

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 327**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2011 PCT/CN2011/084277**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12083837**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11851859 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2657333**

54 Título: **Circovirus porcino tipo 2, composición inmunitaria que contiene el mismo, kit de ensayo, y uso del mismo**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061426087 P

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

28.05.2020

73 Titular/es:

**VIRBAC H.K. TRADING LIMITED (100.0%)
 11/F, One Pacific Place, 88 Queensway
 Hong-Kong, CN**

72 Inventor/es:

**KUO, TSUN-YUNG;
 CHEN, HSU CHUNG GABRIEL;
 WU, CHUNG-CHIN y
 CHEN, HAN-TING**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 763 327 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

Circovirus porcino tipo 2, composición inmunitaria que contiene el mismo, kit de ensayo, y uso del mismo

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo del cuidado de la salud de animales, particularmente a una nueva cepa del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), una composición inmunogénica que contiene la cepa del virus, kit de prueba de PCV2, y aplicación de la cepa del virus.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El circovirus porcino (PCV, por sus siglas en inglés) fue descubierto por primera vez en una línea celular de riñón de cerdo (PK-15, ATCC CCL33). Aunque el circovirus porcino puede contaminar de manera continua las células PK-15, el virus no causa efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés) en las células PK-15 contaminadas. Además, el PCV derivado de PK-15 se considera apatógeno. A pesar de que el circovirus porcino puede infectar a los cerdos, no causa lesiones en los cerdos infectados. El circovirus porcino es un virus de ADN monocatenario en forma de icosaedro con un genoma circular de 1.759 pares de bases (pb). El PCV derivado de PK-15 se clasificó en la familia *Circoviridae* en 1995.

20

[0003] En 1991, el síndrome del desmedro multisistémico postdestete (PMWS, por sus siglas en inglés) se registró por primera vez en cerdos en Canadá. El PMWS afecta a lechones de 5 a 12 semanas de edad. Se caracteriza clínicamente por síntomas tales como pérdida progresiva de peso, disnea, palidez e ictericia ocasional. Sus lesiones microscópicas características incluyen depleción linfóide con infiltrados histiocíticos dentro de los órganos linfoides, neumonía, inflamación granulomatosa, hepatitis y nefritis. Desde el brote de 1991 en Canadá, el PMWS ha sido notificado en muchos países de Norteamérica, Europa y Asia. Más tarde, se aisló un nuevo circovirus en cerdos con PMWS. Mientras que la morfología del circovirus porcino derivado del PMWS es muy similar a la del PCV derivado de PK-15, los dos circovirus porcinos comparten sólo un 68 a 76 % de homología en sus secuencias genómicas. El PCV apatógeno derivado de PK-15 y el PCV patógeno derivado de PMWS fueron identificados como circovirus porcino tipo 1 (PCV1) y circovirus porcino tipo 2 (PCV2), respectivamente.

30

[0004] El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) también pertenece a la familia *Circoviridae*. El PCV2 es un virus de ADN circular monocatenario en forma de icosaedros sin envoltura con un diámetro de 17 nm, conocido por ser uno de los virus animales más pequeños. El genoma circular de PCV2 contiene el origen de la replicación con una estructura de horquilla, que es una característica común de los circovirus. El genoma PCV2 comprende 1.767 o 1.768 nucleótidos y se supone que tiene 11 potenciales marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés). Entre los 11 ORF, ORF 1 y ORF 2 son probablemente los genes más importantes, que codifican las proteínas de replicación (Rep y Rep') y una proteína de la cápside (Cap), respectivamente. La proteína de la cápside (Cap) codificada por el gen ORF2 de PCV2 sería probablemente el antígeno que induce la producción de anticuerpos neutralizantes.

40

[0005] La infección por PCV2 está muy extendida en la mayoría de las explotaciones porcinas del mundo. Se ha descubierto que el PCV2 causa bajas tasas de supervivencia y bajas tasas de conversión alimenticia (FCR, por sus siglas en inglés) de los cerdos infectados y da lugar a grandes pérdidas económicas en las explotaciones porcinas. Por lo tanto, es importante desarrollar kits de prueba de PCV2 y vacunas contra PCV2.

45

[0006] DATABASE EMBL, 7 de septiembre de 2010, Li j. y col.: "Porcine Circovirus to isolate XT, complete genome" describe el genoma del circovirus porcino tipo 2.

[0007] Wenliang Li y col., "Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009; genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China; Valerious genes Vol. 40, No. 2, 31 de diciembre de 2009, páginas 244 a 251 describen un estudio que obtuvo secuencias de 31 aislados de PCV2 de diferentes granjas de 11 provincias del este de China y un análisis de la caracterización genética de 136 aislados de PCV2 derivados de la región oriental de China durante 2001 a 2009.

55 RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] El primer aspecto de la presente invención se refiere a una cepa PCV2, que fue aislada de cerdos que mostraban síntomas clínicos de síndrome del desmedro multisistémico postdestete (PMWS), analizado y confirmada como una nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H). La cadena positiva (+) del genoma de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H) tiene una secuencia de ADN de SEQ ID No: 1. La nueva cepa de PCV2 ha sido depositada ante el Centro de China para la Colección de Cultivos Tipo (CCTCC, por sus siglas en inglés) el 5 de noviembre de 2011 con el número de adhesión V201117.

60

[0009] El segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición inmunogénica que contiene la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H). En una realización preferida, la composición inmunogénica es una vacuna

65

que comprende un virus inactivado o un virus atenuado de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, los tipos de vacunas incluyen, entre otros, vacunas inactivadas, vacunas vivas (atenuadas) (mediante la atenuación del virus), vacunas de subunidades, vacunas de ADN, y otras vacunas derivadas y producidas a partir de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H) o a partir de las secuencias de ADN o de aminoácidos de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H).

[0010] El procedimiento de inactivación (o tratamiento inactivado) de la presente invención incluye, entre otros, un tratamiento con reactivos de inactivación, un tratamiento térmico, y otros tratamientos conocidos por un experto en la materia. Los reactivos de inactivación incluyen, entre otros, formaldehído, paraformaldehído, beta-propiolactona (BPL), etilneimina binaria (BEI), u otros reactivos de inactivación adecuados para la presente invención.

[0011] Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, disolventes, emulsionantes, agentes de suspensión, descomponedores, agentes aglutinantes, excipientes, agentes estabilizantes, agentes quelantes, diluyentes, agentes gelificantes, conservantes, lubricantes, tensioactivos, adyuvantes, u otros vehículos adecuados.

[0012] El adyuvante incluye, entre otros, adyuvante de aceite (como aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, etc.), adyuvante acuoso (como hidróxido de aluminio), adyuvante de emulsión bifásica (como agua en aceite en agua, a/ac/a, adyuvante de emulsión), adyuvante biológico (como oligodeoxinucleótido de CpG y toxoide), etc. El adyuvante de emulsificación bifásica está compuesto por un tensioactivo y una sustancia oleosa. El tensioactivo es uno o más de los seleccionados del grupo que consiste en éster de ácidos grasos de sorbitol; el concentrado de éster de ácidos grasos de sorbitol y óxido de etileno (u óxido de propileno); éster de ácidos grasos de manitol; el concentrado de éster de ácidos grasos de manitol y óxido de etileno (u óxido de propileno); éster de ácidos grasos de manitol modificado con un grupo hidrófilo que es uno o más de los seleccionados del grupo que consiste en ácido carboxílico, amina, amida, alcohol, poliol, éter y óxido; éster de ácidos grasos de anhidromanitol, éster de ácidos grasos de anhidromanitol modificado con un grupo hidrófilo que es uno o más de uno seleccionado del grupo que consiste en ácido carboxílico, amina, amida, alcohol, poliol, éter y óxido; éster de ácidos grasos de sacarosa; el concentrado de éster de ácidos grasos de sacarosa y óxido de etileno (u óxido de propileno); éster de ácidos grasos de glicerol; el concentrado de éster de ácidos grasos de glicerol y óxido de etileno (u óxido de propileno); el concentrado de ácidos grasos y óxido de etileno (u óxido de propileno); el concentrado de alcohol graso y óxido de etileno (u óxido de propileno); y glicerofosfolípido. La sustancia oleaginosa es una o más de una seleccionada del grupo que consiste en aceite mineral, aceite vegetal y aceite animal.

[0013] La composición inmunogénica de la presente invención comprende además al menos un antígeno patógeno. Los antígenos patógenos incluyen, entre otros, el antígeno del virus de la gripe porcina (SIV, por sus siglas en inglés), el antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés), el antígeno del micoplasma, el antígeno del parvovirus porcino (PPV, por sus siglas en inglés), el antígeno de la erisipela, y el antígeno del virus de la pseudorrabia (enfermedad de Aujeszky). Los tipos de antígenos patógenos incluyen, entre otros, proteínas recombinantes, proteínas subunitarias, patógenos con defectos genéticos, antígenos patógenos inactivados, etc.

[0014] El tercer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de protección a los cerdos de la infección por PCV2, incluyendo administrar una dosis inmunológicamente eficaz de dicha composición inmunogénica de PCV2 a un cerdo para mejorar su inmunidad contra la infección por PCV2, reducir la gravedad de la viremia y los síntomas clínicos, y aumentar la tasa de supervivencia y el peso corporal.

[0015] El cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-PCV2 derivado de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H). El anticuerpo incluye, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos genéticamente modificados. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal obtenido inyectando a un animal la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H). En otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal obtenido mediante la identificación sistemática de una biblioteca de hibridomas monoclonales.

[0016] El quinto aspecto de la presente invención se refiere a fragmentos de ADN de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H). Los fragmentos de ADN tienen secuencias de nucleótidos de SEQ ID No: 4. Las aplicaciones de los fragmentos de ADN incluyen, entre otros, la fabricación de vacunas de ADN y vacunas de subunidades, y el diseño de cebadores o sondas para detectar el virus de PCV2 en una muestra. En una realización preferida, el fragmento de ADN es el marco de lectura abierto 2 (ORF2) de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H)

que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 4, que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 5.

