se ha notificado que sus secuencias están inalteradas después de 18 pases en células Vero (F. Guirakhoo y col., 2000, citado anteriormente).

Otra vacuna preferida 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 completo propagado de cultivo celular vivo o muerto, la presente 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 materia. Dichas técnicas implican, entre otras, la manipulación adicional del ADN recombinante, la modificación de o las sustituciones en 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 proteínas responsables para inducir una respuesta inmunitaria o protectora más fuerte en cerdos (por ejemplo, proteínas derivadas de ORF3, ORF4, etc.). Tales genes identificados o fragmentos inmunodominantes se pueden clonar en vectores de expresión proteica estándar, tal como el vector de baculovirus, y usarse para infectar células huésped apropiadas (véase, por ejemplo, O'Reilly y col., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman & Co., 1992). Las células huésped se cultivan, de modo que expresan 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 conservan cualquier habilidad natural no deseable de causar una enfermedad, también es posible indicar con precisión las secuencias de nucleótidos en el genoma viral responsables de la virulencia residual y modificar por ingeniería genética el virus no virulento 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 y col., DNA 3:479 - 488, 1984). Se sintetiza un oligonucleótido que contiene la mutación deseada y se hibrida a una parte de ADN viral monocatenario. 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 de modo que contiene 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 materia. 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 y col., "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. Estos se pueden hibridar para formar ADN de doble cadena que se puede 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 el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (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 inmunodominantes del virus. El vector de transferencia incluye, por ejemplo, ADN de baculovirus linearizados y un plásmido que contiene los polinucleótidos deseados. La línea de células huésped se puede cotransfectar con el ADN de baculovirus linearizado y un plásmido con el fin de preparar un baculovirus recombinante.

De manera alternativa, el ADN de un cerdo que sufre el PMWS, que codifica una o más proteínas de la cápside, el clon de ADN de PCV2 molecular infeccioso o el genoma de ADN quimérico de PCV clonado se puede 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 se inocula al cerdo se puede determinar fácilmente o valorar fácilmente mediante pruebas de rutina. Una cantidad eficaz es una en la que se alcanza una respuesta inmunológica suficiente a la vacuna para proteger al cerdo expuesto al virus que provoca PMWS. Preferiblemente, el cerdo se protege hasta un grado en el que de 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 puede administrarse en una dosis única o en dosis repetidas. Las dosificaciones pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 1.000 microgramos del ADN plasmídico que contiene el genoma de ADN quimérico infeccioso (dependiente de la concentración del componente inactivo de la vacuna), preferentemente de 100 a 200 microgramos del clon de ADN de PCV1 – 2 quimérico, pero no debe contener una cantidad de antígeno basado en virus que dé como resultado una reacción adversa o síntomas fisiológicos de infección viral. En la técnica se conocen procedimientos para determinar o valorar las dosificaciones adecuadas del agente antigénico activo para encontrar dosis eficaces mínimas basadas en el peso del cerdo, la concentración del antígeno y otros factores típicos. Preferiblemente, el clon de ADN viral quimérico infeccioso se usa como una vacuna, o virus quimérico infeccioso vivo, se puede generar *in vitro* y después el virus quimérico vivo se usa como una vacuna. En ese caso, se puede administrar a un cerdo de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 del 50 % de la dosis infectiva en cultivo tisular (DICT₅₀) del virus quimérico.

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 formas antigénicas del mismo se puede administrar de forma conveniente 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, entre otras, 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 tenido éxito en otros estudios usando clones de ADN virales infecciosos (E. E. Sparger y col., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," *Virology* 238:157 - 160 (1997); L. Willems y col., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," *Virology* 189:775 - 777 (1992)), estas vías son las más preferidas, además de la vía de administración intranasal. Aunque menos conveniente, también se contempla que la vacuna se proporciona al cerdo a través de la vía de inoculación intralinfoide. Un procedimiento de administración único altamente preferido implica directamente la inyección en el cerdo del ADN de plásmido que contiene la quimera de PCV1-2 por vía intramuscular, intradérmica, intralinfoide, etc.

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 se conocen 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, entre otros, agua, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, etc. Los aditivos típicos son, por ejemplo, colorantes certificados, aromas, edulcorantes y conservantes antimicrobianos tal como timerosal (etilmercuritiosalicilato de sodio). Tales soluciones se pueden estabilizar, por ejemplo, mediante la adición de gelatina parcialmente hidrolizada, sorbitol o medio de cultivo celular y se pueden tamponar mediante procedimientos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como hidrógenofosfato sódico, dihidrógenofosfato sódico, hidrógenofosfato potásico, dihidrógenofosfato potásico, una mezcla de los mismos, y similares.

Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión o emulsionantes y en combinación con otros coformulantes estándar. 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.

Las formulaciones parenterales, diseñadas para inyección en sistemas de fluidos corporales, requieren isotonicidad apropiada y amortiguación de pH a los niveles correspondientes de los fluidos corporales porcinos. La isotonicidad se puede ajustar de manera apropiada con cloruro sódico y otras sales según sea necesario. Los disolventes adecuados, tales como etanol o propilenglicol, 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 presente vacuna incluyen, entre otros, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las formas de dosificación parenteral también se pueden esterilizar antes de usar.

Otra realización de la presente invención implica un nuevo procedimiento de preparación de una molécula de ácido nucleico quimérico de PCV1-2 infeccioso no patógeno que comprende la eliminación de un gen del marco de lectura abierto (ORF) de una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV1 infeccioso no patógeno, reemplazando la misma posición con un gen de ORF inmunogénico de una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV2 infeccioso patógeno y recuperando la molécula de ácido nucleico quimérico. La molécula de ácido nucleico es típicamente ADN. 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 infeccioso del PCV2 descrito en el presente documento. Se contempla que otras posiciones de ORF o fragmentos inmunogénicos de las mismas se pueden

intercambiar entre el ADN de PCV1 y PCV2 para construir los clones de ADN quimérico infeccioso atenuado de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

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

Un clon de ADN de PCV2 infeccioso se construye, como se describe en el presente documento, de manera que se puede generar una reserva de virus infeccioso biológicamente pura y homogénea para estudios de patogenia y el desarrollo de vacunas no patógenas químicas. El curso de la enfermedad clínica, la distribución del virus y las lesiones patológicas asociadas con la infección por PCV2 se caracterizan definitivamente mediante 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 descrito en la técnica, el clon de PCV2 de ADN infeccioso hecho mediante los procedimientos descritos en el presente documento contiene dos copias completas del genoma de PCV2 ligadas en repetición en tándem. Ligando dos copias del genoma en tándem proporciona un genoma circular similar que imita al genoma circular usual circular de PCV2. La ventaja de tener dos copias del genoma en tándem en el clon de ADN de PCV2 infeccioso es capaz de maximizar la replicación cuando el clon de ADN infeccioso se transfecta *in vitro* e *in vivo*. De este modo, el clon de la invención 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 agente causante del síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS). El PMWS es un síndrome de enfermedad complejo en cerdos y múltiples factores están implicados en la presentación clínica del PMWS. Sin embargo, la dificultad en producir una forma de PCV2 biológicamente pura debido a la presencia de otros agentes porcinos comunes en los homogeneizados de tejidos de cerdos enfermos ha impedido una caracterización definitiva de la enfermedad clínica y las 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 las lesiones patológicas asociadas la infección por PCV2 mediante transfección directa *in vivo* de cerdos con el clon molecular.

Se muestra que la reserva de virus vivo homogénea de PCV2 derivado del clon molecular es infecciosa *in vitro* cuando se transfecta en células PK-15. El ADN genómico del PCV2 clonado es también infeccioso cuando se inyecta directamente en los hígados y los ganglios linfáticos ilíacos superficiales de cerdos sin patógenos específicos (SPF). Los animales a los que se ha inyectado 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 los cerdos de los grupos inoculados 35 días después de la inoculación (DPI).

La aparición y duración de la viremia en cerdos a los que se ha inoculado el clon de ADN de PCV1-2 quimérico son similares a las de los cerdos a los que se ha inoculado el clon de ADN de PCV1 no patógeno, mientras que la viremia en cerdos a los que se ha inoculado 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 a los que se ha inoculado PCV2. De manera similar, la mayoría de los cerdos inoculados a los que se les practicó la necropsia el 35 DPI se seroconvirtieron a anticuerpos frente al PCV2. El antígeno de PCV2 se detecta en diversos tejidos y órganos en cerdos inoculados. Las lesiones macroscópicas se limitan a los pulmones y a los ganglios linfáticos y se caracterizan por ganglios linfáticos coloreados de color castaño sistemáticamente agrandados, pulmones que no han colapsado y focos que están coloreados con múltiples focos de color castaño suave de consolidación. Las lesiones macroscópicas que afectan a los ganglios linfáticos tanto en los cerdos inoculados con PCV1 no patógeno como en los inoculados con PCV1-2 quimérico son leves y se limitan a solamente unos pocos animales, mientras que los cerdos inoculados con PCV2 patógeno todos tienen inflamación moderada o 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. El 21 DPI, los 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 el antígeno específico de PCV2 se detectan en numerosos tejidos y órganos que incluyen cerebro, pulmón, corazón, riñón, amígdala, ganglios linfáticos, bazo, íleon e hígado de los cerdos inoculados (infectados). Las lesiones histopatológicas en varios tejidos y órganos similares a los del PMWS se reproducen con el clon de ADN molecular de PCV2 así como con el virus infeccioso preparado *in vitro* a partir de del clon de ADN molecular. Microscópicamente, tanto en 21 como en 49 DPI, los animales inoculados con PCV1-2 quimérico tienen estadísticamente menos lesiones microscópicas que los animales inoculados con PCV2. Las puntuaciones de

lesiones microscópicas en los 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 microscópicas de moderadas a graves se encuentran en múltiples tejidos de animales inoculados con PCV2 patógeno, incluyendo pulmón, hígado, linfoides, bazo, cerebro, corazón, riñón y tejido amigdalario. Sin embargo, en los animales inoculados con PCV1-2 quimérico, las lesiones microscópicas de leves a moderadas se limitan solamente a hígado, ganglios linfáticos y tejidos renales (véase la Tabla 10, más adelante).

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

La presente invención caracteriza de forma más definitiva del curso clínico y las lesiones patológicas exclusivamente atribuibles a infección por PCV2. Los presentes datos en los ejemplos ilustrativos siguientes indican que el ADN genómico de CV2 clonado fácilmente reproducido está disponible para reemplazar el virus infeccioso para los estudios de patogenia e inmunización del PCV2. Aunque el PCV2 se muestra como esencial para el desarrollo del PMWS, otros factores o agentes tales como PRRSV, PPV, etc. pueden ser necesarios para inducir el espectro completo de signos clínicos y lesiones asociados con los casos avanzados de PMWS. Sin embargo, con el conocimiento de que PCV2 es un factor clave, el nuevo clon viral de replicación infeccioso de replicación se puede modificar adicionalmente 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.

La disponibilidad del clon de ADN infeccioso de PCV2 descrito en el presente documento hace posible desarrollar la vacuna atenuada modificada por ingeniería genética para prevenir la infección por PCV2 y el PMWS en cerdos. Se sabe que el PCV2 se replica en los ganglios linfáticos, los pulmones y el hígado durante la infección natural, y uno de los principales efectos patógenos es la alteración del sistema inmunológico mediante la degradación de las estructuras linfoides (S. Krakowka y col., 2001, citado anteriormente; G. M. Allan and J. A. Ellis, 2000, citado anteriormente; S. Kennedy y col., 2000, citado anteriormente; G. J. Wellenberg y col., 2000, citado anteriormente; G. M. Allan y col., "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 y col., "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, citado anteriormente). Mediante el uso de este nuevo clon de ADN molecular infeccioso de PCV2, la enfermedad clínica, las lesiones patológicas y la distribución de virus exclusivamente atribuibles a la infección por PCV2 se caracterizan más 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 quiméricos y de PCV2-1 quimérico descritos en el presente documento. Will y col., "Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees," Nature 299:740 - 742 (1982), first demonstrated the feasibility of using a cloned hepatitis B virus DNA to infect chimpanzees by direct *in vivo* injection. Este planteamiento se ha usado desde entonces para estudiar la replicación viral y la patogenia de otros varios virus (T. W. Dubensky y col., "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 y col., "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 y col., "Risks of handling HIV," Nature 349:573 (1991); C. Seeger y col., "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 y col., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," Virology 238:157 - 160 (1997); R. Sprengel y col., "Homologous recombination between hepadnaviral genomes following *in vivo* DNA transfection: implications for studies of viral infectivity," Virology 159:454 - 456 (1987); H. Will y col., 1982, citado anteriormente; L. Willems y col., "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 mediante inyección directa del ADN de plásmido de PCV2 clonado en el hígado y ganglios linfáticos de cerdos son ventajosas para los 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 analizar diferentes regiones o genes de PCV2 para sus papeles en la replicación y la patogenia del virus en el huésped. La replicación y la patogenia del PCV2 se pueden estudiar *in vivo* sin tener que producir reservas de virus infecciosos mediante la propagación del 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 del uso de ADN genómico del PCV2 clonado, en lugar del virus vivo, para estudios animales es su relativa facilidad 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 homogeneizados de tejido en estudios animales.

En la presente invención, el gen de la cápside 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 cápside de ORF2 inmunogénico *in vitro* e *in vivo*, e indujo una respuesta de anticuerpos específica contra ORF2 de PCV2 pero mantuvo la naturaleza no patológica de PCV1. El clon de ADN infeccioso de PCV1-2 quimérico tiene la capacidad de inducir una fuerte respuesta inmunológica contra el PCV2 al tiempo que solo induce una infección limitada con lesiones patológicas leves similares a las del PCV1 no patógeno. Para el desarrollo de vacunas, los relativamente fáciles almacenamiento y estabilidad del ADN clonado y la economía del ADN de plásmido del PCV2 recombinante a gran escala y la producción del clon de ADN de PCV1-2 quimérico proporciona un medio atractivo de distribución a los cerdos de una vacuna de ADN viral viva, infecciosa o vacunas virales modificadas por ingeniería genética atenuadas. Por lo tanto, el clon de ADN de PCV1-2 infeccioso quimérico enseñado en la presente invención es un candidato a vacuna útil contra la infección con PCV2 y PMWS.

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

El clon de ADN quimérico de PCV1/PCV2 infeccioso (designación de la cepa "quimera PCV1 - 2"), el clon de ADN molecular de PCV2 infeccioso (designación de la cepa "clon de PCV2") y la reserva de PCV2 homogénea y biológicamente pura derivada de una muestra de PCV2 de Iowa que se ha aislado de un cerdo con PMWS grave y se ha identificado como el número de aislamiento 40895 (designación de la cepa "PCV2 nº 40895") están depositados en las condiciones requeridas por 37 C.F.R. § 1,808 y se han mantenido conforme al Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 - 2209, EE.UU. Las secuencias de ADN descritas en el presente documento están contenidas en plásmidos de 6.490 bp clonados en el vector pBluescript SK (+) (pSK) (Stratagene Inc., La Jolla, CA) y se transforman en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Los plásmidos que contienen el clon de ADN de PCV1-2 quimérico infeccioso (identificado como "clon de ADN infeccioso quimérico de circovirus porcino quimérico de Tipo 1 (PCV1) y de Tipo 2 (PCV2) ") y el clon de ADN molecular infeccioso de PCV2 (identificado como "clon de ADN infeccioso de circovirus porcino de Tipo 2 (PCV2) ") se han depositado en la ATCC el 7 de diciembre de 2001 y se han asignado designaciones del depósito de patentes de la ATCC PTA-3912 y PTA-3913, respectivamente. Se debe apreciar que otros plásmidos, que se pueden construir fácilmente usando mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas descritas en el presente documento, también entran dentro del alcance de la presente invención. 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 la 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 ejemplos siguientes demuestran ciertos aspectos de la presente invención. No obstante, debe entenderse que estos ejemplos son para fines ilustrativos únicamente y no deben interpretarse como completamente definitivos en lo que respecta a las condiciones o alcance de la invención. Se debe apreciar que cuando se han proporcionado condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.), también se pueden usar las condiciones tanto por encima como por debajo de los intervalos especificados, aunque en general de manera menos conveniente. Los ejemplos se llevan a cabo a temperatura ambiente (de aproximadamente 23 °C a aproximadamente 28 °C) y a presión atmosférica. Todas las partes y porcentajes mencionados en el presente documento están en base al peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados salvo que se especifique de otra manera.

Un entendimiento adicional de la invención puede obtenerse a partir de los ejemplos no limitantes que se indican a continuación.

Ejemplo 1

Generación de una línea celular PK-15 sin contaminación por PCV1

La fuente del aislamiento de PCV2 era de una muestra de tejido de bazo de un cerdo con PMWS de origen natural (número de identificación de serie PCV2 40895, denominado "aislado 40895") (M. Fenau y col., 2000, citado anteriormente). La tinción inmunohistoquímica (IHQ) con anticuerpo específico de PCV2 confirmó la presencia del antígeno de PCV2 en el tejido. Los tejidos de bazo se almacenaron a -80 °C hasta uso.

La línea celular PK-15 adquirida en la Colección Americana de Cultivos Tipo (número de acceso en la ATCC CCL-33) se infectó de manera permanente con el PCV1 (G. C. Dulac and A. Afshar, 1989, citado anteriormente). 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 del

- siguiente modo: las células PK-15 se cultivaron en MEM con sales de Earle y L-glutamina (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y 1X antibiótico (Life Technologies, Inc.). Las monocapas de células confluentes se digirieron con tripsina 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 analizaron determinar ADN del PCV1 usando un ensayo de PCR-RFLP capaz de detectar y diferenciar PCV1 y PCV2 (M. Fenaux y col., 2000, citado anteriormente). Las células PK-15 de los pocillos que dieron negativo en las pruebas 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 pase.
- Cuatro líneas celulares que eran negativas para la contaminación por PCV1 se produjeron mediante dilución de punto final de las células PK-15 infectadas de la ATCC. Las líneas celulares 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). Las células clonadas se usaron adicionalmente para la transfección *in vitro* del clon de ADN molecular de PCV2 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 para PCR de acuerdo con la secuencia publicada del aislado 40895 de PCV2 (M. Fenaux y col., 2000, citado anteriormente): cebador directo F-PCVSAC2 (5'-GAACCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGT-3'), expuesto en la SEC ID N° 5, y cebador inverso R-PCVSAC2 (5'-GCACCGCGGAAATTTCTGACAAACGTTACA-3'), expuesto en la SEC ID N° 6. Este par de cebadores amplifica el genoma completo del PCV2 con una región solapante que contiene en único sitio para la enzima de restricción *Sac*II (Fig. 1). El ADN se extrajo usando el minikit QIAamp ADN (Qiagen, Inc., Valencia, CA) a partir de una muestra de tejido de bazo de un cerdo con PMWS de origen natural (aislado 40895) (M. Fenaux y col., 2000, citado anteriormente). El ADN extraído se amplificó mediante PCR con la polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). La reacción de PCR constaba de una etapa de activación enzimática inicial a 95 °C durante 9 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 48 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 3 minutos, y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. El producto de PCR del 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 del genoma del PCV2, el producto de la PCR que contiene el genoma completo del PCV2 se ligó primero en el vector plasmídico advanTAge (Clontech, Palo Alto, CA). Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Los plásmidos recombinantes se verificaron mediante digestión con enzima de restricción. El ADN genómico del PCV2 de longitud completa se escindió del vector advanTAge mediante digestión con la enzima de restricción *Sac*II. El ADN genómico del PCV2 digerido se ligó con la ADN ligasa de T4 a 37 °C durante solamente 10 minutos, 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 del PCV2 (denominado en el presente documento un clon de ADN molecular del 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 del PCV2 (aislado 40895) se amplificó mediante PCR para construir el clon de ADN molecular de PCV2 infeccioso. Dos copias del genoma completo del PCV2 se ligaron en tándem en el vector pSK para producir el clon de ADN molecular del PCV2 (Fig. 1). La infectividad del clon de ADN molecular del PCV2 se determinó mediante transfección *in vitro* de las células PK-15. El IFA con anticuerpo específico del PCV2 confirmó que el clon de ADN molecular es infeccioso *in vitro* y que aproximadamente el 10-15 % de las células PK-15 se transfectaron. El antígeno específico del PCV2 se visualiza en el núcleo mediante IFA y, en menor grado, en el citoplasma de las células transfectadas (Fig. 2). Las células que se transfectaron de manera simulada con el vector pSK vacío permanecieron negativas para el antígeno del PCV2.

Ejemplo 3

Transfección *in vitro* con el clon de ADN molecular de PCV2 y generación de una reserva de virus PCV2 infeccioso biológicamente pura y homogénea

- Para analizar la infectividad del clon de ADN molecular *in vitro*, se cultivaron células PK-15 no contaminadas con PCV1 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 el 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 minutos 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).

5 Para generar una reserva de virus PCV2 infeccioso biológicamente pura y homogénea para el experimento de inoculación animal, se cultivaron células PK-15 no contaminadas con PCV1 en matraces de cultivo T-25 y se transfectoron con clon de ADN molecular de PCV2. Las células PK-15 se cultivaron 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, se mezclaron 12 µg del ADN plasmídico de PCV2 con 16 µl 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 incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, a la mezcla se añadieron 50 µl de Reactivo Lipofectamine diluido en 0, 35 ml de medio MEM y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla de transfección se añadió después a un matraz T-25 de células PK-15 que contenía 2, 5 ml de MEM recién preparado. Después de incubar 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 3 días después de la transfección y se almacenaron a -80 °C hasta uso. El título infeccioso de reserva de virus se determinó mediante IFA (véase más adelante).

Básicamente, se generó una reserva de virus PCV2 infeccioso biológicamente pura y homogénea 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 las células transfectadas se usaron con éxito para infectar las células PK-15. Por tanto, el clon de ADN molecular de PCV2 es capaz de producir viriones de PCV2 infeccioso cuando se transfectan *in vitro*. Se determinó que el título infeccioso de la reserva de virus PCV2 homogénea preparada a partir de células transfectadas era $1 \times 10^{4.5}$ DICT₅₀/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.

25 Ejemplo 4

Titulación de virus mediante ensayo de Inmunofluorescencia (IFA)

Para determinar el título infeccioso de la reserva de virus PCV2 homogénea, las 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 en crecimiento en los portaobjetos de cámara LabTek. Los pocillos de las células no inoculadas se incluyeron como controles. Las células infectadas se fijaron 3 días después de la inoculación con una solución que contenía 80 % de acetona y 20 % de metanol a 4 °C durante 20 minutos. 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 y col., "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. Después, las células se lavaron tres veces con tampón PBS y se incubaron con una IgG secundaria anti-conejo de cabra marcada con FITC (Laboratorios Kirkegaard y Perr y Inc, Gaithersburg, MD) a 37 °C durante 45 minutos. Después de lavar los portaobjetos tres veces con tampón PBS y los portaobjetos se montaron con fluoromount-G, se cubrieron con cubreobjetos y se analizaron con un microscopio de fluorescencia. Se calculó la dosis infecciosa al 50 % en cultivo tisular por ml (DICT₅₀/ml). Inicialmente, las células se transfectaron con una construcción de plásmido que contenía una única copia deL genoma de PCV2 pero el título 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

45 Transfección *in vivo* de cerdos con el clon de ADN molecular de PCV2 e inoculación experimental de cerdos con la reserva de virus PCV2 infeccioso homogénea

Cuarenta cerdos sin patógenos específicos (SPF) de 4 semanas de edad se asignaron de manera aleatoria en 4 habitaciones de 10 animales cada una. Antes de la inoculación, los cerdos SPF se analizaron para determinar anticuerpos contra PCV, PRRSV, PPV y el virus de la hepatitis E porcina. A los cerdos del Grupo 1 no se les inoculó y sirvieron como controles negativos. A los cerdos del Grupo 2 se inoculó a cada uno de ellos por vía intranasal aproximadamente $1,9 \times 10^5$ DICT₅₀ de la reserva de virus PCV2 infeccioso derivada del clon de ADN molecular de PCV2. Los cerdos del Grupo 3 recibieron inyección intrahepática directa del ADN de plásmido recombinante del clon molecular de PCV2. Se inyectó a cada cerdo un total de 200 µg de ADN plasmídico recombinante (el ADN plasmídico clonado de PCV2 clonado), mediante una técnica guiada por ultrasonidos, en 6 sitios diferentes de hígado. Se inyectó a cada uno de los cerdos del Grupo 4 un total de 200 µg del ADN plasmídico 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 los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 después de la inoculación (DPI). 21 DPI, se seleccionaron al azar cinco cerdos de cada grupo y se les hizo necropsia. A los cinco animales restantes de cada

grupo se les practicó la necropsia 35 DPI. Durante la necropsia se recogieron diversos tejidos y órganos, y se procesaron para examen histológico y tinción inmunohistoquímica (véase más adelante).

Los resultados se muestran en la Tabla 1 que se expone a continuación. Todos los cerdos inoculados de los Grupos 2, 3 y 4 fueron negativos para los anticuerpos contra PCV2 0 DPI. Dos cerdos del Grupo 1 de control sin inocular tenían anticuerpos maternos detectables contra el PCV2 0 DPI. Los anticuerpos maternos en estos dos lechones disminuyeron para el 7 DPI. No se detectó seroconversión a anticuerpos contra el PCV2 en ninguno de los 10 cerdos control sin inocular. En el Grupo 2, los cerdos inoculados por vía intranasal con el virus PCV2 infeccioso, 1 lechón experimentó seroconversión a anticuerpos contra PCV2 el 21 DPI. Para 35 DPI, 4 de los 5 cerdos restantes del grupo 2 habían experimentado seroconversión. La seroconversión en animales transfectados de los Grupos 3 y 4 aparecieron por primera vez el 28 DPI. El 35 DPI, 5 de los 5 cerdos restantes del grupo 3 y 3 de los 5 cerdos restantes del grupo 4 habían experimentado seroconversión a anticuerpos frente al PCV2.

Los anticuerpos frente al PPV se ensayaron 3 y 21 DPI para todos los cerdos, y 35 DPI para el resto de los cerdos. En los lechones SPF se detectaron anticuerpos maternos frente al PPV de agente de cerdos ubicuo. Los títulos de anticuerpos de PPV HI en todos los lechones, excepto en uno, disminuyeron significativamente desde el 3 DPI (un título promedio de 1:2.665) al 21 DPI (un título promedio de 1:246), lo que indica que el anticuerpo detectado en estos lechones derivó de manera pasiva. Un lechón presentó un ligero incremento del título 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. Las muestras de suero recogidas de todos los cerdos los 0, 21, y 35 DPI se analizaron además para detectar ADN de PPV con un ensayo publicado de PCR (J. M. Soucie y col., "Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate: C porcine factor VIII concentrate," *Transfusion* 40:708 - 711 (2000)). No se detectó viremia por PPV de ningún cerdo en ningún DPI, lo que además indica que los cerdos no estaban infectados por PPV.

Tabla 1 Seroconversión a anticuerpos específicos de PCV2 en cerdos a los que se ha inoculado virus PCV2 vivo o a los que se ha inyectado directamente ADN plasmídico de PCV2 clonado

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

^aLos anticuerpos frente a PCV2 se midieron con un ELISA, número de positivos/número analizado.

^bUna reserva de virus PCV2 infeccioso biológicamente pura y homogénea generada mediante transfección de células PK15 con el clon de ADN molecular de PCV2.

^cADN genómico de PVC2 clonado en el plásmido pSK.

25 Ejemplo 6

Análisis de PCR-RFLP

Para medir la viremia por PCV2 en cerdos transfectados con el clon de ADN molecular de PCV2 y en cerdos infectados con la reserva de virus PCV2 infeccioso, se analizaron las muestras de suero recogidas a diferentes DPI para determinar la presencia de ADN de PCV2 mediante los procedimientos generales de un ensayo de PCR-RFLP descrito previamente (M. Fenaux y col., 2000, citado anteriormente). El 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 analizó 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.

Se recogieron muestras de suero de todos los animales control e inoculados 0, 7, 14, 21, 28, y 35 DPI y se analizaron para determinar la viremia por PCV2 mediante detección de ADN de PCV2 (*id.*) Los resultados se muestran en la Tabla 2 que se expone a continuación. No se detectó ADN de PCV2 en el Grupo 1 de cerdos control sin inocular a ningún DPI. Se detectó viremia en 7/10 cerdos del Grupo 2 14 DPI y en 8/10 35 DPI. La viremia duró solamente una pocas semanas, ya que el ADN de PCV2 no era detectable 28 DPI y 35 DPI en los 5 cerdos restantes del Grupo 2. En el grupo 3, los cerdos a los que se inyectó el clon de ADN molecular de PCV2 intrahepáticamente, 8/10 cerdos eran virémicos el 14 DPI y 9/10 cerdos tenían viremia detectable el 35 DPI. A los cerdos del grupo 4 se inyectó 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 los ganglios linfáticos ilíacos superficiales de cerdos SPF. Los productos de la 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.

5 Tabla 2. Detección de viremia (ADN de PCV2) mediante PCR en sueros de los cerdos inoculados y control

Grupo	Inóculo	Vía de inoculación	Días después de la inoculación						
			0	7	14	21	28	35	Total
1	Ninguno		0/10 ^a	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/10
2	Virus PCV2 vivo ^d	Intranasal	0/10	0/10	7/10	5/10	0/5	0/5	8/10
3	ADN de PCV2 ^c	Intrahepática	0/10	0/10	8/10	6/10	3/5	3/5	9/10
4	ADN de ^{PCV2c}	Intralinfoide	0/10	0/10	2/10	8/10	2/5	0/5	8/10

^a10 cerdos de cada grupo, número de positivos/número analizado.

^b Una reserva de virus PCV2 infeccioso biológicamente pura y homogénea generada mediante transfección de células PK15 con el clon de ADN molecular de PCV2.

^cADN genómico de PVC2 clonado en el plásmido pSK.

Ejemplo 7

Evaluación clínica

10 Los cerdos se pesaron el 0 DPI y en el momento de la necropsia. Las temperaturas rectales y las puntuaciones de enfermedad respiratoria clínica, que varían entre 0 y 6 (0 = normal, 6 = grave) (P. G. Halbur y col., "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 signos de enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad hepática (ictericia), enfermedad músculoesquelética y cambios en el estado del cuerpo, también se registraron diariamente.

15 Para evaluar la patología macroscópica y la histopatología en total, se seleccionaron aleatoriamente cinco cerdos de cada grupo para la realización de necropsias el 21 y el 35 DPI. El equipo de necropsia estaba enmascarado 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 visible macroscópicamente se registró para cada cerdo basándose en un sistema de puntuación descrito anteriormente (*id.*). El sistema de puntuación se basa en el volumen aproximado con el que cada lóbulo pulmonar contribuye al pulmón entero: el lóbulo craneal derecho, el lóbulo medio derecho, la parte craneal del lóbulo craneal izquierdo y la parte caudal del lóbulo craneal izquierdo contribuyen cada uno al 10 % del volumen pulmonar total, el lóbulo auxiliar contribuye al 5 % y los lóbulos caudales derecho e izquierdo contribuyen cada uno al 27,5 %. Otras lesiones, tal como el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, se observaron por separado. Se obtuvieron secciones para análisis histopatológico del cornete nasal, los pulmones (siete secciones) (*id.*), corazón, cerebro, ganglios linfáticos (traqueobronquial, ilíaco, mesentérico, sublingual), amígdalas, timo, hígado, vesícula biliar, bazo, articulaciones, intestino delgado, colon, páncreas, y riñón. Los tejidos se analizaron siguiendo un patrón de enmascaramiento y se les dio una puntuación subjetiva de la gravedad de lesiones pulmonares, en los ganglios linfáticos y hepáticas. Las puntuaciones en el pulmón variaron entre 0 (normal) y 3 (neumonía intersticial linfocítica grave). Las puntuaciones en el hígado variaron entre 0 (normal) y 3 (hepatitis linfocítica grave). Las puntuaciones en los ganglios linfáticos fueron para una cantidad estimada de supresión linfocítica de los folículos que variaron entre 0 (normal o sin supresión linfocítica) y 3 (supresión linfocítica intensa y reemplazo histiocítico de folículos).

35 El protocolo serológico implicó la recolección de sangre en la llegada a los 11 y 12 días de edad y de todos los cerdos el 0, 7, 14, 21, 28, y 35 DPI. Los anticuerpos séricos frente al PRRSV se analizaron usando el ensayo Herd Check PRRSV ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, MA). Los anticuerpos séricos para PPV se detectaron mediante un ensayo de inhibición de la hemoaglutinación (HI) (H. S. Joo y col., "A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody," Aust. Vet. J. 52:422 - 424 (1976)). Los anticuerpos séricos para PCV2 se detectaron mediante un ELISA indirecto modificado basado en la proteína ORF2 recombinante de PCV2 (P. Nawagitgul y col., "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 del PCV2 parcialmente purificado se preparó a partir de células Hi Five (Invitrogen, Carlsbad, CA) infectadas con baculovirus recombinantes que contenían la proteína de ORF2 principal de la cápside del PCV2 (P. Nawagitgul y col., "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein," J. Gen. Virol. 81:2281 - 2287 (2000)). Los lisados celulares de células Hi Five infectadas 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 (Dynex Technologies Inc, Chantilly, VA) se recubrieron con concentraciones óptimas de

antígenos positivos y negativos a 4 °C durante 36 horas. A cada pocillo se añadieron cien µl de cada muestra de suero diluidos a 1:100 en 5 % de diluyente de leche (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.). Las muestras de suero se analizaron cuadruplicado: 2 pocillos párale antígeno control negativo y 2 pocillos paralelos para el antígeno de PCV2. En cada placa se incluyeron sueros control positivo y control negativo. Los sueros se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y después se lavaron 5 veces con tampón PBS 0, 1 M que contenía 0,1 % de Tween-20. Una IgG secundaria anti-cerdo marcada con peroxidasa (Sigma Co, St. Louis, MO) se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc) a 37 °C durante 15 minutos para detectar el desarrollo de color. La densidad óptica (DO) se leyó a 405 nm. La DO corregida de cada suero analizado y de control se calculó restando el valor medio de la 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 la DO corregido de una muestra de suero analizada (S) con la del suero control positivo (P) y se comunicó en forma de las proporciones S/P. Las muestras con proporciones S/P ≤0,12, 0,12 to 0,2, y >0,2 se consideraron negativas, equívocas y positivas, respectivamente.

A partir de los resultados de la evaluación clínica, ninguno de los cerdos control e inoculados mostró signos obvios de enfermedad que se parecen a los del PMWS clínico. No existía diferencias en la ganancia de peso o las 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 leve en la mayoría de los cerdos de los grupos infectados con ADN del PCV2 e infectados con el virus PCV2 de 8 a 14 DPI. Se caracterizó por disnea leve (puntuaciones respiratorias clínicas de 1 a 2) de uno a dos días de duración en cerdos individuales y una duración de 5-6 días para el grupo.

No se observaron lesiones macroscópicas en los cerdos control en la necropsia. Los cerdos en los tres grupos inoculados tenían lesiones macroscópicas limitadas a los pulmones y los ganglios linfáticos (véase la tabla 3, más adelante). Las lesiones fueron similares entre los cerdos en los grupos transfectados con ADN plasmídico de PCV2 e infectados por el virus PCV2. Los pulmones que no colapsaron y tenían áreas al azar, multifocales y moderadamente bien demarcadas de consolidación con un color de tostado a púrpura que implican el 0-2 % del pulmón (Fig. 3) el 21 DPI, y 0-13 % del pulmón el 35 DPI. Los ganglios linfáticos aumentaron sistemáticamente su tamaño de 2 a 5 veces su tamaño normal, y estaban sólidos y de color tostado (Fig. 3) tanto a 21 como a 35 DPI en la mayoría de los cerdos de los tres grupos a los que se inoculó PCV2.