[0017] El sexto aspecto de la presente invención se refiere a un kit de prueba para PCV2. El kit de prueba se utiliza para detectar el virus de PCV2 o anticuerpos anti-PCV2 en una muestra de ensayo. El kit de prueba incluye, entre otros: (1) un antígeno de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H), en una realización preferida, el antígeno se deposita en una placa de antígeno y se inactiva con un reactivo de inactivación; (2) un polinucleótido que contiene SEQ ID No: 4 de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H); y (3) una proteína de la cápside que tiene una secuencia de

aminoácidos SEQ ID No: 5.

[0018] Los tipos de kit de prueba incluyen, entre otros, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), kit de microchip, kit de ensayo inmunofluorescente (IFA, por sus siglas en inglés), kit de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y otros kits de prueba derivados de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H). En una realización preferida, el kit de prueba comprende al menos una placa de antígeno que comprende la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H), y el kit de prueba puede utilizarse para detectar anticuerpos anti-PCV2 en una muestra de ensayo.

[0019] La nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H) de la presente invención incluye todos los pases subcultivados y los mutantes que tienen características de virus, genoma o patogenicidad similares a las de la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H).

[0020] Los términos "ADN (ácido nucleico)", "polinucleótido", "aminoácido", "péptido", "polipéptido" en la presente invención pueden existir en estado natural, aislado, recombinante o sintético.

[0021] Los términos "prevenir", "proteger" y "estar en contra" se refieren a la observación de que, en comparación con los animales que no están vacunados con la composición inmunogénica descrita, los animales vacunados con la composición inmunogénica descrita pueden tener una mayor capacidad para combatir la infección por PCV2, y las enfermedades relacionadas con ella son el resultado de la infección por PCV2.

[0022] El significado de los términos técnicos y científicos como se describe en esta invención puede ser entendido claramente por un experto en la materia.

[0023] La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos ilustrativos. Aunque los ejemplos pueden representar sólo realizaciones seleccionadas de la invención, debe entenderse que los siguientes ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024]

Figura 1A: Células PK-15 no infectadas, cultivadas durante 4 días (1003); Figura 1B: Células PK-15 infectadas por la cepa PCV2 H, cultivadas durante 4 días (magnitud (100x)).

Figura 2: Análisis filogenético de la secuencia del genoma de la cepa PCV2 H.

Figura 3: Alineación de la secuencia de aminoácidos de ORF2 (SEQ ID No: 5) de la cepa PCV2 H y otras tres secuencias de aminoácidos que tienen las mayores similitudes de secuencia con la secuencia de aminoácidos de ORF2 de la cepa PCV2 H en la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

Figura 4: Alineación de la secuencia de aminoácidos de ORF2 de la cepa PCV2 H y la secuencia de aminoácidos de ORF2 (número de acceso a GenBank: ADD25772) de un prototipo de PCV2 2d (número de acceso a GenBank: ZJ0955b).

Figura 5: Resultados de la prueba ELISA para PCV2 de muestras de suero tomadas en diferentes momentos de ratones vacunados con la vacuna inactivada de la cepa PCV2 H.

Figura 6: Resultados de la prueba IFA para PCV2 de muestras de suero tomadas en diferentes momentos de lechones vacunados con la vacuna inactivada de la cepa PCV2 H.

Figura 7: Pesos corporales de lechones vacunados con la vacuna inactivada de la cepa PCV2 H.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

Ejemplo 1 Aislamiento e identificación del virus PCV2

1. Origen y aislamiento del virus siembra:

[0025] Se recogieron muestras de tejido de pulmón y ganglios linfáticos de lechones en una explotación porcina en Hsin-Chu, Taiwán. Estos lechones tenían 8 semanas de edad y mostraban síntomas clínicos del síndrome del desmedro multisistémico postdestete (PWMS). Se recogieron muestras de pulmón y ganglios linfáticos y se congelaron a -70 °C.

[0026] Para aislar los virus, se homogeneizaron las muestras de tejido y se inocularon 0,2 ml de cada homogeneizado en células monocapa PK-15 o sus líneas celulares derivadas libres de circovirus porcino (PCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV, por sus siglas en inglés), adenovirus porcino, parvovirus porcino, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés), virus de la pseudorabia (PRV, por sus siglas en inglés), virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV, por sus siglas en inglés), micoplasma y bacterias. Después de incubarse durante 1 hora a 37 °C, 5 % de CO₂, las células fueron lavadas tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Acto seguido, las células fueron incubadas con un medio MEM que contenía 2 % de FBS durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de eso, el medio MEM fue desechado, y las células fueron incubadas con D-glucosamina 300 mM durante 30 minutos. Acto seguido, las células fueron lavadas tres veces con PBS estéril

e incubadas con un medio MEM que contenía 8 % de FBS durante 72 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Finalmente, los cultivos celulares fueron sometidos a ensayo para PCV2 con el ensayo de inmunofluorescencia (IFA).

[0027] El protocolo de IFA se describe a continuación. En primer lugar, las células de la muestra se lavaron tres veces con PBS estéril, 5 minutos cada vez, y se fijaron con 75 µl de 80 % de acetona durante 30 minutos a 4 °C. Luego, se descartó la acetona y se lavaron las células tres veces con PBS estéril, 5 minutos cada vez. A continuación, las células se incubaron con 75 µl de antisuero policlonal antiviral de circovirus porcino (VMRD®) (anticuerpo primario, dilución 1:1500 en PBS) durante 30 minutos a 37 °C. Luego, el antisuero fue desechado, y las células fueron lavadas tres veces con PBS estéril, 5 minutos cada vez. A continuación, las células se incubaron con 75 µl de IgG anti-cerdo de conejo-FITC (molécula entera) (Sigma, F1638) (anticuerpo secundario, dilución 1:1000 en PBS) durante 30 minutos a 37 °C. Luego, el anticuerpo fue desechado, y las células fueron lavadas tres veces con PBS estéril, 5 minutos cada vez. Finalmente, cada una de las muestras de células en una placa de cultivo de 96 pocillos se montó en 200 µl de PBS para su examen microscópico fluorescente.

[0028] El virus que infectó las células y produjo el resultado más positivo de IFA fue seleccionado como virus de siembra. A continuación se determinó la secuencia del genoma del virus de siembra, como se expone en SEQ ID No: 1. La secuencia fue alineada, analizada y finalmente confirmada como una nueva cepa de PCV2 (los análisis y resultados de la alineación de la secuencia se describen a continuación). Esta nueva cepa de PCV2 se llama cepa PCV2 H.

20

2. Subcultivo del virus de siembra:

[0029] Las células PK-15 recién preparadas o sus líneas celulares derivadas fueron inoculadas con la nueva cepa de PCV2 (cepa PCV2 H), y el virus recogido de las células inoculadas fue el pase 1 (P₁) de la cepa PCV2 H. El sobrenadante del cultivo celular, que contiene P₁ de la cepa PCV2 H, fue recogido, diluido (1:2) e inoculado en células PK-15 recién preparadas o en sus líneas celulares derivadas. Después de haber incubado las células inoculadas durante 3 días, se recogió el sobrenadante del cultivo celular, que contiene el pase 2 (P₂) de la cepa PCV2 H, se diluyó (1:2) y se inoculó en células PK-15 recién preparadas o en sus líneas celulares derivadas. Las células inoculadas fueron incubadas durante 3 días; y el sobrenadante del cultivo celular, que contiene el pase 3 (P₃) de la cepa PCV2 H, fue recogido a continuación. El procedimiento se repitió tres veces más para obtener el pase 6 (P₆) de la cepa PCV2 H.

[0030] Durante el procedimiento de cultivo de las células PK-15 o sus líneas celulares derivadas que fueron inoculadas con la cepa PCV2 H, se observó un efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés) en las células inoculadas, como se muestra en la Fig. 1B. Además, la FIG. 1A muestra la morfología y el crecimiento de las células PK-15 no inoculadas después de 4 días de cultivo (100x), mientras que la FIG. 1B muestra la morfología y el crecimiento de las células PK-15 inoculadas con la cepa PCV2 H después de 4 días de cultivo (100x). De manera similar, el CPE observado en las líneas celulares derivadas de PK-15 que están inoculadas con cepa PCV2 H puede ser consultado en la FIG. 1B como referencia.

40

3. Identificación del virus de siembra:

[0031] El genoma de la cepa PCV2 H aislada en la presente invención tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 1. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 1 se comparó con secuencias de la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Los resultados de la comparación muestran que la cepa PCV2 H era 99 % homóloga a algunas secuencias de PCV2 (Tabla 1), pero no hay ninguna secuencia en la base de datos idéntica (100 % homóloga) a la secuencia del genoma de la cepa PCV2 H (SEQ ID No: 1). Así, en base a los resultados de la alineación, el virus aislado en la presente invención, cepa PCV2 H, se demuestra que pertenece a la familia PCV2 y de una nueva cepa. Basándose en el análisis filogenético de la secuencia del genoma de la cepa PCV2 H mostrada en la FIG. 2, la cepa PCV2 H se muestra como miembro del subgrupo de PCV2 2d.