La exploración microscópica no reveló lesiones en ningún tejido de los cerdos control excepto en los hígados. Ocho de diez cerdos control tenían inflamación linfoplasmática multifocal muy leve predominantemente en las regiones periportales del hígado, ya que se observa habitualmente en cerdos normales y se considera antecedente normal (P. G. Halbur y *col.*, 2001, citado anteriormente).

Los cerdos de los dos grupos transfectados con ADN plasmídico de PCV2 (intrahepático e intralinfoide) y el grupo infectado con virus PCV2 (intranasal) tenían lesiones similares en el cerebro, los pulmones, el corazón, los riñones, los tejidos linfoides (amígdalas, ganglios linfáticos, bazo), el íleon y el hígado (véase la Tabla 4, más adelante). Se observaron lesiones cerebrales en 23/30 de los cerdos de los tres grupos inoculados y se caracterizaron como meningoencefalitis linfoplasmocítica multifocal de leve a moderada con infiltrado perivascular y gliosis. Se observaron lesiones pulmonares en 28/30 cerdos inoculados con PCV2 y se caracterizaron neumonía linfoplasmocítica peribronquiolar y broncointersticial histiocítica leve o moderada (Fig. 3C). A un cerdo del grupo 2 infectado con el virus PCV2 al que se le practicó la necropsia 21 DPI y a un cerdo de cada uno de los dos grupos transfectados con ADN plasmídico de PCV2 al que se le practicó necropsia 35 DPI tenían bronquiolitis ulcerosa y proliferativa con fibroplasia e inflamación granulomatosa en la lámina propia y en las regiones peribronquiolares de los bronquios. También se observó miocarditis linfoplasmocítica multifocal leve en 18/30 cerdos a los que se inoculó PCV2. En 14/30 de los cerdos a los que se inoculó PCV2, se observó nefritis linfoplasmocítica intersticial multifocal de leve a moderada. No se observaron lesiones en los timos. Se observó depleción linfoide de leve a moderado (Fig. 4B) y reemplazo histiocítico de los folículos se observó en las amígdalas de 8/30, en el bazo de 7/30 y en los ganglios linfáticos de 26/30 de los cerdos a los que se inoculó PCV2. Se observó linfadenitis granulomatosa moderada con células gigantes (Fig. 4C) 21 DPI en tres cerdos a los que se inoculó por vía intranasal el virus PCV2 y en un cerdo 35 DPI en cada uno de los grupos transfectados con ADN plasmídico de PCV2. Se observó enterocolitis linfoplasmocítica e histiocítica leve en 3/5 cerdos en el grupo infectado con el virus PCV2, en 3/5 cerdos en el grupo transfectado por vía intrahepática con ADN plasmídico de PCV2 y en 1/5 cerdos en el grupo transfectado por vía intralinfoide con ADN plasmídico de PCV2 35 DPI. Un cerdo en cada uno de los grupos transfectados con ADN plasmídico de PCV2 tenía depleción linfoide leve con reemplazo histiocítico y números bajos de células gigantes en las placas de Peyer. Se observó hepatitis linfoplasmocítica de leve a moderada en 29/30 de los tres cerdos a los que se inoculó PCV2. Se observaron números bajos de hepatocitos necróticos ampliamente dispersos individualmente rodeados de inflamación linfocítica en un cerdo de cada uno de los grupos transfectados con ADN plasmídico de PCV2 21 DPI. Las lesiones en otros tejidos no eran notables.

Las lesiones microscópicas en el pulmón, el hígado y los ganglios linfáticos se puntuaron de acuerdo con los sistemas de puntuación publicados (Tabla 4, más adelante) (P. G. Halbur y *col.*, 2001, citado anteriormente; P. G. Halbur y *col.*, 1995, citado anteriormente). No existían sistemas de puntuación aceptables para otros tejidos y órganos. Las puntuaciones promedio de las lesiones en el pulmón y los ganglios linfáticos en los cerdos de los tres grupos a los que se ha inoculado el PCV2 fueron estadísticamente diferentes de las de los cerdos control del Grupo

1. Las puntuaciones promedio de las lesiones en el hígado en cerdos de los tres grupos a los que se ha inoculado PCV2 no eran estadísticamente diferentes de las 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 ^a	0/5	0/5	0/5
2	Virus PCV2 vivo ^b	Intranasal	5/5	1/5 (0 - 1) ^c	5/5	4/5 (0 - 5)
3	ADN de PCV2 ^d	Intrahepática	2/5	2/5 (0 - 2)	5/5	2/5 (0 - 13)
4	ADN de PCV2 ^d	Intralinfoide	4/5	5/5 (0 - 1)	3/5	1/5 (0 - 9)

^aA cinco cerdos de cada grupo se les practicó la necropsia 21 DPI y a los 5 cerdos restantes se les practicó la necropsia 35 DPI. Número de positivos/número analizado.

^b Una reserva de virus PCV2 infeccioso biológicamente pura y homogénea generada mediante transfección de células PK15 con el clon de ADN molecular de PCV2.

^cNúmero de lesiones / número analizado (intervalo del porcentaje estimado del pulmón afectado por lesiones de neumonía visibles macroscópicamente, 0 – 100 %)

^dADN genómico de PVC2 clonado en el plásmido pSK.

Tabla 4. Distribución de las lesiones histopatológicas en los cerdos control e inoculados con PCV2

Grupo	Inóculo	Vía de inoculación	DPI ^a	Pulmón ^b	Hígado ^c	LN ^d	Bazo	Timo	Íleon	Cerebro	Corazón	Riñón	Amígdalas
1	Ninguno		21	0/5 (0,0)	4/5 (0,8)	0/5 (0,0)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	Virus PCV2	Intranasal	35	0/5 (0,0)	4/5 (0,8)	0/5 (0,0)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
			21	5/5 (1,6)	5/5 (1,2)	3/5 (1,2)	1/5	0/5	0/5	4/5	3/5	1/5	0/5
3	ADN de PCV2	Intrahepática	35	3/5 (0,6)	4/5 (1,0)	4/5 (0,8)	3/5	0/5	3/5	4/5	0/5	1/5	3/5
			21	5/5 (1,0)	5/5 (1,0)	5/5 (1,0)	1/5	0/5	0/5	5/5	4/5	1/5	0/5
4	ADN de PCV2	Intrainfoide	35	5/5 (1,2)	5/5 (1,0)	4/5 (1,0)	2/5	0/5	3/5	3/5	4/5	5/5	3/5
			21	5/5 (1,2)	5/5 (1,0)	5/5 (0,8)	0/5	0/5	0/5	4/5	4/5	3/5	0/5
			35	5/5 (1,0)	5/5 (1,2)	5/5 (1,4)	0/5	0/5	1/5	3/5	3/5	3/5	2/5

^aDías después de la inoculación (DPI): a cinco cerdos de cada grupo se les practicó la necropsia 21 DPI y a los 5 cerdos restantes de cada grupo se les practicó la necropsia 35 DPI.

^bNúmero de positivos/ número analizado (puntuación promedio histológica del pulmón: 0 = normal, 1 = neumonía intersticial leve, 2 = moderada, 3 = grave)

^cNúmero de positivos/ número analizado (puntuación promedio histológica del hígado: 0 = normal, 1 = hepatitis leve, 2 = moderada, 3 = grave)

^dNúmero de positivos/ número analizado (puntuación promedio de depleción linfóide (LN) histológica: 0 = normal, 1 = leve, 2 = moderada, 3 = grave)

Ejemplo 8Inmunohistoquímica

5 Se realizó detección inmunohistoquímica (IHQ) del antígeno específico de PCV2 en todos los tejidos recogidos durante las necropsias 21 y 35 DPI. Para la IHQ se usó un antisuero policlonal de conejo específico de y los procedimientos generales se han descrito anteriormente (S. D. Sorden y *col.*, 1999, citado anteriormente).

10 Para la detección y distribución tisular del antígeno de PCV2, se realizó tinción de IHQ del antígeno del PCV2 en cerebro, pulmones, cornetes, corazón, riñones, amígdalas, ganglios linfáticos, bazo, timo, íleon, 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 el antígeno de PCV2. La distribución tisular del antígeno de PCV2 en los tres grupos a los que se inoculó PCV2 fue similar (véase la Tabla 5, más adelante). En el cerebro, el antígeno del PCV2 se encontró predominantemente en células mononucleares, células de tipo fibroblasto y células endoteliales en las meninges y el plexo coroideo y con menor frecuencia en células endoteliales y células mononucleares perivasculares en el cerebro y cerebelo. En los pulmones, se detectó el antígeno del PCV2 dentro de los macrófagos alveolares y septales y en las células de tipo fibroblasto en la lámina propia de las vías respiratorias (Fig. 3D). En el corazón, antígeno del PCV2 se detectó en macrófagos ampliamente dispersos y células endoteliales. En los riñones, antígeno del PCV2 se detectó dentro de las células epiteliales tubulares y las células mononucleares en el intersticio. En los tejidos linfoides (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y placas de Peyer), el antígeno del PCV2 se detectó principalmente dentro de los macrófagos y en las células de tipo dendríticas y las células gigantes dentro de los folículos (Fig. 4D). El antígeno del PCV2 también se detectó dentro de macrófagos en la lámina propia del intestino delgado. En el hígado, el antígeno del PCV2 se detectó dentro de las células mononucleares y en las células de Kupffer. El antígeno del PCV2 no se detectó en los cornetes, el timo ni la vesícula biliar.

15

20

Tabla 5. Detección y distribución del antígeno específico de PCV2 mediante inmunohistoquímica en cerdos control y inoculados con PCV2

Grupo	Inóculo	Vía de inoculación	DPI ^a	Pulmón	Hígado	LN	Bazo	Timo	Íleon	Cerebro	Corazón	Riñón	Amígdalas
1	Ninguno		21	0/5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	Virus 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 PCV2	Intrahepática	21	5/5	5/5	5/5	5/5	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 PCV2	Intraíleo	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

^aDías después de la inoculación (DPI): a cinco cerdos de cada grupo se les practicó la necropsia 21 DPI y a los 5 cerdos restantes de cada grupo se les practicó la necropsia 35 DPI.

^bNúmero de positivos/número analizado.

Ejemplo 9Construcción del clon de ADN de PCV1 infeccioso 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. Se diseñó un par de cebadores para PCR, KPNPCV1.U expuesto en la SEC ID N° 7 y KPNPCV1.L expuesto en la SEC ID N° 8 (véase la Tabla 6, más adelante) basándose en la secuencia publicada del PCV1. Este par de cebadores amplifica el genoma completo del PCV1 con una región solapante que contiene el sitio de la enzima de restricción *KpnI* único. El ADN del virus PCV1 se extrajo de la línea celular de la ATCC PK-15 contaminada que se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (número de acceso en ATCC CCL-33). El ADN del PCV1 se extrajo de las células PK-15 de la ATCC infectadas persistentemente con PCV1, usando el minikit QIAmp DNA (Qiagen, Inc, Valencia, CA.). El ADN extraído se amplificó mediante PCR con la polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Los ciclos de PCR constaba de una etapa inicial de 95 °C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 48 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 2 minutos, y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. El producto de la PCR del 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). El producto de la PCR purificado que contenía el genoma completo del PCV1 se ligó primero en el vector plasmídico advanTAge (Clontech, Palo Alto, CA). Se usaron células competentes *Escherichia coli* DH5α para la transformación. Los plásmidos recombinantes se verificaron mediante digestión con enzima de restricción. El ADN genómico del PCV1 de longitud completa se escindió del vector advanTAge mediante digestión con la enzima de restricción *KpnI*. El ADN genómico del PCV1 de longitud completa se ligó en el vector pBluescript SK (+) (pSK (Stratagene, La Jolla, CA) con la ADN ligasa de T4 DNA a 37 °C durante la noche. Los plásmidos recombinantes que contienen el genoma de PCV1 de longitud completa se aislaron con un mini kit de plásmidos Qiagen (Qiagen, Valencia, CA) y se verificaron mediante digestión con enzima de restricción y secuenciación de ADN. El ADN genómico del PCV1 de longitud completa se escindió del vector pSK mediante digestión con *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. Ventajosamente se ha encontrado que estos dímeros en tándem se prepararon debido a que los clones de ADN en tándem dimerizados son más eficaces para transfectar las células y producir viriones infecciosos. Para producir el dímero en tándem del ADN del PCV1, el ADN genómico del PCV1 digerido se ligó con la ADN ligasa de T4 a 37 °C durante solamente 10 minutos, 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). Los plásmidos recombinantes que contienen dímeros en tándem del genoma del PCV1 (denominado en el presente documento "clon de ADN molecular del PCV1") 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.

35

Tabla 6 Cebadores de oligonucleótidos empleados en la presente invención

Cebador	Dirección	Secuencia del cebador	Aplicación
<i>Cebadores de la construcción:</i>			
KNPCV1.U.	> ^a	5'-TTTGGTACCGAAGGCCGATT-3' (corresponde a la SEC ID N° 7)	Construcción del clon de ADN del PVC1
KNPCV1.L.	<	5'-ATTGGTACCTCCGTGGATTGTTCT-3' (corresponde a la SEC ID N° 8)	Construcción del clon de ADN del PVC1
	<	5'-GAAGTTAACCCATAATGAAATAAAAATAAAAACCCATTACG-3' (corresponde a la SEC ID N° 9)	Construcción del clon de ADN de PCV1- 2
Nar 1 - 3	>	5'-GGTGGGCGCTCTTGGATACGTCATCCTATAAAAAGTG-3' (corresponde a la SEC ID N° 10)	Construcción del clon de ADN de PCV1- 2
Psi I-5	>	5'-AGGTTATAAGTGGGGTCTTTAAGATTAA-3' (corresponde a la SEC ID N° 11)	Construcción del clon de ADN de PCV1- 2
Acl I-6	<	5'-GGAACCGTTACCGCAGAAGAAGACACC-3' (corresponde a la SEC ID N° 12)	Construcción del clon de ADN de PCV1- 2
Bgl-II-ORF2	>	5'-ACTATAGATCTTATTCATTTAGAGGGTCTTTTCAG-3' (corresponde a la SEC ID N° 13)	Construcción del clon de ADN de PCV2- 1
Sp H-I-ORF2	<	5'-TACGGGCATGCATGACGTGGCCCAAGGAGG-3' (corresponde a la SEC ID N° 14)	Construcción del clon de ADN de PCV2- 1
Bgl-I-PCV2	<	5'-AGACGAGATCTATGAATAATAAAAACCCATTACGAAG-3' (corresponde a la SEC ID N° 15)	Construcción del clon de ADN de PCV2- 1
Sp H-I-PCV2	>	5'-CGTAAGCATGCAGCTGAAAACCGAAAAGAGTG-3' (corresponde a la SEC ID N° 16)	Construcción del clon de ADN de PCV2- 1
<i>Cebadores de detección</i>			
MCV1	>	5'-GCTGAACCTTTTGAAGTGAGCGGG-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.PCV1	<	5'-CCAACCTTTGTAACCCCTCCA-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
Nested.Orf.PCV1	<	5'-CCAGCTGTGGCTCCATTTAA-3' (corresponde a la SEC ID N° 21)	Detección de PCV1 y PCV2 - 1
Nested.Gen.PCV1	>	5'-TTCCCATATAAAATAAATTACTGAGTCTT-3' (corresponde a la SEC ID N° 22)	Detección de PCV1 y PCV1 - 2
Orf.PCV2	<	5'-CAGTCAGAAAGCCCTCCTG-3' (corresponde a la SEC ID N° 23)	Detección de PCV2 y PCV1 - 2
Gen.PCV2	>	5'-CCTAGAAAACAAGTGGTGGATG-3' (corresponde a la SEC ID N° 24)	Detección de PCV2 y PCV2 - 1
Nested.Orf.PCV2	<	5'-TTGTAAACAAGGCCACAGC-3' (corresponde a la SEC ID N° 25)	Detección de PCV2 y PCV1 - 2
Nested.Gen.PCV2	>	5'-GTGTGATCGATATCCATTGACTG-3' (corresponde a la SEC ID N° 26)	Detección de PCV2 y PCV2 - 1

^aDirección del cebador.

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

5 La infectividad del clon de ADN molecular del PCV1 se determinó mediante transfección *in vitro* de las células PK-15. La 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 del PCV1 se visualiza en el núcleo mediante IFA y, en menor grado, en el citoplasma de las células transfectadas. Las células que se transfectaron de manera simulada con el vector pSK vacío permanecieron negativas para el antígeno del PCV1.

Ejemplo 11Construcción de un clon de ADN viral de PCV1-2 quimérico

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

25 Un segundo par de cebadores para PCR, *HpaI* 1-2 expuesto en la SEC ID N° 9 y *NarI* 1-3 expuesto en la SEC ID N° 10 se diseñó para la amplificación del vector pSK+ y su inserto del genoma de PCV1. Se introdujeron mutaciones puntuales en los extremos 5' de los cebadores para PCR para crear sitios para las enzimas de restricción flanqueantes *NarI* y *HpaI*. Este par de cebadores amplificó el vector pSK+ y su inserto de ADN genómico de PCV1 que carece del gen del ORF2 de la cápside ORF2, es decir, el genoma del PCV1 menos el ORF2 de PCV1 (pSK-PCV1 L10RF2) mediante el uso del clon de ADN infeccioso de PCV1 como el molde de la PCR. La reacción de PCR consistía en una etapa inicial a 95 °C durante 9 minutos, seguido de 38 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación a 50 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 3,5 minutos y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. El producto de la PCR del ORF2 del PCV2 se digirió con *AclI* and *PsiI* para eliminar las mutaciones puntuales introducidas. El producto de pSK-PCV1 ORF2 (el vector pSK – producto de la PCR del genoma del PCV1 que carece del gen de ORF2 de PCV1) se digirió con la *NarI* y *HpaI* para eliminar las mutaciones puntuales introducidas. La digestión posterior produjo un extremo cohesivo y un extremo romo complementario del producto de la PCR del ORF2 de PCV2 digerido con las enzimas de restricción *AclI* y *PsiI*. El producto del ORF2 de PCV2 digerido y el producto pSK-PCV1 con delección 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 ha reemplazado con el gen de ORF2 de PCV2. Una vez que los dos productos de la PCR se digirieron y volvieron a ligar, todas las mutaciones puntuales introducidas en la PCR usadas para facilitar la clonación se eliminaron en el clon quimérico resultante. Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Los plásmidos recombinantes que contenían el clon de ADN quimérico se aislaron y se confirmaron mediante PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciación parcial de ADN. El genoma de longitud completa de PCV1-2 quimérico se escindió del vector pSK+ (el plásmido recombinante) con digestión con *KpnI*. El genoma de ADN quimérico después se dimerizó mediante una corta reacción de unión 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 enzimas de restricción y secuenciación del ADN.