Tabla 1 Resultados de la comparación del ADN genómico de la cepa PCV2 H y secuencias en la base de datos GenBank del NCBI mediante el uso de BLAST del NCBI

N.º de acceso	Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Ident. máxima
HM038017.1	Cepa de circovirus porcino tipo 2 BDH	3236	3236	99 %
GU001710.1	Aislado de circovirus porcino tipo 2 BJ0901b	3236	3236	99 %
EF675230.1	Cepa de circovirus porcino tipo 2 GXHZ-1	3236	3236	99 %

(continuación)

N.º de acceso	Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Ident. máxima
<u>GU083583.1</u>	Aislado de circovirus porcino tipo 2 PCV2C53	<u>3230</u>	3230	99 %
<u>GQ359002.1</u>	Cepa de circovirus porcino tipo 2 GX0839	<u>3230</u>	3230	99 %
<u>FJ644929.1</u>	Aislado de circovirus porcino tipo 2 GL08	<u>3230</u>	3230	99 %
<u>FJ426398.1</u>	Cepa de circovirus porcino tipo 2 GXWZ-1	<u>3230</u>	3230	99 %
<u>HM038030.1</u>	Cepa de circovirus porcino tipo 2 AH	<u>3229</u>	3229	99 %
<u>HM161710.1</u>	Aislado de circovirus porcino tipo 2 BX-2	<u>3225</u>	3225	99 %

- [0032]** Un análisis muestra que la cepa PCV2 H de la presente invención tiene marcos de lectura abiertos (ORFs) 1, 2 y 3. El ORF1 tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 2, que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 3. El ORF2 tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 4, que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 5. El ORF3 tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 6, que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 7.
- 10 **[0033]** Debido a que la proteína de la cápside codificada por el gen ORF2 de PCV2 sería probablemente el antígeno que induce la producción de anticuerpos neutralizantes, la secuencia de nucleótidos (SEQ ID No: 4) y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 5) del ORF2 de la cepa PCV2 H se compararon con secuencias de la base de datos GenBank del NCBI. Los resultados de la comparación muestran que ninguna secuencia de la base de datos GenBank del NCBI es idéntica (100 % homóloga) a la secuencia de nucleótidos (SEQ ID No: 4) o la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No: 5) de ORF2 de la cepa PCV2 H. La homología más alta entre la secuencia de aminoácidos del ORF2 de la cepa PCV2 H (SEQ ID No: 5) y secuencias en la base de datos Genbank es del 98 %. La FIG. 3 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de ORF2 de la cepa PCV2 H (SEQ ID No: 5) y las tres secuencias principales de la homología más alta, y la alineación indica que hay 6 aminoácidos de SEQ ID No: 5 diferentes de las tres primeras secuencias principales. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID No: 5) de ORF2 de la cepa PCV2 H se comparó además con la secuencia de aminoácidos (n.º de acceso a GenBank: ADD25772) de ORF2 de un prototipo de subgrupo PCV2 2d (n.º de acceso a GenBank: ZJ0955b), y el resultado, mostrado en la FIG. 4, indica que hay 7 aminoácidos diferentes entre las dos secuencias, y las dos secuencias comparten un 97 % de homología.
- 25 **[0034]** Además, las secuencias de nucleótidos (SEQ ID No: 2 y 6) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No: 3 y 7) del ORF1 y ORF3 de la cepa PCV2 H se compararon con secuencias de la base de datos GenBank del NCBI. Los resultados de la comparación muestran que ninguna secuencia de la base de datos GenBank del NCBI es idéntica (100 % homóloga) a la secuencia de nucleótidos o a las secuencias de aminoácidos del ORF1 u ORF3 de la cepa PCV2 H.
- 30 **[0035]** Los análisis indican que la cepa PCV2 H de la presente invención es una cepa nueva de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2). La nueva cepa de PCV2 ha sido depositada ante el Centro de China para la Colección de Cultivos Tipo (CCTCC, por sus siglas en inglés) el 5 de noviembre de 2011 con el número de adhesión V201117.

35 Ejemplo 2 Preparación de la vacuna contra la cepa PCV2 H

1. Cultivo del virus

- [0036]** Las células PK-15 libres de circovirus porcino (PCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), adenovirus porcino, parvovirus

porcino, virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV), virus de la pseudorrabia (PRV), virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV), micoplasma y bacterias se cultivaron en medio de crecimiento para cultivo celular (medio MEM que contenía 5 % de FBS, pH 7,2 ± 0,2) a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de que se formara una monocapa de células PK-15, las células PK-15 se disociaron con 0,2 % de tripsina-EDTA y se suspendieron en el medio de mantenimiento de cultivo celular (medio MEM que contenía 2 % de FBS, pH 7,4 ± 0,2) para el recuento

celular. A continuación, las células se diluyeron con medio de crecimiento para cultivo celular hasta una concentración final de $3,0 \times 10^5$ células/ml, y se asignaron a frascos rotativos para su cultivo durante 3-4 días a 37 °C para alcanzar una monocapa confluyente. Después de eso, el medio de cultivo celular dentro de las botellas rotativas fue desechado y las células fueron lavadas con PBS. La solución madre del virus de la cepa PCV2 H se diluyó con medio de mantenimiento de cultivo celular hasta una concentración final de $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml y se inoculó en las monocapas de las células PK-15 de las botellas rotativas. Para el cultivo del virus, las células infectadas se incubaron durante 48-96 horas a 37 °C. El título del virus de la cepa PCV2 H fue controlado mediante un ensayo de inmunofluorescencia (IFA). Luego, con el fin de recoger la solución del virus de la cepa PCV2 H, el sobrenadante de los cultivos celulares se recolectó cuando el título del virus alcanzó $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml o superior, o cuando el efecto citopático (CPE) alcanzó un 70-80 %.

2. Procedimiento inactivado

[0037] Se añadió un treinta y siete por ciento (37 %, en peso) de formaldehído a la solución vírica de la cepa PCV2 H recogida en la etapa mencionada anteriormente hasta alcanzar una concentración final del 0,2 % (p/v) y, a continuación, se inactivó el virus agitando de manera continua con formaldehído durante al menos 24 horas, preferentemente 48 horas, a 37 °C. Después de la inactivación completa del virus, se centrifugó la solución de virus de la cepa PCV2 H que contenía formaldehído para eliminar el formaldehído. Luego, la solución de virus centrifugada se suspendió en una solución tampón, como agua destilada o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y la solución de virus suspendida fue la solución madre de antígenos inactivados de la vacuna inactivada de la cepa de PCV2 H y se almacenó a 4 °C para su uso posterior.

3. Preparación de la vacuna inactivada de la cepa PCV2 H

[0038] Se agregó un adyuvante de emulsificación bifásica esterilizado, como MONTANIDE™ ISA 206, adyuvante de vacuna oleosa para emulsión de agua en aceite en agua (A/AC/A), a la solución madre de antígenos inactivados de la vacuna inactivada de la cepa PCV2 H hasta una concentración final del 50 % (v/v) en un tanque de emulsión para mezcla y emulsificación. El producto emulsionado es la vacuna inactivada de la cepa PCV2 H con adyuvante oleoso.

[0039] Otros adyuvantes adecuados para la vacuna inactivada de PCV2 de la presente invención conocida por los expertos en la materia también pueden ser utilizados como el adyuvante en la presente invención. El adyuvante de emulsificación bifásica (como el adyuvante de emulsión agua en aceite en agua) utilizado en este ejemplo puede ser reemplazado con, pero no limitado a, adyuvante de aceite (como el aceite mineral, el aceite vegetal, el aceite animal, el adyuvante completo de Freund, el adyuvante incompleto de Freund, etc.), el adyuvante acuoso (como el hidróxido de aluminio), o el adyuvante biológico (como el oligodoxinucleótido CpG y el toxoide).

Ejemplo 3 Preparación del kit de pruebas de PCV2 - 1

[0040] El kit de prueba de PCV2 en este ejemplo es una placa de antígeno que contiene el antígeno viral de la cepa PCV2 H. Primero, las células PK-15 o sus líneas celulares monoclonales fueron cultivadas, tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo celular a una concentración final de 2×10^5 células/ml. Se añadieron cincuenta microlitros (ml) de las células PK-15 y 50 µl de solución madre del virus de la cepa PCV2 H (1×10^3 TCID₅₀/ml) a cada pocillo de una placa de cultivo celular de 96 pocillos (fondo plano) y se incubaron durante 72 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Las células infectadas por la cepa PCV2 H se lavaron dos veces con PBS esterilizado y se fijaron con acetona al 80 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se descartó la acetona y se lavaron las células tres veces con PBS esterilizado. Después de eso, la placa fue invertida y luego secada en una incubadora a 37 °C. La placa seca es la placa del antígeno que contiene el antígeno viral de la cepa PCV2 H, y puede utilizarse para la prueba de ELISA para detectar la cantidad de anticuerpos contra PCV2 en una muestra de suero. La placa se almacenó a -20 °C para su posterior uso. (Tischer y col., 1995)

Ejemplo 4 Preparación del kit de pruebas de PCV2 - 2

[0041] El kit de prueba de PCV2 en este ejemplo es una placa de antígeno que contiene una proteína de la cápside recombinante de la cepa PCV2 H. La proteína de la cápside recombinante es el antígeno de la placa del antígeno. La proteína de la cápside está codificada por el gen ORF2 de la cepa PCV2 H y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 5.

[0042] La secuencia de nucleótidos ORF2 de la cepa PCV2 H fue amplificada por primera vez por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN viral de la cepa PCV2 H se utilizó como plantilla de ADN en la reacción de PCR. Se diseñaron un cebador directo e indirecto para amplificar la secuencia de nucleótidos ORF2. El cebador directo en este ejemplo tiene un sitio de escisión *HindIII*, y el cebador inverso en este ejemplo tiene un sitio de escisión *Xho* I. Los cebadores pueden ser diseñados según la secuencia de nucleótidos ORF2 (SEQ ID No: 4) de la presente invención por los expertos en la materia. Para la reacción de PCR, una mezcla de PCR que contenía 8 µl de ADN de plantilla, 5 µl de 10x de tampón PCR (MDBio, Inc.), 8 µl de dNTPs (cada uno a 1,25 mM), 1 µl de cada cebador (cada

uno a 50 µM), y 0,5 µl de ADN polimerasa Pfu (MDBio, Inc.) en un volumen final de 50 µl se colocó en un reactor PCR System 2400 de GeneAmp (Applied Biosystems). La reacción de PCR comenzó con una etapa inicial de precalentamiento de la mezcla de PCR a 95 °C durante 5 minutos, y la amplificación del ADN se llevó a cabo mediante 25 ciclos con los siguientes parámetros: desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 5 30 segundos y alargamiento a 72 °C durante 30 segundos. La reacción de PCR se completó con una etapa final de extensión de 5 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron con el kit de limpieza PCR-M (Viogene).

[0043] Después de la purificación, los productos de PCR se construyeron en un vector de expresión pET24a. Los productos purificados de PCR y el vector de expresión pET24a (Novagen) fueron digeridos por dos enzimas de restricción (New England Biolabs), *Hind* III y *Xho* I, respectivamente, durante 8 horas a 37 °C. Después de la reacción de escisión por la enzima de restricción, los productos de PCR digeridos y el vector de expresión pET24a se purificaron con el kit de limpieza PCR-M (Viogene), respectivamente. Los productos de PCR purificados se ligaron con el vector de expresión pET24a purificado y el producto de ligamiento se transformó en células huésped (*E. coli*). Se seleccionaron los transformantes y se identificó un clon con la secuencia correcta mediante la secuenciación del ADN, 15 denominado pET24a-ORF2.