Ejemplo 12Evaluación de la infectividad *in vitro* del clon de ADN de PCV1-2 quimérico

50 La viabilidad del clon de ADN de PCV quimérico (PCV1 no patógeno con el gen de la cápside inmunogénica de PCV2) se analizó en células PK-15. Cuando las células PK-15 se transfectaron con el clon de ADN viral quimérico, se detectó antígeno viral específico del ORF2 de la cápside de PCV2 mediante IFA aproximadamente 2 días después de la transfección. El antígeno de la cápside de PCV1 no se detectó en las 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 cápside inmunogénica de PCV2.

Ejemplo 13Construcción de un clon de ADN viral de PCV2-1 quimérico recíproco

Para construir un clon de ADN de PCV2-1 quimérico recíproco, el gen de la cápside 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 para PCR: el par, Bgl-II-ORF2 expuesto en la SEC ID N° 13 y SpH-I-ORF2 expuesto en la SEC ID N° 14, amplifica el gen de ORF2 de PCV1 e introduce los sitios flanqueantes para las enzimas de restricción *BglII* y *SpHI* mediante mutación puntual. El segundo par de cebadores de PCR, Bgl-II-PCV2 expuesto en la SEC ID N° 15 y SpH-I-PCV2 expuesto en la SEC ID N° 16, amplificaron el vector pSK y el genoma de PCV2 menos el gen del ORF2 (pSK-PCV2 ORF2) mediante el uso del clon de ADN de PCV2 infeccioso como el molde de la PCR e introdujeron sitios flanqueantes para las enzimas de restricción *BglII* y *SpHI* mediante mutación puntual. El producto de Δ ORF2 pSK-PCV2 y el producto de la PCR del ORF2 de PCV1 se digirieron con las enzimas de restricción *BglII* y *SpHI* para producir extremos cohesivos y romos complementarios ligados. Después de la transformación en células de *E. Coli*, los plásmidos recombinantes auténticos se aislaron y confirmaron mediante digestión enzimática y secuenciación parcial del ADN. El genoma del PCV2-1 quimérico recíproco de longitud completa se escindió del plásmido recombinante mediante digestión con *SacII* y se dimerizó como se describe en el presente documento para producir el clon de PCV2-1 infeccioso recíproco quimérico.

Ejemplo 14Transfección *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 3-5 anteriores. Para ensayar la infectividad del PCV1 y dos clones quiméricos *in vitro*, se cultivaron células PK-15 sin contaminación con PCV1 preparadas por el procedimiento del Ejemplo 1 en portaobjetos de cámara de 8 pocillos LabTek (Nalge Nunc Int., Dinamarca). Cuando las células PK-15 alcanzaron aproximadamente el 80 % de confluencia, las células se transfectaron con los clones de ADN de PCV1, PCV2, PCV1 - 2 y PCV2 - 1, respectivamente, usando reactivos 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 fijaron con una solución que contenía 80 % de acetona y 20 % de metanol a 4 °C durante 20 minutos. Los signos de infectividad y la 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 anticuerpos monoclonales contra el gen de la cápside de ORF2 de PCV1, amablemente aportados por el Dr. G. M. Allan (G. M. Allan y col., "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 anticuerpos monoclonales frente al PCV1 diluidos 1:20 a 37 °C durante 1 hora. Después, las células se lavaron tres veces con tampón PBS y se incubaron con IgG anti-ratón de cabra marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.) a 37 °C durante 45 minutos. Después de lavar tres veces con tampón PBS, los portaobjetos tres veces con fluoromount-G, se cubrieron con cubreobjetos y se analizaron con 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 contra el 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 sustanció mediante transfección *in vitro* de las células PK-15. Dos copias idénticas del genoma completo del PCV1 se ligaron en tándem en el vector pSK para producir el clon de ADN del PCV1 (Fig. 6). El clon de ADN de PCV1-2 quimérico tenía el gen de la cápside del 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 cápside del ORF2 de PCV2 reemplazado por el de PCV2 no patógeno en la estructura central del genoma de PCV2 no patógeno. Si es infeccioso *in vitro*, el clon de ADN de PCV1-2 quimérico producirá el gen de la cápside del ORF2 de PCV2 y el clon de ADN de PCV2 - 1 quimérico recíproco expresará el antígeno de la cápside de ORF2 de PCV1 en las células PK-15 transfectadas. Los resultados muestran que, sorprendentemente, se ha mostrado que los clones de ADN de PCV1, PCV1-2 quimérico y PCV2-1 quimérico recíproco eran infecciosos cuando se transfectaban en células PK-15 y expresaban las respectivas proteínas del antígeno de la cápside viral como se demuestra mediante IFA usando anticuerpos específicos de PCV1 o PCV2. El IFA usando anticuerpos monoclonales contra el ORF2 del PCV1 y anticuerpos contra PCV2 confirmó que el ADN de PCV1 y los clones de ADN de PCV1-2 eran infecciosos. El IFA usando anticuerpos monoclonales específicos del ORF2 del PCV1 mostró que el clon de ADN de PCV1 - 2 quimérico también era infeccioso. Aproximadamente el 10-20 % de las células PK-15 transfectadas eran positivas para el antígeno de la cápside de PCV1 y e antígeno de PCV2 y expresaban el antígeno del ORF2 del PCV1, dentro del núcleo de las células transfectadas (Fig. 7).

Ejemplo 15Inoculación experimental de cerdos con clones de ADN de PCV1, PCV2, PCV1-2 quimérico y PCV2 - 1 PCV2-1 quimérico recíproco

5 Para evaluar la inmunogenicidad y la 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, los animales se analizaron para determinar anticuerpos contra PCV, PRRSV, PPV y el virus de la hepatitis E porcina. Además, las muestras de suero antes de la inoculación se analizaron mediante PCR para el ácido nucleico de PCV1 y PCV2 para confirmar que los cerdos no están infectados naturalmente por cualquiera de los virus. Los clones de ADN de PCV1, PCV2, PCV1-2 y PCV2-1 se inocularon todos mediante inyección directa del ADN plasmídico clonado en los ganglios linfáticos ilíacos superficiales de los cerdos. Los cerdos del Grupo 1 recibieron solución salina tamponada con fosfato (tampón de PBS) y sirvieron como control negativo. A los cerdos del grupo 2 se inyectó en los ganglios linfáticos ilíacos superficiales 200 µg del clon de ADN de PCV1 infeccioso. A los cerdos del grupo 3 se inyectó a cada uno de ellos 200 µg del clon de ADN de PCV2 infeccioso. Los cerdos del grupo 4 recibieron cada uno de ellos inyecciones de 200 µg del 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 los animales se controlaron diariamente para detectar signos clínicos de enfermedad. Se recogieron muestras de suero de cada animal los días -2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 después de la inoculación (DPI). 21 DPI, se practicó la necropsia a cuatro animales seleccionados al azar de cada grupo. A los cuatro animales restantes de cada grupo se les practicó la necropsia 49 DPI. Se extrajeron diversos tejidos y órganos durante la necropsia como se ha descrito previamente en el Ejemplo 7 y se procesaron para su examen histológico.

La inmunogenicidad de del PCV1, PCV2 y los clones de ADN quiméricos infecciosos se examinó en los cerdos. Las muestras de suero recogidas de todos los animales control e inoculado -2 (0), 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DPI se analizaron para evaluar la viremia por PCV1, PCV2, PCV1-2 y PCV2-1 mediante detección por PCR de secuencias de ADN específicas del clon, para los anticuerpos anti-PCV1 mediante IFA y para los anticuerpos del ORF2 anti-PCV2 mediante ELISA. Antes de la inoculación -2 DPI, los animales de los cinco grupos dieron resultados negativos mediante PCR para el ADN tanto de PCV1 como de PCV2.

Los animales control negativos dieron resultados negativos para la viremia tanto por PCV1 como por PCV2 a lo largo de todo el estudio (véase la Tabla 7, más adelante). Cinco cerdos del grupo de control sin inocular presentaron anticuerpos maternos de PCV2 detectables -2 DPI y 2 cerdos tenían anticuerpos maternos frente al PCV1 detectables 7 DPI (véase la Tabla 8, más adelante). Los anticuerpos maternos tanto contra PCV1 como contra PCV2 en estos lechones disminuyeron 21 DPI. No se detectó seroconversión a PCV1 o a PCV2 en ninguno de los 8 cerdos control sin inocular a lo largo del estudio.

En el grupo en el que se inoculó PCV1, primero se detectó viremia en un cerdo inoculado 7 DPI (Tabla 7, más adelante), y se detectó por última vez 35 DPI. Cinco de 8 animales a los que se inoculó el clon de ADN infeccioso de PCV1 fueron positivos para viremia por PCV1. La duración promedio de la viremia continua por PCV1 fue de 0,625 semanas. 21 DPI, todos los animales en el grupo al que se inoculó PCV1 se habían seroconvertido a PCV1 y permanecían positivos para los anticuerpos frente al PCV1 hasta el final del estudio 49 DPI.

En el presente documento se muestra que el clon de ADN de PCV2 es infeccioso en cerdos. En el grupo en el que se inoculó el clon de ADN de PCV2, se detectó primero viremia por PCV2 7 DPI (Tabla 7, más adelante). 21 DPI, todos los animales del Grupo 3 a los que se inoculó PCV2 eran positivos para viremia por PCV2. La duración promedio de la viremia por PCV2 fue de 2,12 semanas. Dos cerdos en el grupo al que se inoculó PCV2 presentaron niveles detectables de anticuerpos maternos contra el PCV2 7 DPI (Tabla 8, más adelante) y los anticuerpos maternos en estos lechones disminuyeron 14 DPI. Primero se detectó seroconversión a PCV2 35 DPI, analizado mediante un ELISA específico de PCV2. 42 DPI, todos los cerdos a los que se inoculó el clon de ADN de PCV2 infeccioso se habían seroconvertido a PCV2.

En los cerdos del Grupo 4 a los que se inoculó el clon de ADN de PCV1-2 quimérico infeccioso, la viremia específica del virus quimérico se detectó por primera vez 14 DPI (Tabla 7, más adelante). Cuatro de 7 animales inoculados se convirtieron en virémicos por PCV1-2 entre 14 DPI y 42 DPI. La duración promedio de la viremia por PCV2 quimérico fue de 1 semana. Un cerdo tenía niveles detectables de anticuerpos maternos frente PCV2 7 y 14 DPI, pero los anticuerpos maternos disminuyeron 21 DPI (Tabla 8, más adelante). La seroconversión a los anticuerpos específicos del ORF2 de PCV2 se produjo por primera vez 28 DPI. 49 DPI, todos cerdos a los que se inoculó el clon de ADN de PCV1-2 quimérico se habían seroconvertido a anticuerpos específicos de ORF2 de PCV2.

En los cerdos a los que se inoculó el clon de PCV2-1 quimérico recíproco, no se detectó ADN viral específico del virus quimérico de PCV2-1 en las muestras de suero (Tabla 7, más adelante). Sin embargo, 21 DPI todos los animales del Grupo 5 se seroconvirtieron al anticuerpo frente a PCV1. Los productos de PCR amplificados de cerdos seleccionados de cada grupo se secuenciaron y se confirmó que eran los respectivos clones infecciosos auténticos usados en la inoculación en cada grupo.

Tabla 7. Detección de viremia mediante PCR anidada en sueros de los cerdos inoculados y control

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

^aSolución salina tamponada con fosfato (PBS) utilizada como control negativo

^bOcho cerdos de cada grupo, número de positivos/número analizado

^cPCV quimérico clonado o ADN de PCV quimérico en el plásmido pSK

Tabla 8. Seroconversión a anticuerpos contra el PCV2 en cerdos a los que se inoculó PCV2 o clones de ADN de PCV 1-2 quiméricos y seroconversión a anticuerpos contra el PCV1 en cerdos a los que se inoculó PCV1 o clones de ADN de PCV2-1

Grupo	Inóculo ^a	Anticuerpo analizado ^b	DPI ^c							
			-2	7	14	21	28	35	42	49
1	PBS	PCV1	NA	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	ADN de PCV1	ORF2 de PCV1	NA	3/8	2/8	8/8	4/4	4/4	4/4	4/4
3	ADN de PCV2	Virus completo PCV2	3/8	2/8	0/8	0/8	0/4	3/4	4/4	4/4
4	ADN de PCV1 - 2	Virus completo PCV2	2/8	1/8	1/8	0/8	1/4	1/4	3/4	4/4
5	ADN de PCV2 - 1	ORF2 de PCV1	NA	3/8	3/8	8/8	3/4	3/4	4/4	4/4

^aSolución salina tamponada con fosfato (PBS) utilizada como control negativo. Los inóculos eran PCV genómico y ADN de PCV quimérico en el plásmido pSK clonados

^bLos anticuerpos de PCV1 frente al ORF2 se midieron con un inmunofluorescencia directa específica del antígeno de PCV1. Los anticuerpos frente al PCV2 se midieron con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

^cDías después de la inoculación, número de positivos / número analizado.

Ejemplo 16

Evaluación clínica

Los cerdos se pesaron el 0 DPI y en el momento de las necropsias. Las temperaturas rectales y las puntuaciones de enfermedad respiratoria clínica, que varían entre 0 y 6 (0 = normal, 6 = grave) (P. G. Halbur y col., "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 49 DPI. Las observaciones clínicas que incluyen signos de enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad hepática (ictericia), enfermedad músculoesquelética y cambios en el estado del cuerpo, también se registraron diariamente. Un equipo de dos personas realizó todas las evaluaciones clínicas.

Ninguno de los cerdos control o inoculados mostró signos obvios del espectro clínico completo del PMWS. No se observaron diferencias en la ganancia de peso o las temperaturas rectales medias entre ninguno los grupos. Uno de los cerdos del Grupo 3 en el que se inoculó PCV1-2 murió un día después de inoculación. Después de la necropsia y el análisis clínico, no se detectaron agentes patógenos y la muerte no se asoció con el procedimiento de inoculación del virus de PCV1-2 quimérico.

Ejemplo 17Patología e Histopatología macroscópicas

A cuatro cerdos de cada grupo se les practicó la necropsia 21 y 49 DPI, respectivamente. El equipo de necropsia estaba enmascarado 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 visible macroscópicamente se registró para cada cerdo basándose en un sistema de puntuación descrito anteriormente (P. G. Halbur y *col.*, 1995, citado anteriormente). Otras lesiones, tal como el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, se observaron por separado. Se obtuvieron secciones para análisis histopatológico del cornete nasal, los pulmones (siete secciones) (*id.*), corazón, cerebro, ganglios linfáticos (traqueobronquial, iliaco, mesentérico, sublingual), amígdalas, timo, hígado, vesícula biliar, bazo, articulaciones, intestino delgado, colon, páncreas, y riñón. Los tejidos se examinaron según un patrón de enmascaramiento y se proporcionó una puntuación subjetiva de la gravedad de las lesiones pulmonares, de los ganglios linfáticos y hepáticas como se describe en el Ejemplo 7. Las puntuaciones en el pulmón variaron de 0 (normal) a 3 (neumonía intersticial linfocítica grave). Las puntuaciones en el hígado variaron entre 0 (normal) y 3 (hepatitis linfocítica grave). Las puntuaciones en los ganglios linfáticos fueron para una cantidad estimada de supresión linfocítica de los folículos que variaron entre 0 (normal o sin supresión linfocítica) y 3 (supresión linfocítica intensa y reemplazo histiocítico de folículos).

Para determinar la patogenicidad de PCV1, PCV2, PCV1-2 quimérico y los clones de ADN de PCV2-1 quiméricos recíprocos en cerdos se examinaron primero las lesiones macroscópicas. Los resultados se muestran en la Tabla 9 que se expone a continuación. Los ganglios linfáticos de animales del Grupo 1 control sin inocular eran normales tanto 21 como 49 DPI. Los cerdos en los cuatro grupos inoculados tenían grados variables de lesiones macroscópicas limitadas a los ganglios linfáticos. En los cerdos del Grupo 2 a los que se inoculó PCV1, los ganglios linfáticos eran normales macroscópicamente 21 DPI, sin embargo, se detectó inflamación de leve a moderada y decoloración de los ganglios linfáticos 49 DPI. Todos los cerdos del Grupo 3 a los que se inoculó PCV2 tenían los ganglios linfáticos agrandados de dos a cinco veces el tamaño normal, que estaban firmes y de color tostado tanto 21 como 49 DPI. Los ganglios linfáticos de los animales a los que se inoculó PCV1-2 quimérico presentaban inflamación de leve a moderada y estaban decolorados tanto 21 como 49 DPI en 5 de 7 cerdos. En los cerdos del Grupo 5, a los que se inoculó el clon de PCV2-1, 1 de 8 animales tenían inflamación leve y decoloración de los ganglios linfáticos 21 DPI. Las puntuaciones promedio de las lesiones macroscópicas en los ganglios linfáticos en cerdos a los que se inoculó el clon de PCV1-2 quimérico no eran estadísticamente diferentes de las de los grupos 1, 2, y 5, pero fueron estadísticamente diferentes de las de los cerdos del grupo 3 a los que se inoculó PCV2 patógeno tanto 21 como 49 DPI. Las puntuaciones promedio de lesiones linfocíticas macroscópicas 49 DPI de los animales a los que se inoculó PCV1, PCV2, y PCV1-2 no eran estadísticamente diferentes entre sí, pero todas eran estadísticamente diferentes de las puntuaciones promedio de las lesiones macroscópicas de los grupos 1 y 5.