[0044] Las bacterias con pET24a-ORF2 se cultivaron en 2 ml de caldo LB durante 16 a 18 horas a 37 °C, y luego se añadió el cultivo a un caldo de LB reciente que contenía 25 µg/ml de kanamicina en una relación de 1:50 y se cultivaron a 37 °C, 200 rpm. Cuando la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (DO600) del cultivo 20 alcanzó 0.6, se agregó isopropil-β-D-tiogalactosida (IPTG) al cultivo a una concentración final de 1 mM, y el cultivo se incubó durante 6 horas más a 37 °C, 200 rpm. Se centrifugó un mililitro del cultivo (10.000 xg) y luego se determinó si las proteínas recombinantes eran proteínas solubles o el cuerpo de inclusión con extracción de proteínas bacteriana B-PERTM (Pierce Protein Research Produces). Cuarenta microlitros (µl) de reactivo fueron agregados a la bacteria centrifugada y agitados en un mezclador vorticial durante 1 minuto. La mezcla se centrifugó a continuación a 10.000 25 xg. Las proteínas suspendidas en el sobrenadante eran proteínas solubles, mientras que las proteínas de la parte inferior (sedimentos) eran cuerpos de inclusión. Las proteínas solubles se disolvieron en 1x tampón de muestra para el análisis SDS-PAGE, mientras que los cuerpos de inclusión se mezclaron con 2x tampón de muestra para el análisis SDS-PAGE. Ambas muestras se hirvieron durante 20 minutos y luego se centrifugaron. Las proteínas en el sobrenadante de ambas muestras se resolvieron con un 15 % de SDS-PAGE para analizar la expresión de la proteína 30 de la cápside recombinante de la cepa PCV2 H. Después de los análisis, se utilizó la proteína de la cápside recombinante de la cepa PCV2 H para fabricar placas de antígenos.

[0045] La proteína de la cápside recombinante de la cepa PCV2 H se diluyó con PBS (pH 9,6) hasta una concentración final de 10 µg/ml. La proteína recombinante diluida se cubrió en una placa de cultivo celular de 96 35 pocillos (fondo plano) (100µl/pocillo) a 37 °C durante 2 horas y luego a 4 °C durante la noche. Después de eso, cada pocillo de la placa se lavó tres veces con PBS durante 3 a 5 minutos y se agregó a 200 µl una solución de bloqueo de BSA al 0,15 % para bloquear la proteína recombinante durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar cada pocillo de la placa con PBS, la placa se almacenó a 4 °C para su posterior uso.

40 Ejemplo 5 Preparación de anticuerpos de cepa anti-PCV2 H

1. Anticuerpos policlonales de cepa anti-PCV2 H

[0046] La cepa inactivada PCV2 H con suficiente título de virus se mezcló con un adyuvante adecuado, como 45 el adyuvante completo de Freund. La mezcla se inoculó principalmente en animales, como ratones, cerdos, cabras y conejos, y se puede realizar una segunda inmunización después de un periodo de tiempo apropiado (tal como de 2 a 3 semanas), si es necesario. Después de otro periodo de tiempo apropiado (tal como de 2 a 3 semanas), el suero de los animales inoculados se recogió como anticuerpos policlonales de la cepa anti-PCV2 H.

50 **[0047]** Los anticuerpos policlonales de la cepa anti-PCV2 H pueden ser conjugados con indicadores cromogénicos o fluorescentes, si es necesario.

[0048] Los animales vacunados pueden ser vacunados para reforzar el título de anticuerpos después de la primera o segunda inmunización si es necesario. 55

[0049] Los animales que pueden ser inoculados para producir anticuerpos policlonales de la cepa anti-PCV2 H incluyen, entre otros, ratones, conejos, aves (huevos), cerdos, cabras, ganado y animales de agua.

2. Anticuerpos monoclonales de la cepa anti-PCV2 H

60 **[0050]** La cepa PCV2 H inactivada con un título suficiente de virus o un fragmento de antígeno específico (como ORF2) de la cepa PCV2 H se inoculó principalmente en un animal (tal como un ratón). El virus inactivado o fragmento de antígeno puede mezclarse con un adyuvante adecuado, tal como el adyuvante completo de Freund, si es necesario. Además, se puede realizar una segunda inmunización después de un periodo de tiempo apropiado (tal como de 2 a 3 65 semanas) si es necesario. Después de otro periodo de tiempo apropiado (tal como de 2 a 3 semanas), se recogió el

suero del animal inoculado para evaluar si las células del bazo del animal eran adecuadas para producir anticuerpos monoclonales de la cepa anti-PCV2 H. La fusión celular de las células adecuadas del bazo recogidas del animal inoculado y de las células del mieloma (tal como la línea celular FO y la línea celular NS) se realizó utilizando polietilenglicol (PEG, tal como PEG1500). Los hibridomas que producen anticuerpos de especificidad adecuada se seleccionaron a partir de células fusionadas y luego se subclonificaron como hibridomas adecuados para producir anticuerpos monoclonales de la cepa anti-PCV2 H.

[0051] Los anticuerpos monoclonales de la cepa anti-PCV2 H pueden utilizarse en kits de prueba, en terapias o en alimentos o suplementos alimenticios para mejorar la inmunidad de los animales.

10

Ejemplo 6 Ensayo de eficacia de la vacuna contra PCV2 inactivada -1

1. Protocolo de vacunación y toma de muestras

[0052] Los ratones Balb/c de cinco a seis semanas de edad libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés) se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 15 ratones cada uno. La prueba ELISA mostró que los 60 ratones fueron negativos para anticuerpos anti-PCV2. Los ratones de los 3 grupos de vacunas (Grupos 1 a 3) se les inyectó por vía intramuscular 0,2 ml de 3 lotes diferentes de vacuna de la cepa PCV2 H inactivada, respectivamente. Dos semanas después de la inmunización primaria (p.i., por sus siglas en inglés), los ratones de los 3 grupos de vacunas recibieron la misma dosis de los 3 lotes diferentes de vacunas. Los ratones del Grupo 4 no estaban vacunados y sirvieron como control negativo. A las 2, 3, 4 y 5 semanas después de la inmunización primaria (p.i.), se seleccionaron al azar 5 ratones de cada grupo para recoger muestras de suero. Todas las muestras de suero fueron sometidas a ensayo por ELISA.

2. Detección de anticuerpos anti-PCV2 por ELISA

[0053] Las placas de antígeno preparadas en el Ejemplo 3 o 4 pueden utilizarse como placas ELISA en este ejemplo. Las placas ELISA se lavaron 3 veces con 50 mmol/l de PBS (pH 7,2) que contenían 500 ml/l de Tween-20 (es decir, PBST) durante 3 a 5 minutos cada vez. Para bloquear las placas ELISA, se añadieron a cada pocillo de las placas ELISA 200 µl de una solución de bloqueo de BSA al 0,15 %, y luego se incubaron las placas de ELISA durante 2 horas a 37 °C. A continuación, las placas de ELISA se lavaron con PBS. Las muestras de suero de ratón se diluyeron cincuenta veces (1:50) con PBS y luego se diluyeron dos veces en serie. Se añadieron muestras de suero diluido a los pocillos de las placas de ELISA (100 ml/pocillo) y se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron con PBS. A continuación, se añadieron a los pocillos anticuerpos secundarios (tales como anticuerpo secundario anti-ratón de conejo) conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés). Después de incubarse durante 1 hora a 37 °C, las placas se lavaron con PBS. Para la visualización de los resultados, se agregó 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) a los pocillos. Después de la incubación, la reacción se detuvo añadiendo 2 mM H₂SO₄. Los resultados se notificaron como relaciones positivas a negativas (P/N). La relación P/N se calculó dividiendo la densidad óptica a 450 nm (DO₄₅₀) de una muestra de prueba dada por la DO₄₅₀ del control negativo convencional. Las relaciones P/N ≥ 2,1 se consideraron positivas. Las diluciones máximas de las relaciones P/N ≥ 2,1 se consideraron los títulos de anticuerpos de ELISA de las muestras de suero.

[0054] Además del HRP y el TMB, también pueden utilizarse en este ejemplo otros indicadores cromogénicos o fluorescentes con la misma función, tal como la fosfatasa alcalina (AP), el fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP) y el isotiocianato de fluoresceína (FITC).

45

3. Resultados

[0055] A las 2 semanas de la inmunización primaria (p.i.), se detectaron anticuerpos de la cepa anti-PCV2 H en todos los ratones vacunados. Después de la segunda inmunización, los títulos de anticuerpos de ELISA de los ratones vacunados alcanzaron entre 1.800 y 2.000 a los 35 días tras la inmunización primaria (d.p.i., por sus siglas en inglés). (FIG. 5). Por lo tanto, los resultados indicaron que la vacuna de la cepa PCV2 H inactivada de la presente invención fue capaz de inducir de manera eficaz respuestas inmunológicas en ratones.

Ejemplo 7 Ensayo de eficacia de la vacuna contra PCV2 inactivada -2

1. Protocolo de vacunación y toma de muestras

[0056] Dos lechones sanos de 5 a 6 semanas de edad se les inyectó por vía intramuscular 1 ml de vacuna de la cepa PCV2 H inactivada, respectivamente. Tres semanas después de la inmunización primaria (p.i.), los lechones recibieron la misma dosis de la vacuna. Se tomaron muestras de suero de ambos lechones antes de la inmunización primaria (de 5 a 6 semanas de edad), antes de la segunda inmunización (de 8 a 9 semanas de edad) y a las 2 semanas después de la segunda inmunización (de 10 a 11 semanas de edad). Ambos lechones se pesaron en los mismos puntos de tiempo de extracción de suero. Todas las muestras de suero fueron sometidas a ensayo por ELISA.

65

2. Detección de anticuerpos anti-PCV2 por ELISA

[0057] Las placas de antígeno preparadas en el Ejemplo 3 o 4 pueden utilizarse como placas ELISA en este ejemplo. Las placas ELISA se lavaron 3 veces con 50 mmol/l de PBS (pH 7,2) que contenían 500 ml/l de Tween-20 (es decir, PBST) durante 3 a 5 minutos cada vez. Para bloquear las placas ELISA, se añadieron a cada pocillo de las placas ELISA 200 µl de una solución de bloqueo de BSA al 0,15 %, y luego se incubaron las placas de ELISA durante 2 horas a 37 °C. A continuación, las placas de ELISA se lavaron con PBS. Las muestras de suero de cerdo se diluyeron cincuenta veces (1:50) con PBS y luego se diluyeron dos veces en serie. Se añadieron muestras de suero diluido a los pocillos de las placas de ELISA (100 ml/pocillo) y se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron con PBS. A continuación, se añadieron a los pocillos anticuerpos secundarios (tales como anticuerpo secundario anti-cerdo de cabra) conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés). Después de incubarse durante 1 hora a 37 °C, las placas se lavaron con PBS. Para la visualización de los resultados, se agregó 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) a los pocillos. Después de la incubación, la reacción se detuvo añadiendo 2 mM H₂SO₄. Los resultados se notificaron como relaciones positivas a negativas (P/N). La relación P/N se calculó dividiendo la densidad óptica a 450 nm (DO₄₅₀) de una muestra de prueba dada por la DO₄₅₀ del control negativo convencional. Las relaciones P/N ≥ 2,1 se consideraron positivas. Las diluciones máximas de las relaciones P/N ≥ 2,1 se consideraron los títulos de anticuerpos de ELISA de las muestras de suero.

3. Resultados

[0058] A las 3 semanas de la inmunización primaria (p.i.), se detectaron anticuerpos de la cepa anti-PCV2 H en ambos lechones vacunados. A las 2 semanas de la segunda inmunización, los títulos de anticuerpos de ELISA de los lechones vacunados eran superiores a 11.000 (Tabla 2). Por lo tanto, los resultados indicaron que la vacuna de la cepa PCV2 H inactivada de la presente invención fue incapaz de inducir de manera eficaz respuestas inmunológicas en cerdos.

Tabla 2 Títulos de anticuerpos de ELISA de lechones vacunados

Puntos de tiempo de muestreo	Antes de la inmunización primaria (de 5 a 6 semanas de edad)	Antes de la inmunización secundaria (de 8 a 9 semanas de edad)	A las 2 semanas después de la inmunización secundaria (10 a 11 semanas de edad)
Lechón 1	1	8.490	11.728
Lechón 2	1	10.263	13.065

Ejemplo 8 Ensayo de eficacia de la vacuna contra PCV2 inactivada -3

1. Protocolo de vacunación y toma de muestras

[0059] Cuarenta lechones sanos de 2 semanas de edad fueron divididos al azar en 4 grupos de 10 lechones cada uno. A la edad de 3 semanas, los lechones de los 3 grupos de vacunas (Grupos 1 a 3) se les inyectó por vía intramuscular 1 ml de 3 lotes diferentes de vacuna de la cepa PCV2 H inactivada, respectivamente. Tres semanas después de la inmunización primaria (p.i.), los lechones fueron reforzados con la misma dosis de la vacuna. Los lechones del Grupo 4 no estaban vacunados y sirvieron como control negativo. Se tomaron muestras de suero de todos los lechones 1 semana antes de la inmunización primaria (2 semanas de edad) y a las 1,2, 3 y 5 semanas después de la inmunización primaria (4, 5, 6 y 8 semanas de edad, respectivamente). Todos los lechones se pesaron a las edades de 3, 4, 5, 6 y 8 semanas. Todas las muestras de suero fueron sometidas a ensayo por ELISA.

Tabla 3 Calendario de vacunación y toma de muestras

Edades (semanas)	2	3	4	5	6	8
Vacunación	-	Vacunación Primaria	-	-	Vacunación Secundaria	-
Prueba 1	Muestreo de sangre, IFA	-	Muestreo de sangre, IFA	Muestreo de sangre, IFA	Muestreo de muestreo, IFA	Muestreo de sangre, IFA
Prueba 2	-	Pesaje	Pesaje	Pesaje	Pesaje	Pesaje

2. Detección de anticuerpos anti-PCV2 por IFA

[0060] En este ejemplo se utilizaron las placas de antígeno preparadas en el Ejemplo 3. Las placas de antígeno

se tomaron a partir de -20 °C para descongelarse y secarse a 37 °C. Las muestras de suero de cerdo se diluyeron cincuenta veces (1:50) con PBS y luego se diluyeron dos veces en serie. Se añadieron muestras de suero diluido a los pocillos de las placas de antígeno (50 µl/pocillo), y las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los anticuerpos no combinados. Cincuenta microlitros (50 µl) de IgG anti-cerdo de conejo conjugada con FITC (1:100, Sigma) se agregó a los pocillos. Después de incubarse en la oscuridad durante 30 minutos, las placas se lavaron 3 veces con PBS y se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia para calcular el título de los anticuerpos de la cepa anti-PCV2 H. (Rodríguez-Arriola y col., 2000)

10 3. Resultados

3.1 Título de anticuerpo

[0061] A las 2 semanas después de la inmunización primaria (p.i.), las muestras de suero de lechones vacunados (a la edad de 5 semanas) tenían títulos de IFA alrededor de 600, mientras que las muestras de suero del grupo de control tenían títulos de IFA alrededor de 200 (Tabla 4 y FIG. 6). Después de la segunda inmunización, los títulos de IFA en lechones vacunados (a la edad de 6 semanas) aumentaron drásticamente (los títulos de IFA son superiores a 13.000). A la edad de 8 semanas, los lechones vacunados tenían títulos de IFA superiores a 46.000, mientras que los lechones no vacunados tenían títulos de IFA muy bajos, alrededor de 170.

Tabla 4 Títulos de anticuerpos anti-PCV2 H de lechones vacunados por IFA

Edad (semana)	2	4	5	6	8
Grupo 1	800	200	600	13.440	48.640
Grupo 2	1.680	230	620	20.800	46.720
Grupo 3	1.100	220	650	18.660	49.760
Grupo 4 (Control)	1.880	210	190	300	170

3.2 Aumento de peso

[0062] Los lechones vacunados ganaron más peso que los lechones no vacunados en el grupo de control (Tabla 5 y FIG. 7). A la edad de 8 semanas, los lechones vacunados pesaban unos 2 kg más que los lechones no vacunados.

Tabla 5 Peso corporal de los lechones vacunados (kg)

Edad (semana)	3	4	5	6	8
Grupo 1	8,4461	9,9512	12,4207	16,1756	20,5284
Grupo 2	7,3781	9,064	11,7594	15,2267	20,3755
Grupo 3	7,9564	9,5413	12,3461	15,8561	20,4345
Grupo 4 (Control)	7,5906	8,9899	11,724	12,9102	18,6059

30

[0063] Por lo tanto, los resultados indicaron que la vacuna de la cepa PCV2 H inactivada de la presente invención fue capaz de inducir de manera eficaz respuestas inmunitarias en cerdos, mejorar la inmunidad en los cerdos, y luego aumentar el aumento de peso en los cerdos.

35 Ejemplo 9 Ensayo de eficacia de la vacuna contra PCV2 inactivada -4

1. Protocolo de vacunación e infección por PCV2

[0064] Los lechones de catorce a dieciséis días se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 5 lechones cada uno. Los 20 lechones fueron negativos para anticuerpos anti-PCV2. Los lechones de los 3 grupos de vacunas (Grupos 1 a 3) se les inyectó por vía intramuscular 1 ml de 3 lotes diferentes de vacuna de la cepa PCV2 H inactivada, respectivamente. Dos semanas después de la inmunización primaria (p.i.), los lechones fueron reforzados con la misma dosis de la vacuna. Los lechones del Grupo 4 no estaban vacunados y sirvieron como control negativo. A las 5 semanas de la inmunización primaria, todos los lechones fueron expuestos a la solución madre del virus de la cepa PCV2 H (cepa virulenta) a una dosis de $10^{6.5}$ 50 % de dosis infecciosas para cultivo de tejidos por ml ($10^{6.5}$ TCID₅₀/ml). Cada lechón fue expuesto intranasalmente con 1 ml de la solución madre del virus e intramuscularmente con 2 ml de la solución madre del virus. Se tomaron muestras de suero e hisopo nasales a los 7, 11, 19 y 25 días después de la exposición para detectar la viremia por PCV2 mediante PCR.

2. Detección de la viremia por PCV2 por PCR

5 **[0065]** Los niveles de ADN viral en las muestras de suero de cerdo recogidas después de la exposición a PCV2 se determinaron mediante PCR. El ADN viral se extrajo con el reactivo DNAzol®. Primero, se agregaron 400 µl de reactivo DNAzol® a 200 µl de suero, y la mezcla se centrifugó a 12.000 rpm/min durante 15 minutos. El sobrenadante se mezcló con un volumen doble de etanol absoluto para precipitar el ADN. Después de centrifugar la mezcla a 12.000 rpm/min durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante. El sedimento de ADN se lavó con un 75 % de etanol, se centrifugó a 12.000 rpm/min durante 15 minutos para eliminar el etanol y finalmente se disolvió en 8 mM NaOH.

10 **[0066]** Los cebadores de PCR utilizados para detectar la viremia por PCV2 tienen las siguientes secuencias.