A continuación, se examinaron las lesiones microscópicas. Los resultados se muestran en la Tabla 10 que se expone a continuación. No se detectaron lesiones microscópicas ni en los cerdos del grupo 1 control sin inocular ni en los cerdos del grupo 2 a los que se inoculó PCV1 cualquier DPI. Las lesiones pulmonares microscópicas caracterizadas por neumonía linfoplasmocítica peribronquiolar e histiocítica broncointersticial se observaron en 1 de 8 de los cerdos a los que se inoculó PCV2. En los animales a los que se inoculó 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. Se observó miocarditis linfoplasmocítica multifocal leve en 2 de 8 cerdos en el grupo al que se inoculó PCV2. Los tejidos cardíacos de animales a los que se inoculó PCV1-2 y PCV2-1 estaban libres de lesiones microscópicas. Se observó nefritis intersticial linfoplasmocítica multifocal en 4 de 8 cerdos en el grupo al que se inoculó PCV2, en 2 de 7 cerdos a los que se inoculó PCV1-2 y en 1 de 8 cerdos a los que se inoculó PCV2-1. Se observó depleción linfocítica de leve a moderada y reemplazo histiocítico de los folículos en las amígdalas de 5 de 8 cerdos, en el bazo de 3 de 8 cerdos y en los ganglios linfáticos en 8 de 8 cerdos en el grupo al que se inoculó PCV2. En los animales a los que se inoculó PCV1-2 quimérico, se observaron depleción linfocítica suave y reemplazo histiocítico de los folículos en los ganglios linfáticos de 2 de 7 cerdos pero no se detectaron ni en el bazo ni en las amígdalas. No se observó depleción linfocítica ni reemplazo histiocítico de los folículos en los ganglios linfáticos, el bazo o las amígdalas de los animales a los que se inoculó PCV2-1 quimérico recíproco. Se observó hepatitis linfoplasmocítica de leve a moderada en 7 de los 8 cerdos a los que se inoculó PCV2. Se observó hepatitis linfoplasmocítica leve en 2 de los 7 cerdos a los que se inoculó PCV1 – 2. No se observó hepatitis linfoplasmocítica en los cerdos a los que se inoculó PCV2-1 quimérico recíproco. Las lesiones en otros tejidos no eran notables.

Las lesiones microscópicas en el pulmón, el hígado y los ganglios linfáticos se puntuaron de acuerdo con un sistema de puntuación publicado (P. G. Halbur y *col.*, 1995, citado anteriormente). Los resultados se muestran en la Tabla 10 que se expone a continuación. Las puntuaciones promedio de las lesiones en los ganglios linfáticos en cerdos del Grupo 4 a los que se inoculó PCV1-2 quimérico eran similares a los de los grupos 1, 2 y 5 pero eran estadísticamente diferentes de los cerdos del Grupo 3 a los que se inoculó PCV2 patógeno, tanto 21 como 49 DPI. Las puntuaciones promedio de las lesiones hepáticas microscópicas del grupo al que se inoculó PCV1-2 quimérico 21 DPI eran estadísticamente diferentes de las de los animales del Grupo 3 a los que se inoculó PCV2 pero eran similares a las de los cerdos de los Grupos 1, 2 y 5 21 DPI. 49 DPI, las puntuaciones promedio de las lesiones hepáticas microscópicas de los cerdos del grupo 4 a los que se inoculó PCV1-2 quimérico no eran estadísticamente diferentes de las de los cerdos de los Grupos 1, 2, 3 y 5. No existían sistemas de puntuación aceptables para otros

tejidos u órganos.

Tabla 9. Lesiones macroscópicas de los ganglios linfáticos en cerdos control e inoculados

Grupo	Inóculo ^a	DPI ^b	
		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)

^aSolución salina tamponada con fosfato (PBS) utilizada como control negativo. Los inóculos eran PCV genómico o ADN de PCV quimérico clonados en el plásmido pSK.

^bA cuatro cerdos de cada grupo se les practicó la necropsia 21 DPI y a los cerdos restantes se les practicó la necropsia 49 DPI.

Número de positivos/número analizado. Número con lesiones / número analizado (gama de la gravedad estimada del aumento de tamaño de los ganglios linfáticos)

Tabla 10. Distribución de las lesiones histopatológicas en diferentes tejidos / órganos de los cerdos control e inoculados

Grupo	Inóculo ^a	DPI ^b	Pulmón ^c	Hígado ^d	Ganglios linfáticos ^e	Bazo	Timo	Ileon	Cerebro	Corazón	Riñón	Amígdalas
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 PCV1	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
3	ADN de PCV2	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
		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 PCV1 - 2	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
		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 PCV2 - 1	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)	1/4 (0,25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

^aSolución salina tamponada con fosfato (PBS) utilizada como control negativo. Los inóculos eran PCV genómico o ADN de PCV quimérico clonados en el plásmido pSK.

^bA cuatro cerdos de cada grupo se les practicó la necropsia 21 DPI y a los cerdos restantes se les practicó la necropsia 49 DPI.

^cNúmero de positivos/ número analizado (puntuación promedio histológica de los pulmones: 0, normal; 1, neumonía intersticial leve; 2, moderada; 3, grave).

^dNúmero de positivos/ número analizado (puntuación promedio histológica del hígado: 0, normal; 1, hepatitis leve; 2, moderada; 3, grave).

^eNúmero de positivos/ número analizado (puntuación promedio de depleción linfóide (ganglios linfáticos) histológica: 0, normal; 1, leve; 2, moderada; 3, grave).

Ejemplo 18Serología

Se extrajo sangre de todos los cerdos -2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DPI. Los anticuerpos séricos frente al PRRSV se analizaron usando el ensayo Herd Check PRRSV ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, MA). Los anticuerpos séricos para PPV se detectaron mediante un ensayo de inhibición de la hemoaglutinación (HI) (H. S. Joo y col., "A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody," Aust. Vet. J. 52:422 - 424 (1976)). Los anticuerpos séricos para PCV2 se detectaron mediante un ELISA indirecto modificado basado en la proteína de la cápside ORF2 recombinante de PCV2 como se ha descrito anteriormente en el presente documento (véase también P. Nawagitgul y col., "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 PCV1 se detectaron mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecto (IFA). Las células PK-15 infectadas con PCV1 se cultivaron en 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 minutos. A las cámaras se añadieron cien microlitros de muestra de suero de cerdo diluida a 1:10 en PBS y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 45 minutos 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, se cubrieron con cubreobjetos y se examinaron en un microscopio fluorescente. Para el control positivo, las 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 marcada con FITC (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.). Para el control negativo, las células infectadas con PCV1 se incubaron con suero de cerdo diluido a 1:10 sin anticuerpo frente a PCV1 y PCV2, seguido de una incubación con IgG anti-cerdo de cabra marcada con FITC (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.)

Ejemplo 19Detección mediante PCR

Para detectar viremia por PCV1, PCV2, PCV1-2 quimérico y PCV2-1 quimérico recíproco en sueros de cerdos inoculados, las muestras de suero recogidas a diferentes DPI se analizaron mediante PCR. El ADN viral se extrajo a partir de 100 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. 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 anidada (Tabla 6, anterior). El primer conjunto de cebadores anidados se diseñó basándose en las secuencias de PCV1 publicadas. Los cebadores de Gen.PCV1 expuestos en la SEC ID N° 20 y Orf.PCV1 expuestos en la SEC ID N° 19 amplificaron un fragmento de 400 pares de bases en la presencia del genoma de PCV1. Los cebadores anidados, nested.Gen.PCV1 expuesto en la SEC ID N° 22 y. nested.Orf.PCV1 expuesto en la SEC ID N° 21, amplificaron un fragmento de 220 pares de bases.

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

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

Para detectar viremia por PCV2-1 quimérico recíproco, la primera ronda de la reacción de PCR empleó el cebador específico de PCV2 Gen.PCV2 expuesto en la SEC ID N° 24 y el cebador específico de ORF2 de PCV2 Orf. PCV1 expuesto 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 nested.Gen.PCV2 expuesto en la SEC ID N° 26 y el cebador específico de ORF2 de PCV2 nested.Orf.PCV1 expuesto en la SEC ID N° 21 se usaron para amplificar un fragmento quimérico de 460 pares de bases. Todos los parámetros de la PCR eran esencialmente los mismos, que constan de 38 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 50 minutos, hibridación a 45 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1,5 minutos. Las muestras de suero de cerdos control negativos se analizaron mediante un ensayo diagnóstico PCR-RFLP, que puede detectar y diferenciar tanto PCV1 como PCV2 como se ha descrito anteriormente (M. Fenaux y col., "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 la PCR de animales seleccionados en cada grupo se secuenciaron para verificar el origen de los virus que infectan los cerdos.

Ejemplo 20

Inmunohistoquímica (IHQ)

- 5 La detección mediante IHQ del 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 IHQ, de acuerdo con los procedimientos generales descritos anteriormente (S. D. Sorden y col., "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)).
- 10 Basándose en la tinción por IHQ del antígeno específico de PCV2, los tejidos linfoides de los cerdos control no inoculados y a los que se inoculó PCV1 y PCV2-1 eran negativos para EL antígeno de PCV2. El antígeno de PCV2 se detectó en tejidos linfoides de 7 de 8 animales en el grupo inoculado con PCV2. El antígeno de PCV2 también se detectó en tejido linfoides de 1 de 7 cerdos del grupo al que se inoculó PCV1-2 quimérico.

Ejemplos 21-24

- 15 Los siguientes materiales y procedimientos generales se emplean en los Ejemplos 21 a 24:

(1) Virus y células. El virus PCV1 utilizado en la presente invención se aisló originalmente de una línea de células PK-15 (ATCC CCL-33) (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente). El virus PCV2 usado en este documento se aisló originalmente de una muestra de tejido del bazo de un cerdo con PMWS de origen natural (aislado 40895) (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente; M. Fenaux y col., 2000, citado anteriormente.). La línea de células PK-15 usada en el presente documento estaba libre de contaminación con PCV1 (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente).

(2) Pases en serie de PCV2 in vitro. Una reserva homogénea del virus PCV2, designado pase 1 (VP1), se generó mediante transfección de células PK-15 con el clon del ADN de PCV2 infeccioso como se ha descrito anteriormente (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente). La reserva de virus VP1 PCV2 se pasó después en serie 120 veces en células PK-15. Las células infectadas, cuando alcanzan la confluencia, se subcultivaron en una proporción aproximado de 1 a 3 en medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle y L-glutamina suplementado 2 % de suero bovino (FCS) y 1 X de antibiótico (Invitrogen, Inc., CA). Para cada 10 a 15 pases, las células infectadas se recogieron y congelaron y descongelaron tres veces, y se utilizaron para inocular un nuevo cultivo de PK-15. El cultivo recién infectado se pasó después de 10 a 15 veces mediante subcultivo antes de repetir el procedimiento de congelación-descongelación. Este procedimiento se repitió hasta que alcanzó el pase 120 (VP120). El virus cosechado en cada pase se almacenó a -80 °C para análisis posteriores.

(3) Caracterización biológica de los virus PCV1, PCV2 VP1 y PCV2 VP120 en células PK-15. Una curva de crecimiento de una etapa se realizó para determinar la capacidad de crecimiento comparativo de PCV1, PCV2 VP1 y PCV2 VP120 *in vitro*. Las células PK-15 se cultivaron en seis placas de 12 pocillos. Las placas se infectaron, por duplicado, con PCV1, PCV2 VP1 o VP120 PCV2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1, respectivamente. Después de 1 hora de absorción, se retiró el inóculo y la monocapa celular se lavó cinco veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después, a cada pocillo se añadieron medios MEM de mantenimiento (2 % de suero bovino fetal y 1 X de antibióticos) y los cultivos de células infectadas se incubaron de forma continua a 37 °C con 5 % de CO₂. Cada 12 horas, los medios y las células infectadas de los pocillos duplicados de cada grupo inoculado se cosecharon y almacenaron a -80 °C hasta la titulación del virus. Los títulos infecciosos de los virus PCV1 y PCV2 recogidos a diferentes puntos de tiempo se determinaron mediante ensayos de inmunofluorescencia (IFA) específicos para PCV1 o PCV2 como se ha descrito previamente (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente; M. Fenaux y col., 2003, citado anteriormente).

(4) Caracterización genética de los virus PCV2 a diferentes pases. Los virus PCV2 cosechados a partir de los pases 1, 30, 60, 90, y 120 se caracterizaron genéticamente mediante la determinación de las secuencias genómicas completas de los virus de cada pase. El ADN viral se extrajo de 100µl de los materiales del cultivo celular recogidos en los pases 1, 30, 60, 90, y 120 mediante el uso de reactivo DNAzol de acuerdo con el protocolo del fabricante (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio). El ADN extraído se volvió a suspender en agua sin ADNasa, ARNasa y proteinasa. Para amplificar el genoma completo, se utilizaron tres pares de cebadores específicos de PCV2 para amplificar tres fragmentos solapantes: par de cebadores para PCV2,2B (5'-TCCGAAGACGAGCGCA-3', expuesto en la SEC ID N° 27) and PCV2,2A (5'-GAAGTAATCCTCCGATAGAGAGC-3', expuesto en la SEC ID N° 28), par de cebadores para PCV2,3B (5'-GTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGC-3', expuesto en la SEC ID N° 29) y PCV2,3A (5'-ATTAGCGAACCCCTGGAG-3', expuesto en la SEC ID N° 30), y par de cebadores para PCV2,4B (5'-AGAGACTAAAGGTGGAACCTGTACC-3', expuesto en la SEC ID N° 31) and PCV2,4A (5'-AGGGGGGACCAACAAAAT-3', expuesto en la SEC ID N° 32). La reacción de PCR consistió en 38 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 46 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos, seguido de una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de la PCR del tamaño esperado se escindieron de los geles de agarosa al 0,8 % seguido de la purificación con un kit GeneClean (Bio 101, Inc., La Jolla, CA). Los productos de la PCR se secuenciaron directamente para ambas

cadenas utilizando los cebadores de PCR. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se recopilaron y analizaron con el programa MacVector de acceso público (Oxford Molecular Ltd., Beaverton, OR) usando la alineación Clustal. La secuencia completa de PCV2 VP120 se comparó con VP1 PCV2 y otra 91 otros aislados de PCV2, así como 4 aislados de PCV1 disponibles en la base de datos GenBank.

5 (5) Caracterización experimental de PCV2 VP120 y VP1 pasados en serie. Para determinar el potencial patógeno de VP120 PCV2, treinta y un cerdos SPF de 3 a 4 semanas de edad se asignaron aleatoriamente a 3 grupos y se alojaron por separado. Antes de la inoculación, las muestras de suero de todos los lechones se analizaron mediante PCR para la presencia de ADN de PCV1 o PCV2. Para maximizar la eficiencia de la inoculación, a cada cerdo se inoculó 1 ml del inóculo por vía intramuscular y 3 ml por vía intranasal. A los diez cerdos del grupo 1 se inoculó tampón PBS como controles negativos. Once cerdos del Grupo 2 recibieron cada $10^{4.9}$ DICT₅₀ de PCV2 VP120 y diez cerdos del Grupo 3 recibieron cada uno recibió $10^{4.9}$ DICT₅₀ de PCV2 VP1. Todos los cerdos se controlaron para detectar signos clínicos de enfermedad. Se recogieron muestras de suero de cada cerdo los días -1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la inoculación (DPI). 21 DPI, se practicó la necropsia a 5 cerdos seleccionados al azar de cada grupo. A los cerdos restantes de cada grupo se les practicó la necropsia 42 DPI.

10 (6) Evaluación clínica. Los cerdos se pesaron -1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 DPI. Las temperaturas rectales y las puntuaciones clínicas, que van de 0 a 6 (0 = normal; 6 = grave) (M. Fenaux et al, 2002, citado anteriormente.), se registraron en días alternos de 0 a 42 DPI. Las observaciones clínicas que incluyen signos de enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad hepática (ictericia), enfermedad músculoesquelética y cambios en el estado del cuerpo, también se registraron a intervalos de dos días. Todas las evaluaciones clínicas las realizó un equipo de dos personas para confirmar las observaciones.

15 (7) Patología e histopatología macroscópica. Se realizaron necropsias completas en todos los cerdos. El equipo de necropsia estaba enmascarado para el estado de infección de los cerdos. Se estimó el porcentaje de pulmón con neumonía visible macroscópicamente para cada cerdo basándose en un sistema de puntuación descrito anteriormente (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente). Las lesiones tales como el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos (que varía desde 0 para normal a 3 para tres veces el tamaño normal) se puntuaron por separado. Las secciones para el examen histopatológico se tomaron de los cornetes nasales, los pulmones (cinco secciones, véase, M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente), el corazón, el cerebro, los ganglios linfáticos (traqueobronquiales, ilíacos, mesentéricos, subilíacos e inguinales superficiales), las amígdalas, el hígado, el timo, el bazo, el páncreas y el riñón. Los tejidos se analizaron siguiendo un patrón de enmascaramiento y se les dio una puntuación subjetiva de la gravedad de lesiones pulmonares, en los ganglios linfáticos y hepáticas (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente). Las puntuaciones en el pulmón variaron entre 0 (normal) y 3 (neumonía intersticial linfocítica grave). Las puntuaciones en el hígado variaron entre 0 (normal) y 3 (hepatitis intersticial linfocítica grave). Las puntuaciones en los ganglios linfáticos fueron para una cantidad estimada de supresión linfocítica de los folículos que variaron entre 0 (normal o sin supresión linfocítica) y 3 (supresión linfocítica intensa y reemplazo histiocítico de folículos (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente).

20 (8) Serología. Se extrajeron muestras sangre de todos los cerdos -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DPI. Los anticuerpos séricos frente a PCV2 se detectaron mediante un ELISA indirecto modificado basado en la proteína de la cápsida recombinante ORF2 de PCV2 (P. Nawagitgul y col., 2002, citado anteriormente). Las muestras de suero con una proporción muestra / positivo (S / P) por encima de 0,2 se consideraron seropositivos para PCV2.