PCV2-F1: 5' GTGAAGTGGTATTTTGGTGCC 3' (SEQ ID No: 8)
PCV2-R1: 5' GTCTCCAATCAGCTTCTGC 3' (SEQ ID No: 9)

15 Se utilizaron cebadores PCV2-F1 (directo) y PCV2-R1 (inverso) para amplificar un fragmento de 284 pb del ORF1 de PCV2. La mezcla de PCR con un volumen final de 25 µl contenía 1 µl de cebadores directos, 1 µl de cebadores inversos, 1,5 µl de 25 mM Mg²⁺, 2,0 µl de 2,5 mM dNTPs, 2,5 µl de 10 x Mg²⁺ libre de tampón, 0,2 µl de ADN polimerasa Taq, 11,8 µl de agua destilada y 5 µl de plantilla de ADN. La reacción de PCR comenzó con una etapa inicial de precalentamiento de la mezcla de PCR a 95 °C durante 5 minutos, y la amplificación del ADN se llevó a cabo mediante 20 38 ciclos con los siguientes parámetros: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y alargamiento a 72 °C durante 30 segundos. La reacción de PCR se completó con una etapa final de extensión de 5 minutos a 72 °C y luego se mantuvo a 4 °C. Los productos de PCR se analizaron luego en un gel de agarosa al 1 % y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

25 **[0067]** Además, otro par de cebadores PCR utilizados para detectar la viremia por PCV2 tiene las siguientes secuencias.

PCV2-F2: 5' TGTTGGCGAGGAGGTAATG '3 (SEQ ID No: 10)
PCV2-R2: 5' TGGGACAGCAGTTGAGGAGT '3 (SEQ ID No: 11)

30 Se utilizaron cebadores PCV2-F2 (directo) y PCV2-R2 (inverso) para amplificar un fragmento de 676 pb de PCV2.

3. Disección y análisis patológico

35 **[0068]** A los 25 días de la exposición, los lechones fueron sacrificados y diseccionados para observar anomalías patológicas en los órganos y recoger los ganglios linfáticos y los pulmones. Las muestras de tejido se fijaron en formaldehído al 4 %, se incrustaron en parafina, y luego se seccionaron. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) y se observaron con un microscopio.

4. Resultados

4.1 Evaluación de la viremia

45 **[0069]** Los resultados de la PCR mostraron que a los 25 días después de la exposición, la incidencia de la viremia en lechones vacunados (Grupos 1 a 3) era entre un 40 y un 60 % inferior a la de los lechones no vacunados (Grupo 4) (Tabla 6). Los resultados indicaron que la vacuna de la cepa PCV2 H inactivada de la presente invención fue capaz de inducir inmunidad en los cerdos, reducir la gravedad y duración de la viremia en los cerdos, y proteger a los cerdos de la infección por PCV2.

Tabla 6 Viremia en suero porcino medida por PCR

Grupo	Antes de la exposición	días después de la exposición			
		7	11	19	25
Grupo 1	0/5 ^a	2/5	2/5	1/5	1/5
Grupo 2	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5
Grupo 3	0/5	3/5	2/5	1/5	1/5
Grupo 4 (Control)	0/5	4/5	3/5	4/5	3/5

50 ^aLos denominadores representan el número de lechones examinados, y los numeradores representan el número de lechones con viremia.

4.2 Examen histopatológico

55 **[0070]** Los lechones fueron sacrificados y diseccionados a los 25 días después de la exposición. Se descubrió

agrandamiento de los ganglios linfáticos inguinales, mediastínicos y mesentéricos en 2 lechones no vacunados, y las secciones de los ganglios linfáticos estaban pálidas. Otro lechón no vacunado tenía pulmones gomosos y sin colapsar, edema pulmonar y riñones con manchas blancas. Todos los lechones vacunados no mostraron ninguna anomalía patológica grave (Tablas 7 y 8).

5

Tabla 7 Anomalías patológicas en lechones vacunados y no vacunados
Anomalía patológica

Grupo	Agrandamiento de los ganglios linfáticos	Edema Pulmonar	Riñones con manchas blancas	Ligero agrandamiento del bazo	Otras anomalías ^b
Grupo 1	0/5 ^a	0/5	0/5	0/5	0/5
Grupo 2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Grupo 3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Grupo 4 (Control)	2/5	1/5	1/5	1/5	0/5

^aLos denominadores representan el número de lechones diseccionados, y los numeradores representan el número de lechones con anomalías patológicas.

^bOtras anomalías incluyen un ligero agrandamiento del hígado o de la vesícula biliar y de los timpanitos intestinales.

[0071] La Tabla 8 muestra los resultados del examen histopatológico microscópico de las secciones de tejido y los resultados de la evaluación de la viremia por PCV2 por PCR. Se observaron lesiones histopatológicas en los ganglios linfáticos, como depleción de linfocitos e infiltración de macrófagos en casi todos los lechones no vacunados (Grupo 4), y todos los ganglios linfáticos muestreados de lechones no vacunados resultaron positivos para la viremia por PCV2. Además, se observaron lesiones histopatológicas en los pulmones, como la infiltración de células inflamatorias, en 3 lechones no vacunados, y 2 de los tejidos pulmonares de los lechones no vacunados resultaron positivos para la viremia por PCV2. En comparación con los lechones no vacunados, los lechones vacunados mostraron una reducción significativa de las lesiones histopatológicas y de la viremia por PCV2. Se observaron lesiones histopatológicas en los ganglios linfáticos en sólo 1 lechón vacunado (cerdo n.º A4) de un total de 15 (Grupos 1 a 3), y los ganglios linfáticos muestreados del lechón vacunado (cerdo n.º A4) fueron los únicos ganglios linfáticos positivos para la viremia PCV2. Los resultados indicaron que la vacuna de la cepa PCV2 H inactivada de la presente invención fue capaz de proteger a los cerdos de la infección por PCV2, y la tasa de protección fue de 80 %-100 %.

Tabla 8 Examen histopatológico microscópico de secciones de tejido y evaluación de la viremia por PCV2 por PCR después de la exposición a PCV2

Grupo	Cerdo n.º	Ganglios linfáticos			Pulmones			Grado de protección (%)	
		Alteraciones patológicas totales	Depleción de linfocitos	Infiltración de macrófagos	PCR	Alteraciones patológicas totales	infiltración celular inflamatoria		Incidencia de PCR
Grupo 1	A1	-	-	-	-	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-	-	-	-	-
	A3	-	-	-	-	-	-	-	-
	A4	-	+	+	+	-	-	+	-
	A5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Subtotal	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5*	0/5*	1/5	80
Grupo 2	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
	B3	-	-	-	-	-	-	-	-
	B4	-	-	-	-	-	-	-	-
	B5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Subtotal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	100
Grupo 3	C1	-	-	-	-	-	-	-	-
	C2	-	-	-	-	-	-	-	-
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-
	C4	-	-	-	-	-	-	-	-
	C5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Subtotal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	100
	D1	+	+	+	+	-	+	-	+

(continuación)

Grupo	Cerdo n.º	Ganglios linfáticos				Pulmones				Grado de protección (%)
		Alteraciones patológicas totales	Depleción de linfocitos	Infiltración de macrófagos	PCR	Alteraciones patológicas totales	infiltración inflamatoria celular	PCR	PWMS	
Grupo 4 (Control)	D2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D3	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	D4	-	+	+	+	-	-	-	+	+
	D5	-	+	-	+	-	-	-	+	+
	Subtotal	2/5	5/5	4/5	5/5	1/5	3/5	2/5	5/5	5/5

* Los denominadores representan el número de lechones diseccionados, y los numeradores representan el número de lechones con anomalías patológicas.

[0072] Basándose en todos los resultados, la vacuna de la cepa PCV2 H inactivada de la presente invención indujo eficazmente la inmunidad en los cerdos, protegió a los cerdos vacunados de la infección por PCV2, redujo la gravedad y duración de la viremia en los cerdos, minimizó los síntomas clínicos y aumentó la ganancia de peso corporal.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

[0073]

<110> SBC Virbac Limited

10

<120> Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), composición inmunitaria que contiene el mismo, kit de ensayo, y aplicación del mismo

<130> PCT/CN2011/084277

15

<150> US 61/426.087

<151> 22/12/2010

<160> 11

20

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 1767

25

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 1

ES 2 763 327 T3

accagcgcac	ttcggcagcg	gcagcacctc	ggcagcacct	cagcagcaac	atgccagca	60
agaagagtgg	aagaagcggg	ccccaaccac	ataaaagggtg	ggtgttcacg	ctgaataatc	120
cttccgaaga	cgagcgaag	aaaatacggg	agctcccaat	ctccctatth	gattatthta	180
ttgttggcga	ggaaggtaat	gaggagggcc	gaacacccca	cctacagggg	ttcgctaatt	240
ttgtgaagaa	gcaaacttht	aataaagtga	agtggattht	tggtgcccg	tgccacatcg	300
agaaagcgaa	aggaacagat	cagcagaata	aagaatattg	cagtaaagaa	ggcaacttac	360
tgatagaatg	tggagctcct	agatctcaag	gacaacggag	tgacctctct	actgctgtga	420
gtaccttght	ggagagcggg	agtctggtga	ccgttgca	gcagcacct	gtaacgtht	480
tcagaaatth	ccgcgggctg	gctgaactth	tgaaagtga	cggaatg	cagaagcgtg	540
attggaagac	gaatgtacac	gtcattgtgg	ggccacctgg	gtgtggcaaa	agcaaatggg	600
ctgctaath	tgcaagccg	gaaaccacat	actggaaacc	acctagaaac	aagtggtht	660
atggttacca	tggtgaagaa	gtggttghta	ttgatgactt	ttatggctgg	ctgccgtht	720
atgatctact	gagactctgt	gatcgatata	ctthgactgt	tgagactaaa	ggtggaactg	780
tacctthth	ggcccgcagt	attctgatta	ccagcaatca	gaccccgth	gaatggtact	840
cctcaactgc	tgtcccagct	gtagaagctc	tctatcgag	gattacttcc	ttggtatth	900
ggaagaatgc	tacagaacaa	tccaagggg	aagggggcca	gttcgtcacc	ctthcccc	960
catgccctga	atthccatat	gaaataaatt	actgagtctt	ththtact	tcgtaatggt	1020
ththattatt	cacttaggg	taagtgggg	gtctthtaaga	thaaattctc	tgaattgtac	1080
atacatggtt	atacggatat	tgtagtctg	gtcgtatata	ctgththtga	acgcagtgcc	1140
gaggcctaca	tggtctacat	ttccagtagt	ttgtagtctc	agccagagtt	gattctth	1200
gttattgggt	tggaagtaat	cgattgtcct	atcaaggaca	ggtthtggg	taaagtaccg	1260
ggagtggtag	gagaagggct	gggttatggt	atggcgggag	gagtagtth	cataggggtc	1320
ataggttag	gcattggcct	ttgttacaaa	gttatcatct	agaataacag	cagtggagct	1380
cactcccctg	tcaccctggg	tgattgggga	gcagggccag	aattcaacct	taaccttct	1440
tattctgtag	tattcaaagg	gcacagtga	ggggcttgag	ccccctctg	ggggaagaaa	1500
atcattaata	thaaatctca	tcatgtccac	attccaggag	ggcgthtctga	ctgtggtth	1560
cttgacagta	taaccgatgg	tgccggagag	gcgggtgth	aagatgcat	ththcttct	1620
ccagcggtaa	cggtggcggg	ggtggactag	ccaggggcgg	cgccggagga	tctggccaag	1680
atggctgcgg	ggcggtgtc	ttcgtctg	gtaacgcctc	cttgatacg	tcatcgctga	1740
aaacgaaaga	agtgcgctgt	aagtatt				1767

ES 2 763 327 T3

<210> 2
 <211> 945
 <212> ADN
 <213> Circovirus porcino

5

<400> 2

```

atgccagca agaagagtgg aagaagcggg cccaaccac ataaaagggtg ggtgttcacg      60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg agctccaat ctccctat    120
gattat    tta ttgttggcga ggaagtaat gagggggcc gaacaccca cctacagggg    180
ttcgctaatt ttgtgaagaa gcaaac      ttt aataaagtga agtggatatt ttgtgcccgc    240
tgccacatcg agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatattg cagtaaagaa    300
ggcaacttac tgatagaatg tggagctcct agatctcaag gacaacggag tgacctctct    360
actgctgtga gtaccttggt ggagagcggg agtctggtga ccgttgcaga gcagcacctct    420
gtaacgtttg tcagaaat    ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtgag cgggaaaatg    480
cagaagcgtg attggaagac gaatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggcaaa    540
agcaaatggg ctgctaat    tgcagaccgg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac    600
aagtgg    tgg atggttacca tgg    tgaagaa gtggttg    tta ttgatgactt ttatggctgg    660
ctgccgtggg atgatctact gagactctgt gatcgatata ctttgactgt tgagactaaa    720
ggtggaactg tacct      tttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccg    780
gaatgg    tact cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tctatcggag gattacttcc    840
ttggtat    ttt ggaagaatgc tacagaacia tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc    900
ctttcccccc catgccctga atttccatat gaaataaatt actga                      945
  
```

<210> 3
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

10

<400> 3

ES 2 763 327 T3

Met Pro Ser Lys Lys Ser Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg
1 5 10 15

Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile
20 25 30

Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu
35 40 45

Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe
50 55 60

Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly Ala Arg
65 70 75 80

Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
85 90 95

Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Ser
100 105 110

Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu
115 120 125

Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val
130 135 140

Arg Asn Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met
145 150 155 160

Gln Lys Arg Asp Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro
165 170 175

Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr
180 185 190

Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly
195 200 205

Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
225 230 235 240

ES 2 763 327 T3

Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn
 245 250 255

Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu
 260 265 270

Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr
 275 280 285

Glu Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro
 290 295 300

Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr
 305 310

<211> 705

<212> ADN

5 <213> Circovirus porcino

<400> 4

```

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc      60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctagtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg      120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc      180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt      240
ccccaggag ggggctcaag cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag      300
gttaaggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgagctcc      360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc      420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac      480
tttaccocga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaa taacaaaaga      540
aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact      600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataacat gtatgtacaa      660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga                          705
    
```

10

<210> 5

<211> 234

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

15

<400> 5

ES 2 763 327 T3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60

Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Ser Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Ser Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
 180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
 225 230

ES 2 763 327 T3

<210> 6
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Circovirus porcino

5

<400> 6
 atggtaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttccag tatgtggttt ccgggtctgc 60
 aaaattagca gccatttgc ttttgccaca cccaggtggc cccacaatga cgtgtacatt 120
 cgtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
 gaaatttctg acaaacgta cagggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtctc 240
 caacaaggta ctcacagcag tagagaggtc actccgttgt ccttgagatc taggagctcc 300
 acattctatc agtaa 315

<210> 7
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

10

<400> 7
 Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15
 Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Ala Thr Pro Arg
 20 25 30
 Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Arg Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
 35 40 45
 Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
 50 55 60
 Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Glu Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
 85 90 95
 Ser Arg Ser Ser Thr Phe Tyr Gln
 100

15

<210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <223> Cebador/sonda para detectar circovirus porcino tipo 2

20

<400> 8
 gtgaagtgg attttggc c 21

25

ES 2 763 327 T3

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Cebador/sonda para detectar circovirus porcino tipo 2

<400> 9

10 gtctccaat cacgctctg c 21

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador/sonda para detectar circovirus porcino tipo 2

20 <400> 10

tgttggcgag gagggtaatg 20

<210> 11
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Cebador/sonda para detectar circovirus porcino tipo 2

<400> 11

tgggacagca gttgaggagt 20

REIVINDICACIONES

1. Un virus circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), que comprende la secuencia genómica de SEQ ID No: 1.
- 5 2. El virus circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) de la reivindicación 1, que se depositó ante el Centro de China para la Colección de Cultivos Tipo (CCTCC) con el número de adhesión V201117.
3. El virus circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) de la reivindicación 1, en el que el virus PCV2 es capaz de causar un efecto citopático (CPE) en la línea celular PK-15 o en sus líneas celulares derivadas.
- 10 4. Una composición inmunogénica, que comprende el virus circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) de la reivindicación 1.
- 15 5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que el vehículo es un adyuvante.
7. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que el virus PCV2 está inactivado.
- 20 8. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que el virus PCV2 está atenuado.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, que comprende además al menos un antígeno patógeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno del virus de la gripe porcina (VIS), un antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV), un antígeno del micoplasma, un antígeno del parvovirus porcino (PPV), un antígeno de la erisipela, y un antígeno del virus de la pseudorrabia.
- 25 10. La composición inmunogénica de la reivindicación 4 para su uso en un procedimiento de protección de un cerdo contra la infección por circovirus porcino de tipo 2.
- 30 11. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del virus PCV2 de la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID No: 5 y la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID No: 4.
- 35 12. Un kit de prueba del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) para distinguir el virus PCV2 de la reivindicación 1, que comprende uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en el virus de la reivindicación 1, un polinucleótido que comprende SEQ ID No: 4, y una proteína de la cápside que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 5.
- 40 13. El kit de prueba del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) de la reivindicación 12, en el que el virus se deposita en una placa.
14. El kit de prueba del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) de la reivindicación 13, en el que el virus está inactivado.

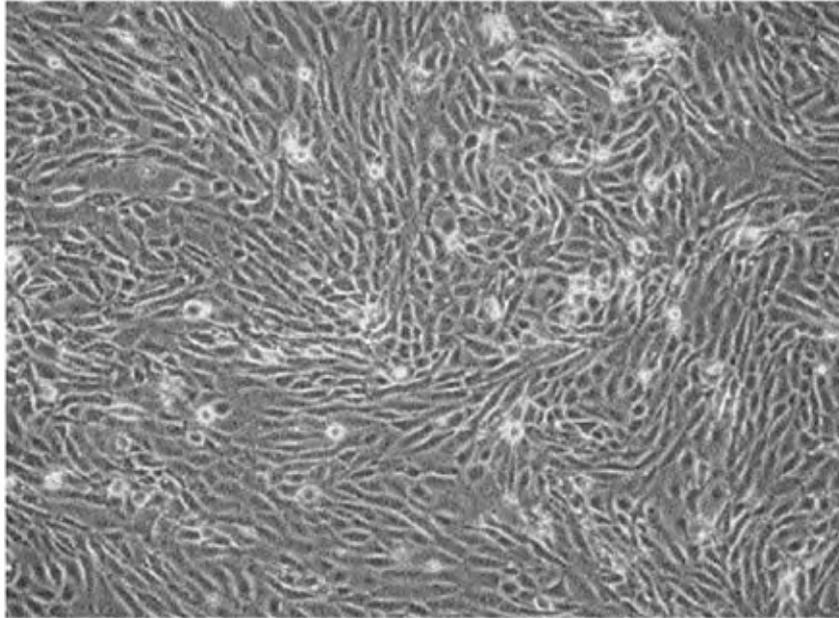


FIG.1A

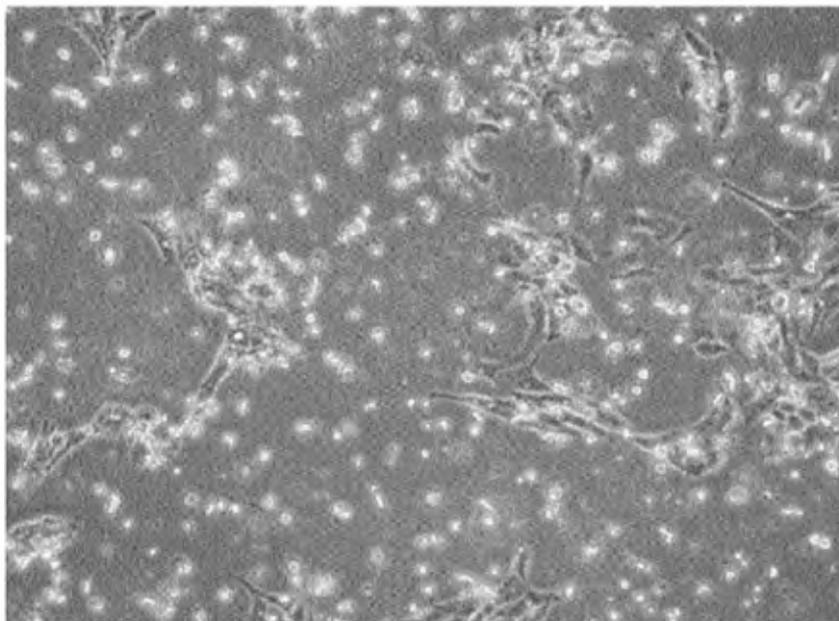


FIG.1B

ORF2 de la cepa H	MTYPRRRYRRRRHRRPRSHLGGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLRSRTIGYTVKTKI
ABV21950	MTYPRRRFRRRHRRPRSHLGGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLRSRTIGYTVKTKI
ADK34046	MTYPRRRFRRRHRRPRSHLGGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLRSRTIGYTVKTKI
ADD25772	MTYPRRRFRRRHRRPRSHLGGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLRSRTIGYTVKTKI
	*****;*****
ORF2 de la cepa H	TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSSPLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPIIQGDRGVSS
ABV21950	TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSNPLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPIIQGDRGVGS
ADK34046	TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSNPLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPIIQGDRGVGS
ADD25772	TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSNPLTMPFFEYYRIRKVKVEFWPCSPIIQGDRGVGS
	*****;*****
ORF2 de la cepa H	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNKRR
ABV21950	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPN-KR
ADK34046	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNKRR
ADD25772	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNKRR
	*****;*****
ORF2 de la cepa H	NQLWLRLLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQVREFNPKDPPLNPK
ABV21950	NQLWLRLLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQVREFNPKDPPLNPK
ADK34046	NQLWLRLLQTTGNIDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQVREFNPKDPPLNPK
ADD25772	NQLWLRLLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQVREFNPKDPPLNPK
	*****;*****