25 (9) Ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó para determinar las cargas virales de PCV2 en las muestras de suero recogidas -1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 DPI y en las muestras de tejidos linfocíticos recogidas 21 DPI y 42 DPI. El par de cebadores para MCV1 (5'-GCTGAACCTTTTGAAGTGAGCGGG-3', expuesto en la SEC ID N° 17) y MCV2 (5'-TCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCA-3', expuesto en la SEC ID N° 18) (M. Fenaux y col., 2000, citado anteriormente) se usó para la PCR cuantitativa en tiempo real. La reacción de PCR se realizó en presencia de colorante verde SYBR intercalante (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) como se describe en el presente documento. Una serie de diluciones estándar con una cantidad conocida de plásmido pBluescript que contiene una única copia del genoma de PCV2 (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente) se realizó simultáneamente en cada reacción PCR en tiempo real para cuantificar el número de copias genómicas de virus.

30 (10) Inmunohistoquímica (IHQ). La detección mediante IHQ del antígeno específico de PCV2 se realizó en los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y los tejidos del timo recogidos durante la necropsia de 21 y 42 DPI como se ha descrito en el presente documento anteriormente (M. Fenaux y col., 2002, citado anteriormente). La cantidad del antígeno de PCV2 distribuida en los tejidos linfocíticos se puntuó de forma ciega mediante la asignación de una puntuación de 0 si no hay señal, de 3 para una señal positiva fuerte (S.D. Sorden y col., "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)).

35 (11) Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el sistema SAS® (Versión 8,02, SAS institute Inc. Cary NC 27513). Las características de crecimiento de los virus se compararon mediante análisis regresivos utilizando el procedimiento GLM. Las proporciones S / P de las muestras de suero se compararon mediante análisis de varianza, con el procedimiento MIXED. El modelo incluyó los efectos de inóculo, los DPI y su interacción. Las proporciones S/P se dicotomizaron con la presencia / ausencia de seroconversión en S / P = 0,20 y se analizaron mediante regresión logística utilizando el procedimiento de ecuaciones generalizadas en el procedimiento SENROD. El número medio de copias del genoma viral en el suero y los ganglios linfáticos de los lechones de los grupos 2 y 3 se compararon mediante la prueba de

Kruskal-Wallis utilizando el procedimiento NPAR1WAY y / o mediante análisis de la varianza de los datos clasificados, seguido de una prueba de Bonferroni de múltiples rangos de medias, utilizando el procedimiento GLM. Se analizaron los datos de serología y viremia para todos los cerdos hasta 21 DPI, y por separado para los cerdos a los que se practicó la necropsia 42 DPI. Las puntuaciones de los signos clínicos se dicotomizaron con la presencia / ausencia de signos clínicos de cada fecha de examen, y por cerdo durante todo el período de estudio y se compararon entre grupos mediante la prueba exacta de Fisher utilizando el procedimiento FREQ y por regresión logística utilizando el procedimiento LOGISTIC. Las puntuaciones patológicas e histopatológicas macroscópicas se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis utilizando el procedimiento NPAR1WAY y / o mediante análisis de la varianza utilizando el procedimiento GLM, seguido de una prueba de Bonferroni de múltiples medias. La proporción de cerdos con lesiones histopatológicas y macroscópicas en diversos tejidos se compararon entre los grupos mediante la prueba exacta de Fisher utilizando el procedimiento FREQ.

Ejemplo 21

Comparación de la replicación de PCV2 VP120 y PCV2 VP1 en células PK-15

Para determinar las características de crecimiento de PCV1, PCV2 VP1 y VP120, curvas de crecimiento de una sola etapa se realizaron por duplicado de forma simultánea para PCV1, PCV2 VP1 y PCV2 VP120. Los títulos infecciosos de virus recolectados a intervalos de 12 horas se determinaron mediante IFA (Fig. 12). Los títulos iniciales después de la infección a las 12 horas de la inoculación fueron de aproximadamente 10^{15} DICT₅₀/ml para los tres virus. Los títulos infecciosos de PCV1 y PCV2 VP120 comparados con PCV2 VP1 aumentaron de manera diferente ($p = 0,0053$) de 12 a 96 horas. A las 96 horas después de la infección, PCV1 y PCV2 VP120 tenían títulos de $10^{3,66}$ y $10^{3,75}$ DICT₅₀/ml, mientras que PCV2 VP1 fue $110^{2,83}$ DICT₅₀/ml (Fig. 12). Se demostró que PCV2 VP120 se replicaba sorprendentemente de manera más eficiente en las células PK-15 que en PCV2 VP1.

Ejemplo 22

Identificación de dos mutaciones de aminoácidos en la proteína de la cápside del PCV2 durante pases seriados

Los genomas completos de los pases de PCV2 números 1, 30, 60, 90 y 120 se amplificaron y se secuenciaron. Los análisis de la secuencia revelaron que había un total de 2 mutaciones de nucleótidos y 2 de aminoácidos en todo el genoma después de 120 pases. La primera mutación apareció en el pase 30 (VP30) en el que se sustituyó una prolina por una alanina en la posición 110 de la cápside (P110A) (Fig. 13). Esta mutación también estuvo presente durante los pases restantes. Una segunda mutación de arginina a serina en la posición 191 de la cápside (R191S) se identificó en el pase 120, pero no en pases menores (Fig. 13). Las mutaciones de aminoácidos fueron el resultado de las mutaciones correspondientes que se produjeron en el genoma en las posiciones de nucleótidos 328 (C a G) y 573 (A a C). En la posición 328 de la secuencia de nucleótidos, la citosina cambia a guanina (C a G), lo que conduce al cambio de aminoácidos de P110A. En la posición 573, la adenina cambia a citosina (A a C) que conduce al segundo cambio de aminoácido de R191S.

Mediante la comparación de todas las secuencias de PCV1 y PCV2 conocidas en el GenBank incluyendo 91 aislados de PCV2 y 4 aislados de PCV1 se encontró que los que la mutación P110A es única (Fig. 13), ya que todos los aislados conocidos de PCV1 and PCV2 tienen una prolina en el residuo 110 de la proteína de la cápside. La serina en la mutación R191S es también única. Sin embargo, el aminoácido en la posición 191 a menudo es variable: Los aislados de PCV2 de origen norteamericano tienen una arginina, los aislados de PCV2 de origen canadiense y francés tienen glicina y los aislados de PCV2 de origen español, taiwanés y alemán tienen una alanina. Todos los aislados de PCV1 no patógenos tienen un residuo de treonina (Fig. 13).

Ejemplo 23

Comparación de la duración de la viremia y las cargas vírales del virus PCV2 VP120 y el virus PCV2 VP1 en el suero de los cerdos infectados

Se extrajeron muestras de suero de todos los cerdos control e inoculados -1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 DPI y se analizaron para determinar la viremia por PCV2 mediante PCR cuantitativa en tiempo real y para el anticuerpo anti-PCV2 mediante ELISA. Antes de la inoculación -1 DPI, las muestras de suero de los cerdos dieron negativo para el ADN de PCV2.

Los cerdos control negativo del grupo 1 dieron resultados negativos para la viremia por PCV2 a lo largo de todo el estudio (véase la Tabla 11, más adelante). Todos los cerdos del grupo 1 tenían anticuerpos maternos frente al PCV2 detectable-1 DPI, que disminuyeron ya 21 DPI. La seroconversión a PCV2 no se detectó en ninguno de los diez cerdos control negativo (véase la Tabla 12, a continuación).

En los cerdos inoculados con PCV2 VP120 del grupo 2, la viremia se detectó por primera vez en uno de los once cerdos 7 DPI (Tabla 11, Fig. 14). Un total de 4 cerdos del grupo 2 fueron virémicos durante el estudio. La duración promedio de la viremia continua fue de 1,6 semanas. 35 DPI, todos los cerdos del Grupo 2 seroconvirtieron a PCV2 (Tabla 12).

En los cerdos inoculados con PCV2 VP1 del grupo 3, la viremia se detectó por primera vez en siete de los diez cerdos 7 DPI (Tabla 11, Fig. 14). Nueve de los diez cerdos del grupo 3 se convirtieron en virémicos para PCV2 durante el estudio y la duración promedio de la viremia continua fue de 3 semanas. Todos los animales del Grupo 3 seroconvirtieron a PCV2 35 DPI (Tabla 12).

5 El intervalo de los números de copias del genoma del PCV2 por ml de suero en muestras positivas fue del 8.840 a 274.800 en los cerdos del grupo 2 a los que se inoculó PCV2 VP120 y de 26.520 a 120.000.000 en los cerdos del grupo 3 a los que se inoculó PCV2 VP1 (Fig. 14). Las cargas de las copia genómica de PCV2 por ml de suero fueron mayores en los cerdos del grupo 3 que en los del grupo 2 cerdos hasta 21 DPI ($p = 0,0003$) y 42 DPI ($p = 0,039$). Sin embargo, el ADN de PCV2 se recuperó de los ganglios linfáticos de solo 3/11 cerdos del Grupo 2 y 2/10 cerdos del grupo 3 y la mediana de las cargas de las copias del genoma de PCV2 por mg de ganglio linfático traqueobronquial (TBLN) no difirió entre los grupos 2 y 3 ($p = 0,72$). El virus recuperado de los sueros y TBLN de 4 cerdos seleccionados de los Grupos 2 y 3 se secuenciaron y los análisis de secuencia revelaron que los virus recuperados se originaban de los inóculos.

15 Las proporciones S / P de los anticuerpos frente PCV2 diferían entre los Grupos 1, 2 y 3 ($p < 0,0001$) y con el tiempo ($p < 0,0001$). Se demostró que el virus PCV2 VP120 redujo significativamente la duración de la viremia y las cargas víricas en el suero de cerdos infectados en comparación con el virus PCV2 VP1.

Tabla 11. Detección de viremia mediante PCR en tiempo real en sueros de los cerdos inoculados y control

Grupo	Inóculo	Nº de cerdos positivos / nº analizado ^a							
		Días después de la inoculación							
		-1	7	14	21	28	35	42	total
1	Control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/5	0/10
2	PCV2 VP120	0/11	1/11	2/11	3/11	0/6	1/6	1/6	4/11
3	PCV2 VP 1	0/10	7/10	8/10	8/10	3/5	3/5	1/5	9/10

^aA cinco cerdos por grupo se les practicó la necropsia 21 días después de la inoculación (DPI) y a los cerdos restantes se les practicó la necropsia 42 DPI.

20 **Tabla 12. Seroconversión a anticuerpos** frente a PCV2 en cerdos inoculados con pases 1 de PCV2 (VP1) y 120 (VP120)

Grupo	Inóculo	Nº de cerdos positivos/nº analizado ^a							
		Días después de la inoculación							
		-1	7	14	21	28	35	42	
1	Control	10/10 ^b	1/10	1/10	0/10	0/5	0/5	0/5	0/5
2	PCV2 VP120	3/11 ^b	0/11	0/11	0/11	0/6	6/6	6/6	6/6
3	PCV2 VP 1	1/10 ^b	0/10	1/10	2/10	4/5	5/5	5/5	5/5

^aA cinco cerdos por grupo se les practicó la necropsia 21 días después de la inoculación (DPI) y a los cerdos restantes se les practicó la necropsia 42 DPI.

^bLos anticuerpos maternos eran detectables -1 DPI pero disminuyeron en todos los grupos de 7 a 21 DPI.

Ejemplo 24

Atenuación del virus PCV2 VP120 en cerdos

25 Se observaron signos clínicos leves (estornudos y pelo áspero) en algunos animales de los tres grupos. Dos de los 10 cerdos a los que no se inoculó y los 21 cerdos a los que sí se inoculó desarrollaron signos clínicos ($p = 0,051$). Hasta 21 DPI, los cerdos de los Grupos 2 y 3 tenían una probabilidad 58 (IC del 95 %: [13,1; 255,0]) y 41 [9,3;178,0] veces mayor de mostrar signos clínicos leves en cualquier fecha de examen que los cerdos control negativo, sin diferencias entre los cerdos de los grupos 2 y 3 (OR_{3vs2} : 1,4[0,8;2,6]). Para los 16 cerdos a los que se practicó la necropsia 42 DPI, cuando se evaluaron durante todo el periodo de estudio, de nuevo, los cerdos de los Grupos 2 y 3 eran más propensos a mostrar signos clínicos leves que los cerdos de control negativo (OR_{2vs1} : 20,4[4,6;90,1]; OR_{3vs1} : 71,6 [16,0;320,8]) teniendo los cerdos del grupo 3 una probabilidad 3,5 [1,9;6,6] veces mayor de mostrar signos clínicos que los cerdos del grupo 2. No se observaron diferencias en la ganancia de peso ($p = 0,081$) o las temperaturas rectales medias ($p > 0,05$) entre ninguno los grupos.

35 En las necropsias, los ganglios linfáticos de 2/5 cerdos del grupo 1 estaban ligeramente agrandados, sin embargo esto no se asoció con la infección por PCV2 como se pone de manifiesto por la ausencia de ADN de PCV2 o

seroconversión. En la necropsia 42 DPI, todos los cerdos del grupo 1 tenían ganglios linfáticos normales (véase la Tabla 13, a continuación). Los cerdos del grupo 2 a los que se ha inoculado PCV2 VP120 tenían los ganglios linfáticos agrandados de leve a moderadamente, tanto 21 como 42 DPI (Tabla 13). Los ganglios linfáticos en los cerdos del Grupo 3 estaban de moderadamente a intensamente agrandados tanto 21 como 42 DPI (Tabla 13). Los cerdos a los que se inoculó PCV2 VP1 presentaban neumonía macroscópica visible 21 DPI. No se encontró neumonía macroscópica visible en los cerdos del Grupo 1 o 2, ya sea 21 o 42 DPI.

Se detectaron lesiones pulmonares microscópicas caracterizadas por neumonía linfoplasmacítica peribronquiolar e histiocítica broncointersticial leve y lesiones hepáticas caracterizadas por hepatitis linfoplasmacítica leve en los cerdos de todos los grupos (véase la Tabla 14, a continuación). Se detectó depleción linfoide (DL) leve de los folículos de los ganglios linfáticos en 0/5 cerdos del Grupo 1 21 y 42 DPI, en 3/5 (21 DPI) y 2/6 (42 DPI) cerdos del grupo 2, en 4/5 (21 DPI) y 5/5 (42 DPI) cerdos del grupo 3 (Tabla 14). No se observó reemplazo (RH) histiocítica leve de los folículos de los ganglios linfáticos en los cerdos de Grupo 1. En el Grupo 2, se observó RH leve en los ganglios linfáticos de 0/5 cerdos 21 DPI y 2/6 cerdos 42 DPI. En el Grupo 3, se observó RH de leve a moderado de los ganglios linfáticos en 3/5 cerdos, tanto 21 como 42 DPI. Las amígdalas y los folículos del tejido del bazo de los cerdos del Grupo 1 carecían de DL y RH 21 o 42 DPI. Se encontró DL leve de los folículos de las amígdalas en 2/5 cerdos en el Grupo 2 21 DPI. Se encontró DL leve o moderada de los folículos de las amígdalas en 2/5 cerdos en el Grupo 3 21 DPI y RH leve del tejido de las amígdalas en 1/5 cerdos del Grupo 3, 21 y 42 DPI. Se observó DL leve de los folículos del bazo en 2/5 y 1/6 cerdos del Grupo 2 21 y 42 DPI, respectivamente. Se observó DL de leve a moderada de los folículos del bazo en 4/5 cerdos del grupo 3 21 y 42 DPI. En los cerdos del Grupo 2 se encontró RH leve de los folículos del tejido del bazo en 1/6 cerdos 42 DPI. En el Grupo 3, 4/5 cerdos 21 DPI y 3/5 cerdos 42 DPI tenían RH de leve a moderado de los folículos del tejido del bazo (Tabla 14). La presencia de lesiones en otros tejidos y órganos se resume en la Tabla 14.

En las necropsias (21 y 42 DPI), el antígeno de PCV2 no se detectó mediante IHQ en los tejidos linfoides de los cerdos control negativo del Grupo 1. En el grupo 2 en el que se inoculó PCV2 VP120 2, se detectaron pequeñas cantidades de antígeno de PCV2 en tejidos de bazo de 1/5 cerdos 21 DPI, en los tejidos de los ganglios linfáticos de 2/6 cerdos 42 DPI y en los tejidos de las amígdalas de 3/6 cerdos 42 DPI (véase la Tabla 15, a continuación). En el grupo 3 en el que se inoculó PCV2 VP0 se detectaron cantidades de bajas a altas del antígeno de PCV2 en los tejidos de los ganglios linfáticos de 5/5 cerdos, en los tejidos de las amígdalas de 4/5 cerdos y en los tejidos de bazo de 4/5 cerdos 21 DPI . 42 DPI, se detectaron cantidades DE bajas a moderadas deL antígeno de PCV2 en el Grupo 3 en el que se inoculó PCV2 VP0 (Tabla 15).

Todas las puntuaciones patológicas e histopatológicas macroscópicas 21 DPI y 42 DPI se compararon mediante análisis de la varianza utilizando el procedimiento GLM seguido de una prueba de Bonferroni de medias múltiples. 21 DPI, las puntuaciones medias de los grupos 1 y 2 son similares ($p = 1,00$), pero difieren de las puntuaciones medias del grupo 3 ($p = 0,0032$). 42 DPI, las puntuaciones medias del grupo 1 difieren de las del grupo 2 ($p = 0,0083$) y del grupo 3 ($p = 0,0001$), y las puntuaciones medias de grupo 2 son más leves que las del Grupo 3 ($p = 0,0274$) (Tablas 13-15).

Tabla 13. Lesiones macroscópicas de los ganglios linfáticos y pulmonares en cerdos control e inoculados

Grupo	Inóculo	Nº de credos con ganglios linfáticos agrandados ^a		Nº de cerdos con lesiones macroscópicas de neumonía	
		21 DPI	42 DPI	21 DPI	42 DPI
1	Control	2/5 (0,4 ^b) ^c	0/5 (0,0) ^I	0/5 (0,0) ^I	0/5 (0,0)
2	PCV2 VP120	2/5 (0,4) ^I	4/6 (1,3) ^{II}	0/6 (0,0) ^I	0/5 (0,0)
3	PCV2 VP1	5/5 (2,2) ^{II}	5/5 (2,6) ^{II}	2/5 (2,6) ^{II}	0/5 (0,0)

^aA cinco cerdos de cada grupo se les practicó la necropsia 21 días después de la inoculación (DPI) y a los cerdos restantes se les practicó la necropsia 42 DPI.