FIG.3

<p>ORF 2 de la cepa H ADD25772_2d</p>	<p>MTYPRRRYRRRHRPRSHLGQILRRRPPWLVHPRRHRWRRRKNGIFNTRLRSTIGYTVKKT MTYPRRRYRRRHRPRSHLGQILRRRPPWLVHPRRHRWRRRKNGIFNTRLRSTIGYTVKAT *****</p>
<p>ORF 2 de la cepa H ADD25772_2d</p>	<p>TVRTPSWNVDMRFININDFLPPGGSSPLTVFFEYRIRKVKVEFWPCSPIITQGDRGVSS TVRTPSWAVDMRFININDFLPPGGSNPLTVFFEYRIRKVKVEFWPCSPIITQGDRGVGS *****</p>
<p>ORF 2 de la cepa H ADD25772_2d</p>	<p>TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNKRR TAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPF SYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNKRR *****</p>
<p>ORF 2 de la cepa H ADD25772_2d</p>	<p>NQLWLRRLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLNPK NQLWLRRLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPLNPK *****</p>

FIG.4

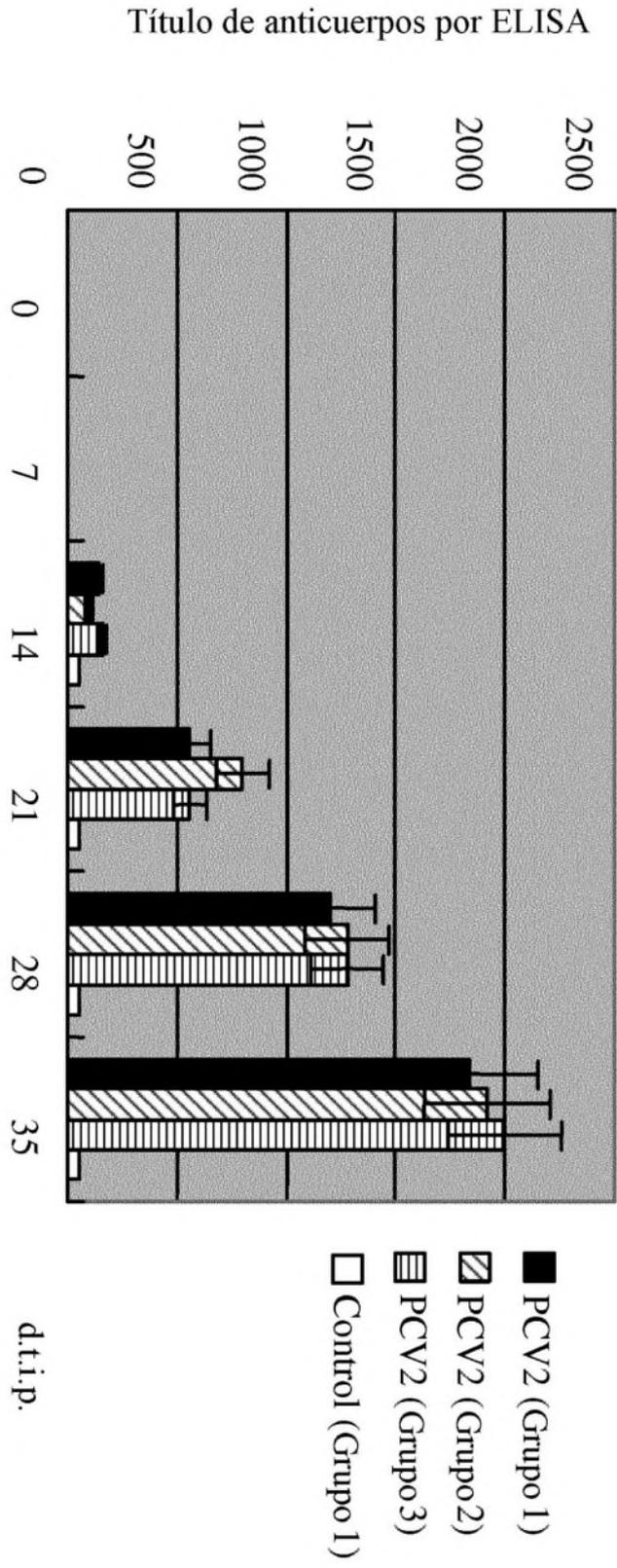


FIG.5

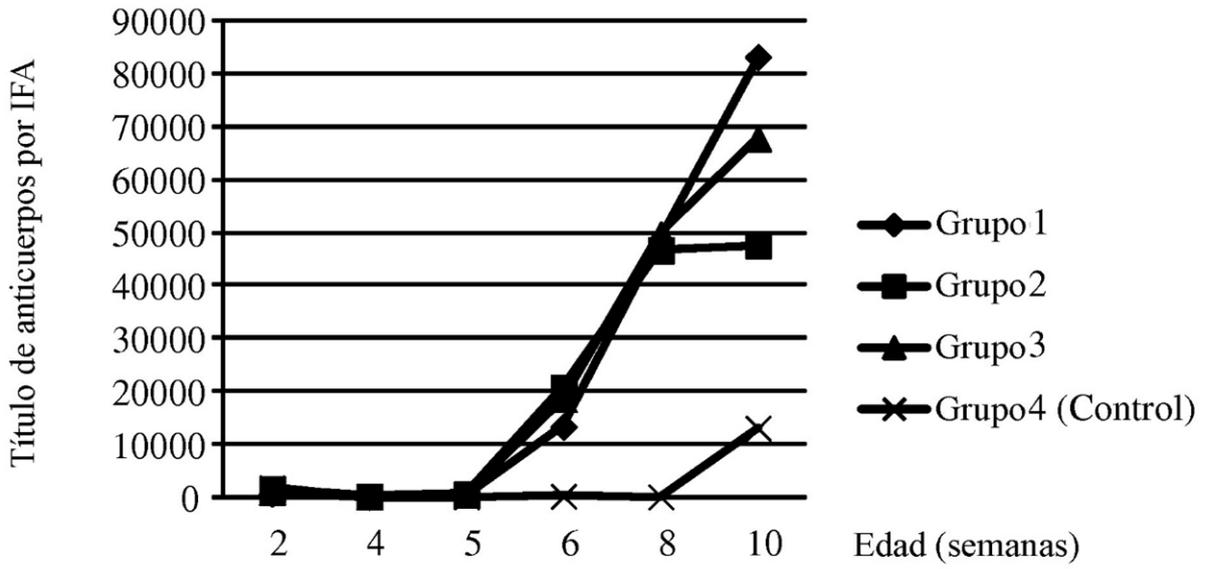


FIG.6

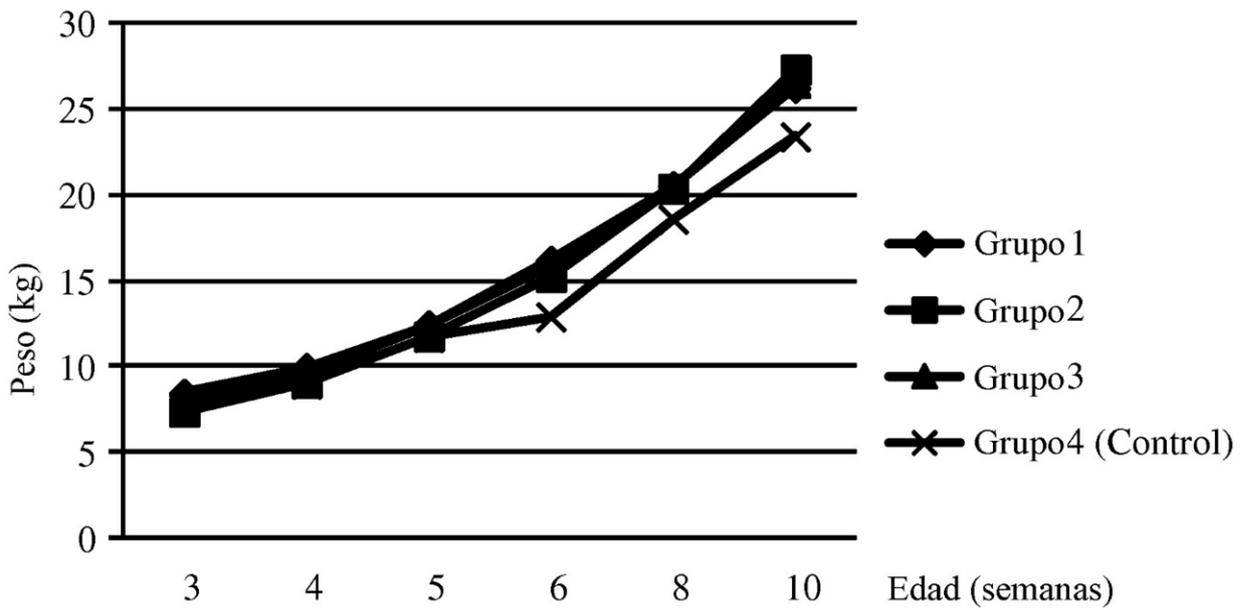


FIG.7