^bLos valores entre paréntesis son las puntuaciones medias del aumento de tamaño de los ganglios linfáticos estimado (0 = normal a 3 intensamente agrandados y descoloridos) y el porcentaje medio de los pulmones afectados por la neumonía macroscópica visible (0 - 100 %)

^cLos superíndices diferentes (I, II) indican una puntuación media diferente entre los grupos ($p < 0,05$).

Tabla 14. Distribución de las lesiones histopatológicas en diferentes tejidos y órganos de los cerdos control e inoculados

Inóculos	Nº de cerdos positivos/nº de cerdos analizados												
	Grupo	DPI ^a	Pulmón		Ganglios linfáticos		Amígdalas		Bazo		Hígado	Riñón	Corazón
			DL ^c	RH	DL [†]	RH	DL [†]	RH [†]	DL [†]	RH [†]			
1	Control	21	0/5 (0,0) ^b	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	1/3	1/5
		42	3/5 (0,6)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	1/5 (0,2)	1/5	0/5
2	PCV2	21	2/5 (0,4)	3/5 (0,6)	0/5 (0,0)	2/5 (0,4)	0/5 (0,0)	2/5 (0,4)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	3/5 (0,6)	2/5	0/5
	VP120	42	5/6 (1,0)	2/6 (0,3)	2/6 (0,3)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)	1/6 (0,2)	1/6 (0,2)	0/6 (0,0)	0/6 (0,0)	2/6	0,5
3	PCV2	21	2/5 (0,4)	4/5 (1,2)	3/5 (1,0)	5/5 (1,2)	1/5 (0,2)	4/5 (1,0)	4/5 (1,0)	3/5 (1,2)	3/5 (1,2)	3/5	3/5
	VP0	42	5/5 (1,4)	5/5 (1,4)	3/5 (0,8)	0/5 (0,0)	1/5 (0,2)	4/5 (1,0)	3/5 (0,6)	3/6 (0,6)	3/6 (0,6)	1/5	2/5

^aDPI, días después de la inoculación

^b Los valores entre paréntesis son las puntuaciones histológicas medias para la neumonía intersticial y para la hepatitis intersticial y la depleción linfóide (DL) y el reemplazo histiocítico (RH) de los ganglios linfáticos, las amígdalas y el bazo.

^cIndica la diferencia (p <0,05) mediante la prueba exacta de Fisher entre los Grupos 1, 2 y 3 en la gravedad de la respectiva lesión histopatológica con el símbolo † 21 DPI y el símbolo en las necropsias 42 DPI.

Tabla 15. Detección inmunohistoquímica del antígeno de PCV2 en los ganglios linfáticos, las amígdalas y el bazo de los cerdos inoculados y control

Grupo	Inóculos	DPI ^a	Nº de cerdos positivos/nº analizado ^o		
			Ganglio linfático ^{†b}	Amígdalas [†]	Bazo
1	Control	21	0/5 (0,0) ^c	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)
		42	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)
2	PCV2 VP120	21	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	1/5 (0,2)
		42	2/6 (0,3)	3/6 (0,5)	0/6 (0,0)
3	PCV2 VP1	21	5/5 (1,6)	4/5 (1,0)	4/5 (1,2)
		42	3/5 (0,8)	2/5 (0,4)	2/5 (0,4)

^aDPI, días después de la inoculación

^bIndica LA diferencia ($p < 0,05$) mediante la prueba exacta de Fisher entre los Grupos 1, 2 y 3 de la presencia de antígeno de PCV2 en los respectivos tejidos con el símbolo † 21 DPI.

^cValor entre paréntesis son las puntuaciones medias de las cantidades del antígeno de PCV2 en los tejidos linfoides (que varían de 0, sin antígeno detectado, a 3, altos niveles de antígeno).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico quimérico del circovirus porcino (PCV1-2) que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV1 no patógeno que contiene un gen de la cápside del marco de lectura abierto inmunogénico ORF2 de un PCV2 patógeno en el lugar de la misma posición del gen de ORF en la molécula de ácido nucleico de PCV1, en la que el gen de ORF2 del PCV2 inmunogénico comprende una guanina en la posición del nucleótido 328 (mutación de C a G) y una citosina en la posición del nucleótido 573 (mutación A a C).
2. La molécula de ácido nucleico quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** las mutaciones se producen en la molécula de ácido nucleico quimérico que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC N° 2 o su cadena complementaria.
- 10 3. Un plásmido o vector viral **caracterizado porque** contiene la molécula de ácido nucleico quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. Una célula huésped adecuada transfectada por el vector de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Un circovirus porcino quimérico producido a partir de la molécula de ácido nucleico quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 15 6. Un circovirus porcino quimérico producido por las células huésped de acuerdo con la reivindicación 4.
7. Un procedimiento de producción de un producto polipeptídico inmunogénico, estando dicho procedimiento **caracterizado** por cultivar, en condiciones de nutrientes adecuados, células huésped procariontas o eucariotas transfectadas con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 de una manera que permita la expresión de dicho producto polipeptídico y el aislamiento del producto polipeptídico deseado de la expresión de dicha molécula de ácido nucleico.
- 20 8. Un producto polipeptídico inmunogénico de la expresión de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Un polipéptido inmunogénico que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 4 o una variante biológicamente activa del mismo, que comprende las mutaciones P110A y R191S en la secuencia de aminoácidos.
- 25 10. Una vacuna viral que protege a un cerdo contra la infección viral o el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS) causado por PCV2 **caracterizado porque** comprende un vehículo no tóxico, fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica de la molécula de ácido nucleico quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 30 11. Una vacuna viral que protege a un cerdo contra la infección viral o el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS) causado por PCV2 **caracterizado porque** comprende un vehículo no tóxico, fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica del circovirus porcino quimérico de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6.
- 35 12. La vacuna viral de acuerdo con reivindicación 11, en la que la vacuna es una vacuna viva, una vacuna viva modificada, una vacuna inactivada, una vacuna de subunidad, una vacuna atenuada o una vacuna modificada por ingeniería genética.
- 40 13. Una vacuna viral que protege a un cerdo contra la infección viral o el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS) causado por PCV2 **caracterizado porque** comprende un vehículo no tóxico, fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9.
14. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para su uso en un procedimiento de protección de un cerdo contra la infección viral o el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS) causado por PCV2.
- 45 15. La vacuna para su uso en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el procedimiento comprende la administración parenteral, intranasal, intradérmica o transdérmica de la vacuna al cerdo.
16. La vacuna para su uso en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el procedimiento comprende la administración intralinfoide o intramuscular de la vacuna al cerdo.
17. Una molécula de ácido nucleico aislada de un gen de la cápside de ORF2 inmunogénico de PCV2 que tiene una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N° 3 o su cadena complementaria, que comprende una mutación C a G en la posición del nucleótido 328 y una mutación A a C en la posición del nucleótido 573.

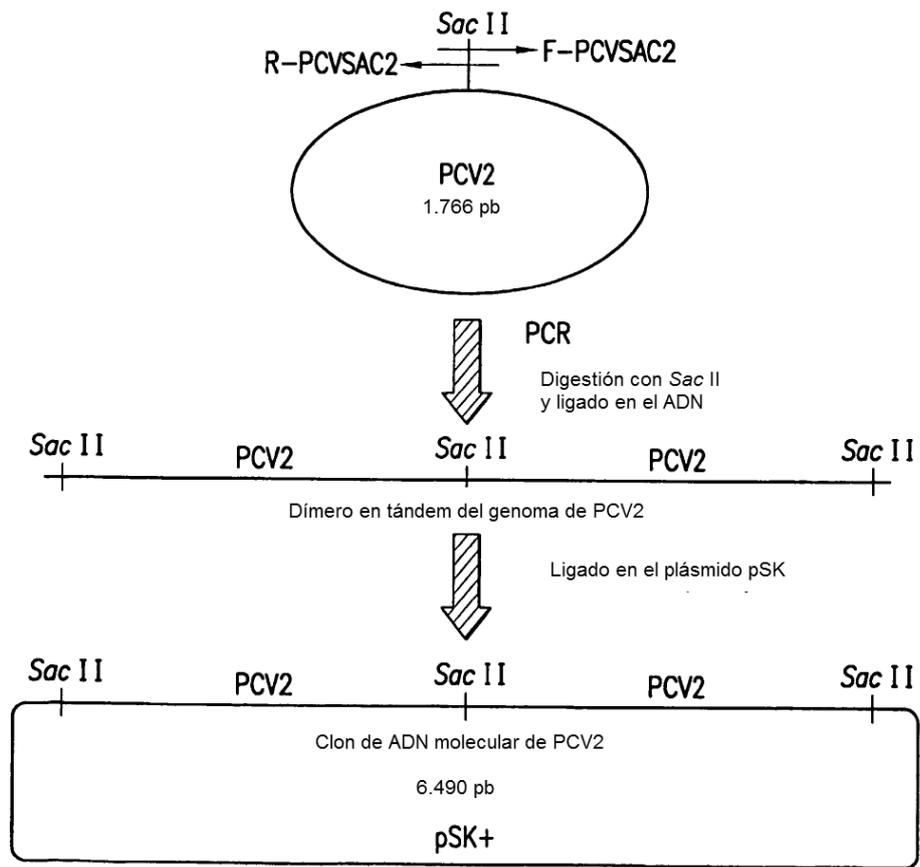


FIG. 1

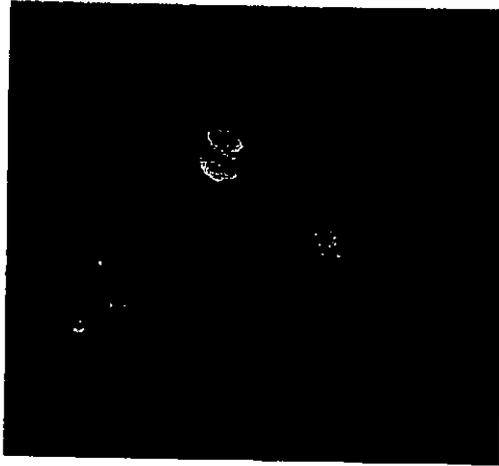


FIG.2A



FIG.2B



FIG. 3A



FIG. 3B

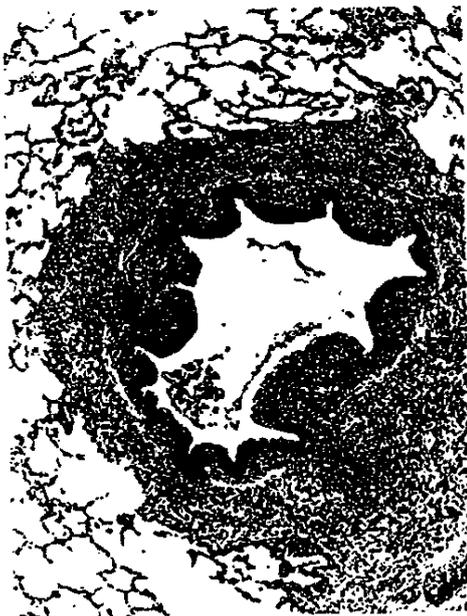


FIG. 3C



FIG. 3D

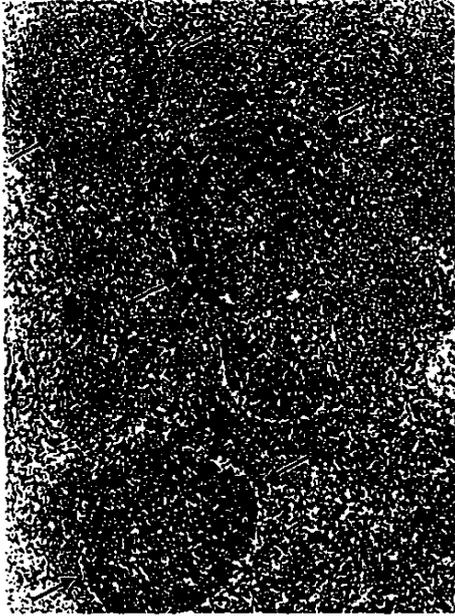


FIG. 4A

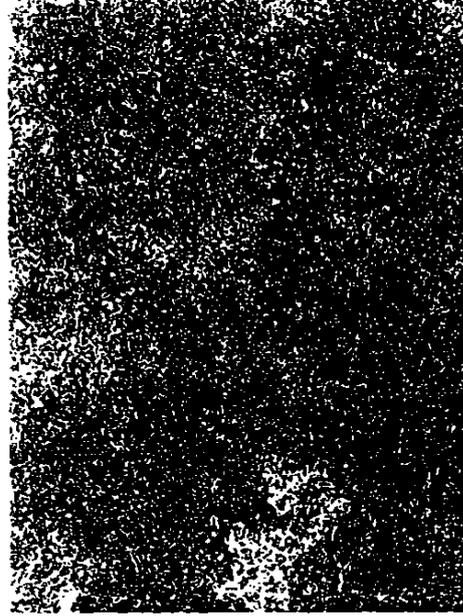


FIG. 4B

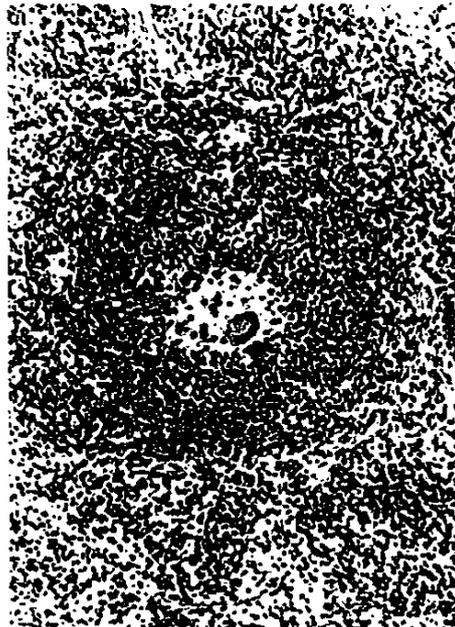


FIG. 4C

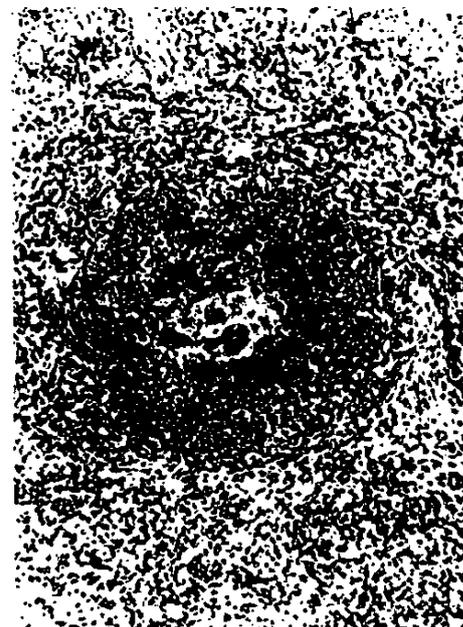


FIG. 4D

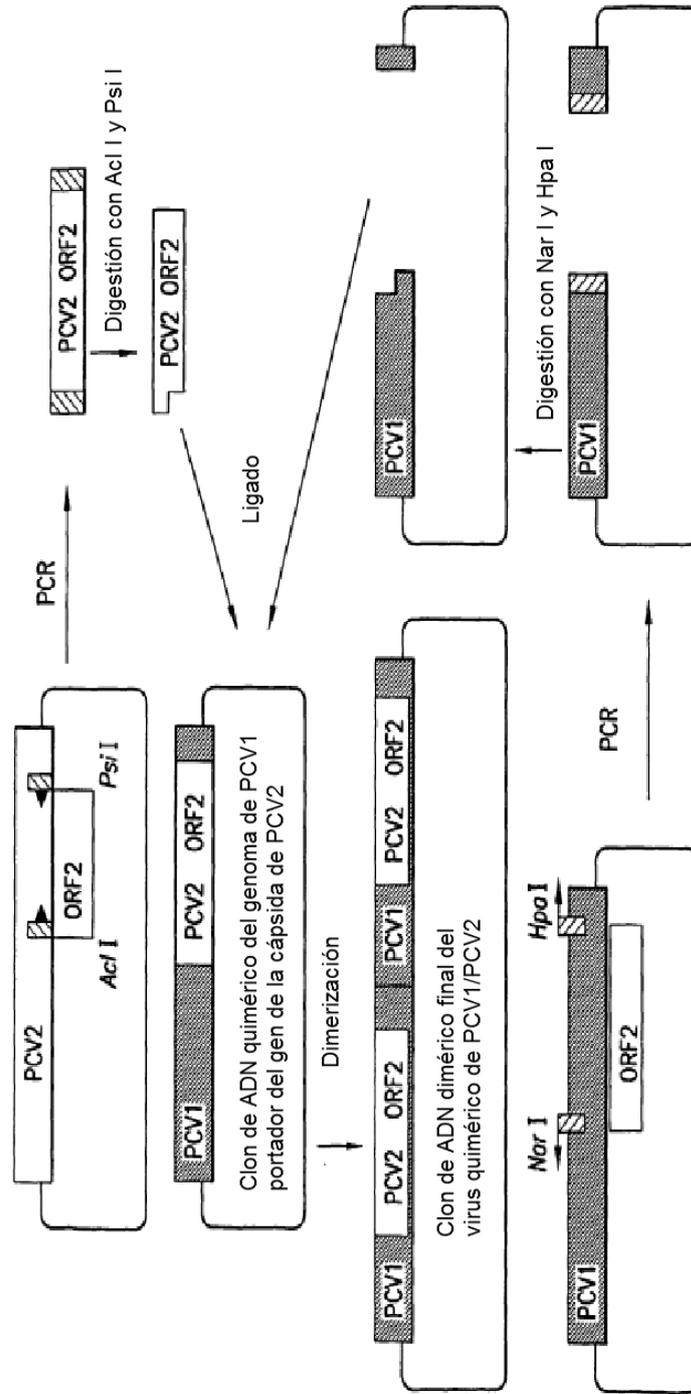


FIG.5

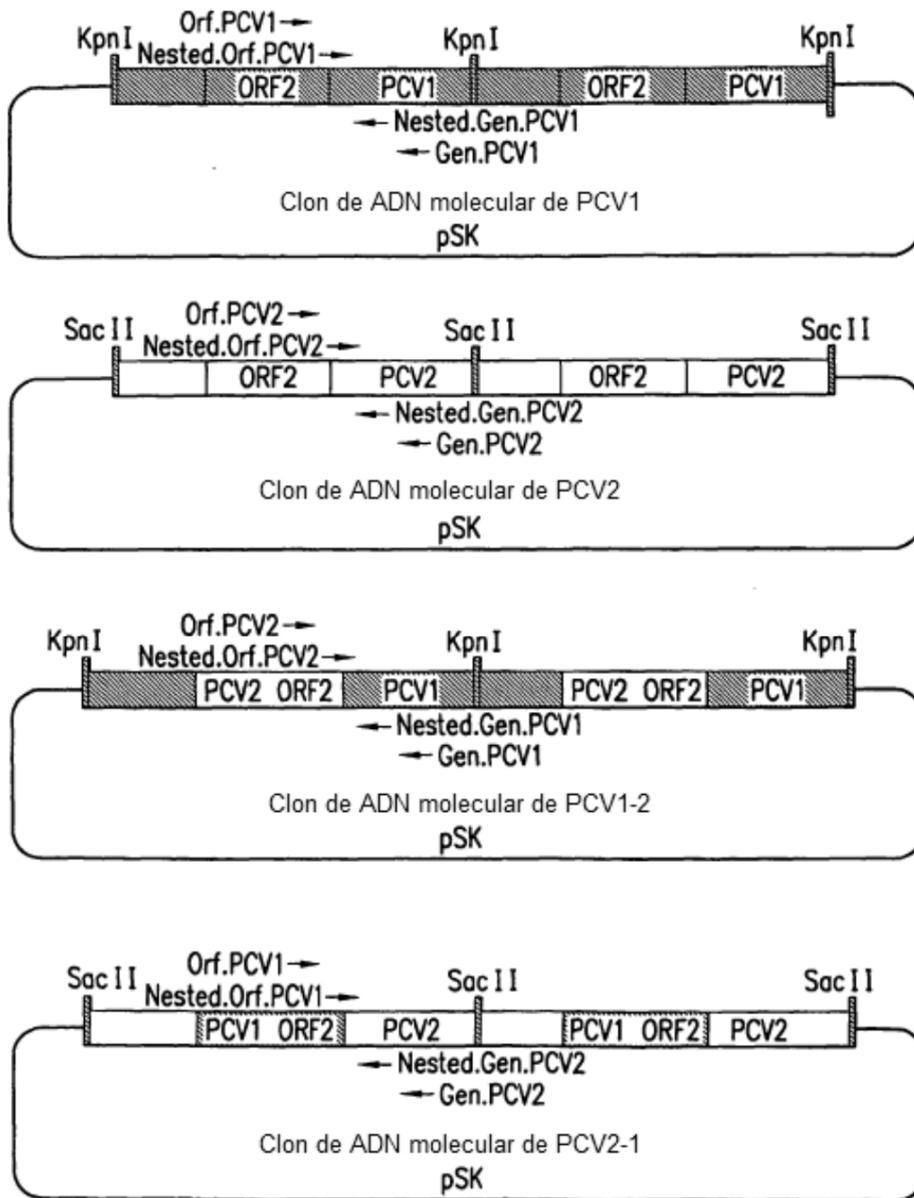


FIG.6

IFA CON
ANTI-PCV1 ORF2



FIG.7A

IFA CON
ANTI-PCV2



FIG.7B

IFA CON
ANTI-PCV1 ORF2



FIG.7C

IFA CON
ANTI-PCV2

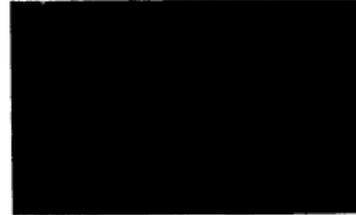


FIG.7D

IFA CON
ANTI-PCV1 ORF2

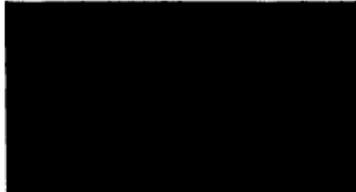


FIG.7E

IFA CON
ANTI-PCV2



FIG.7F

IFA CON
ANTI-PCV1 ORF2



FIG.7G

IFA CON
ANTI-PCV2



FIG.7H

IFA CON
ANTI-PCV1 ORF2



FIG.7I

IFA CON
ANTI-PCV2



FIG.7J

AAATTTCTGACAAACGTTACAGGGTGCTGCTCTGCAACGGTCACCAGACTCCCGCTCTCC
 AACAAAGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTCACTCCGTTGTCTTGAGATCGAGGAGCTCCA
 CATTCAATAAGTAAGTTGCCTTCTTACTGCAATATTCTTTATTCTGCTGATCAGTTCTT
 TTGGCTTTCTCGATATGGCAGCGGGCACCCAAATACCACTTCACTTTATTAAGTTTGC
 TTCTTCACAAAATTAGCGAACCCCTGGAGGTGAGGTGTTTCGTCCTTCTCATTACCCTCC
 TCGCCAACAATAAAATAATCAAATAGGGAGATTGGGAGCTCCCGTATTTTCTTGCCTCG
 TCTTCGGAAGGATTATTCAGCGTGAACACCCACCTTTTATGTGGTTGGGGTCCGCTTCTT
 CCATTCTTCTTGTGGGCATGTTGCTGCTGAGGTGCTGCCGAGGTGCTGCCGCTGCCGAA
 GTGCGCTGGTAATACTTACAGCGCACTTCTTTCGTTTTTCAGCTATGACGTATCCAAGGAG
 GCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCGCAGCCATCTTGCCAGATCCTCCGCCCGCG
 CCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAA
 CACCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGCTACCACAGTCAGAACGCCCTC
 CTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTTGTTCCCCGGGAGGGGGGAC
 CAACAAAATCTCTATACCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATTCTG
 GCCCTGCTCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGA
 TGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCATATGTAACACTCTCTC
 CCGCCATACAATCCCCAACCCCTTCTCCTACCCTCCCGTTACTTCACACCCAAACCTGT
 TCTTGACTCCACCATTGATTACTTCCAACCAAATAACAAAAGGAATCAGCTTTGGATGAG
 GCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGCACTGCGTTCGAAAAAGTAT
 ATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCT
 TAAAGACCCCCACTTAAACCCTAAATGAATAATAAAAACCATTACGAAGTGATAAAAAA
 GACTCAGTAATTTATTTTATATGGAATTCAGGGCATGGGGGGAAAGGGTGACGAACTG
 GCCCCTTCTCCTCGTGGATTGTTCTGTAGCATTCTTCCAAAATACCAAGAAAGTAATCCT
 CCGATAGAGAGCTTCTACAGCTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCATTCCAACGGGGTCTG
 ATTGCTGGTAATCAGAATACTGCGGGCCAAAAAGGTACAGTTCCACCTTTAGTCTCTAC
 AGTCAATGGATATCGATCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCACGGCAGCCAGCCATAAAA
 GTCATCAATAACAACCACTTCTTCCACATGGTAACCATCCCACCACTTGTCTTAGGTGG
 TTTCCAGTATGTGGTTTCCGGGTCTGCAAAATTAGCAGCCATTTGCTTTTACCACACCC
 AGGTGGCCCCACAATGACGTGTACATTGGTCTTCCAATCACGCTTCTGCATTTTCCCGCT
 CACTTTCAAAAGTTCAGCCAGCCCGCGG

FIG.8

GGTACCTCCGTGGATTGTTCTCCAGCAGTCTTCCAAAATTGCAAAGTAGTAATCCTCCGA
 TAGAGAGCTTCTACAGCTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCATTCTGGGGGGCCTGATTG
 CTGGTAATCAAAATACTGCGGGCCAAAAAGGAACAGTACCCCTTTAGTCTCTACAGTC
 AATGGATACCGGTCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCAAGGTAACCAGCCATAAAAATCA
 TCCAAAACAACAACTTCTTCTCCATGATATCCATCCCACCACTTATTTCTACTAGGCTTC
 CAGTAGGTGCCCTAGGCTCAGCAAATTACGGGGCCCACTGGCTCTTCCACAACCGGGC
 GGGCCCACTATGACGTGTACAGCTGTCTTCCAATCACGCTGCTGCATCTTCCCGCTCACT
 TTCAAAGTTCAGCCAGCCCGCGGAAATTTCTCACATACGTTACAGGAACTGCTCGGCT
 ACAGTCACCAAAGACCCCGTCTCCAAAAGGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTGCGTGCGC
 TTCCCCTGGTTCGCGGAGCTCCACACTCGATAAGTATGTGGCCTTCTTTACTGCAGTAT
 TCTTTATTCTGCTGGTCGGTTCCTTTGCTTTCTCGATGTGGCAGCGGGCACAAAATAC
 CACTTCACCTTGTTAAAAGTCTGCTTCTTAGCAAAATTCGCAAACCCCTGGAGGTGAGGA
 GTTCTACCCTTTCAAACCTTCTCGCCACAAACAAAATAATCAAAAAGGGAGATTGGA
 AGCTCCCGTATTTTGTITTTCTCCTCCTCGGAAGGATTATTAAGGGTGAACACCCACCTC
 TTATGGGGTTGCGGGCCGCTTTTCTTGCTTGGCATTTCCTACTGACGCTGCCGAGGTGCTG
 CCGCTGCCGAAGTGCCTGGTAATACTACAGCAGCGCACTTCTTTCACTTTTATAGGATG
 ACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGCCAG
 ATCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAA
 AATGGCATCTTCAACACCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGCTACCACA
 GTCAGAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTTGTTCCC
 CCGGGAGGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTT
 AAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCCACT
 GCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCATAT
 GTAACTACTCCTCCCGCCATACAATCCCCAACCCTTCTCCTACCACTCCCGTACTTC
 ACACCCAAACCTGTTCTTGACTCCACCATTGATTACTTCCAACCAATAACAAAAGGAAT
 CAGCTTTGGATGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGCACTGCG
 TTCGAAAACAGTATATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTC
 AGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCCACTTAAACCCTAAATGAATAAAAATAAAAACCAT
 TACGATGTGATAACAAAAAAGACTCAGTAATTTATTTTATATGGGAAAAGGGCACAGGGT
 GGGTCCACTGCTTCAAATCGGCCTTCGGGTACC

FIG.9

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCGCAGCCATCTTGGC
CAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGG
AAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGGCTACC
ACAGTCAGAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTTGTT
CCCCGGGAGGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAG
GTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCATCACCCAGGGTGATAGGGGAGTGGGCTCC
ACTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCA
TATGTAAACTACTCCTCCCGCCATAACAATCCCCAACCCCTTCTCCTACCACTCCCGTTAC
TTCACACCCAAACCTGTTCTTGACTCCACCATTGATTACTTCCAACCAAATAACAAAAGG
AATCAGCTTTGGATGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGCACT
GCGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAA
TTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAAACCCTAA

FIG. 10

MTYPRRRYRRRRHRPRSHLQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTFGYTVKAT
TVRTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS
TAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFYSYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKR
NQLWMRLQTSRNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLKP*

*codón de terminación de la traducción

FIG. 11

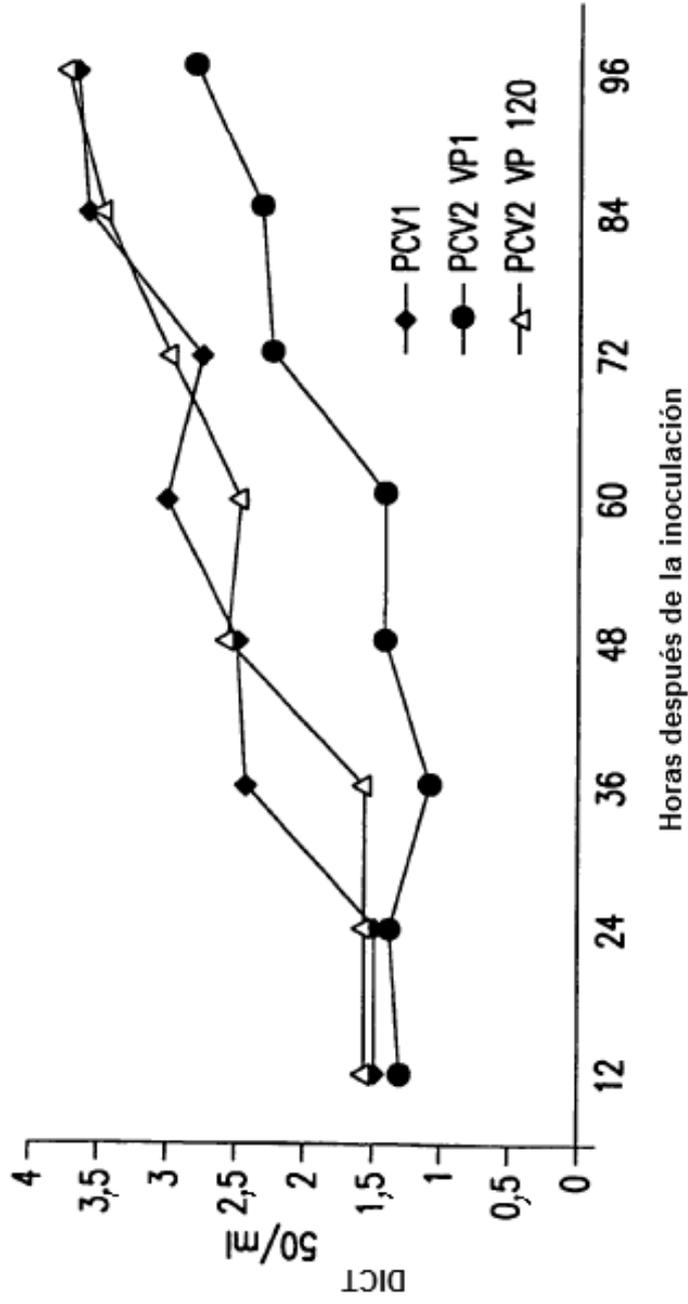


FIG.12

110	191	
P	R	VP 0
A	R	VP 30
A	R	VP 60
A	R	VP 90
A	S	VP 120
<hr/>		
P	R	PCV2: EE.UU. y Canadá
P	G/A	PCV2: Canadá, Francia, España, Alemania y Taiwán
P	T	PCV1

FIG.13

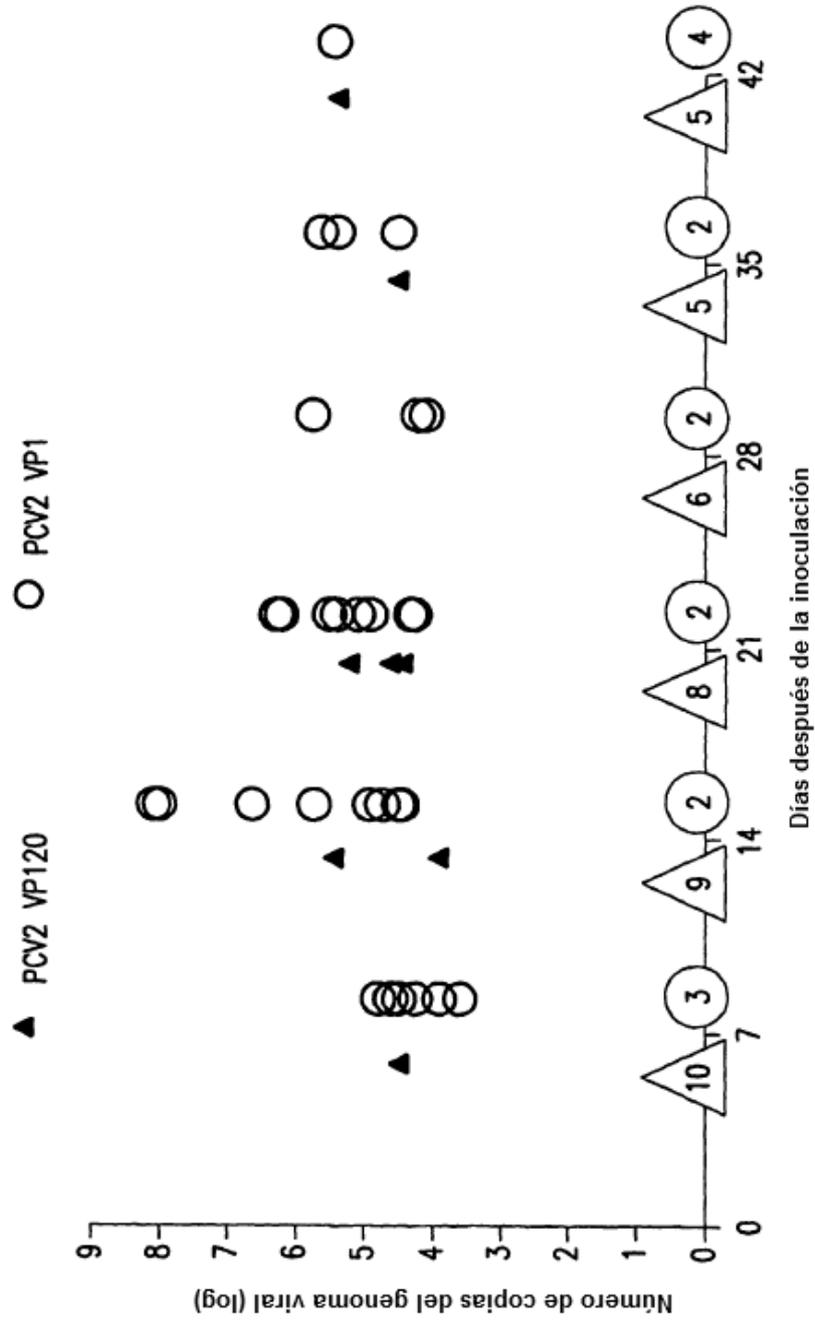


FIG.14