

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 722**

51 Int. Cl.:

C12N 15/34 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C07K 14/01 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2011** **PCT/US2011/028665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011** **WO11116094**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2011** **E 11756931 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 2547770**

54 Título: **Vacuna de circovirus porcino quimérico atenuado vivo**

30 Prioridad:

16.03.2010 US 314362 P

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

14.07.2020

73 Titular/es:

**VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES,
INC. (100.0%)
2200 Kraft Drive, Suite 1050
Blacksburg, VA 24060, US**

72 Inventor/es:

**MENG, XIANG-JIN;
BEACH, NATHAN y
RAMAMOORTHY, SHEELA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 773 722 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de circovirus porcino quimérico atenuado vivo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un PCV quimérico no patogénico (PCV1-2b), a vacunas víricas que comprenden un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica de un PCV quimérico no patogénico (PCV1-2b) y a métodos para proteger frente a infección por PCV y enfermedad asociada a circovirus porcino (PCVAD).

Antecedentes de la invención

El circovirus porcino (PCV) es un virus de ADN pequeño sin cubierta que pertenece a la familia *Circoviridae* (Todd, D. et al., 2005, *Circoviridae*, pág. 327-334. En C. M. Fauquet et al (ed.), *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego). El PCV de tipo 1 (PCV1) se descubrió como un contaminante de la estirpe celular PK-15 de riñón porcino a mediados de los 70 (Tischer, I. et al., 1974, *Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines*, *Zentralbl Bakteriol Orig A* 226: 153-67).

El PCV1 se consideró que era un virus no patogénico porque la inoculación de cerdos con el virus PCV1 derivado de la estirpe celular PK-15 no causaba enfermedad en cerdos (Tischer, I. et al., 1986, *Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus*, *Arch Virol* 91: 271-6). En 1997, a se descubrió una cepa variante de PCV, designada PCV de tipo 2 (PCV2), en lechones con enfermedad consuntiva en Canadá (Allan, G. M. et al., 1998, *Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe*, *J Vet Diagn Invest* 10: 3-10; Clark, E. G., 1997, presentado en la 28th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners; Ellis, J. et al., 1998, *Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome*, *Can Vet J* 39: 44-51; Meehan, B. M. et al., 1998, *Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs*, *J Gen Virol* 79 (Pt 9): 2171-9). Actualmente, el PCV2 es el agente causante primario de la enfermedad asociada a circovirus porcino (PCVAD), que incluye consunción, mortalidad, signos respiratorios, enteritis, fallo reproductivo y síndrome porcino de dermatitis y nefropatía (PDNS) (Opriessnig, T. et al., 2007, *Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies*, *J Vet Diagn Invest* 19: 591-615). El PCV2 se considera actualmente que es uno de los patógenos víricos más económicamente importantes en las poblaciones mundiales de cerdos, y se encuentra en cada país productor porcino importante del mundo (Gillespie, J. et al., 2009, *Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease*, *J Vet Intern Med*). La observación de PCVAD clínica grave en cerdos convencionales infectados experimentalmente con PCV2 solo es infrecuente, y se requiere habitualmente la coinfección con otros patógenos porcinos tales como virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) o parvovirus porcino (PPV) para inducir el espectro completo de PCVAD clínica (Allan, G. M. et al., 2000, *Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication*, *Arch Virol* 145: 2421-9; Opriessnig, T. et al. 2007. *supra*; Roca, M. et al., 2004, *In vitro and in vivo characterization of an infectious clone of a European strain of porcine circovirus type 2*, *J Gen Virol* 85: 1259-66; Rovira, A. et al., 2002, *Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2*, *J Virol* 76: 3232-9; Tomas, A. et al., 2008, *A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2)*, *Vet Microbiol* 132: 260-73). Sin embargo, la infección de cerdos desprovistos de colostro y nacidos por cesárea (CD/CD) con PCV2 solo ha dado como resultado PCVAD clínica grave y mortalidad (Allan, G. et al. 2003, *Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate*, *J Vet Diagn Invest* 15: 553-60; Allan, G. M. et al., 2004, *PMWS: experimental model and co-infections*, *Vet Microbiol* 98: 165-8; Bolin, S. R. et al., 2001, *Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus*, *J Vet Diagn Invest* 13: 185-94; Harms, P. A. et al., 2001, *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: 528-39; Kennedy, S. et al., 2000, *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). Están disponibles varias revisiones integrales de la patogénesis, inmunología y biología molecular de PCV2 (Allan, G. M. y J. A. Ellis, 2000, *Porcine circoviruses: a review*, *J Vet Diagn Invest* 12: 3-14; Ellis, J. et al., 2004, *Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field*, *Vet Microbiol* 98: 159-63; Finsterbusch, T. y A. Mankertz, 2009, *Porcine circoviruses small but powerful*, *Virus Res* 143: 177-83; Gillespie, J. et al., 2009, *supra*; Mankertz, A. et al., 2004, *Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication*, *Vet Microbiol* 98: 81-8; Opriessnig, T. et al. 2007, *supra*; Ramamoorthy, S. y X. J. Meng, 2009, *Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox*, *Anim Health Res Rev* 10:1-20; Segales, J. et al., 2005, *Porcine circovirus diseases*, *Anim Health Res Rev* 6: 119-42).

Aunque la organización genómica del PCV2 patogénico y el PCV1 no patogénico es similar, los genomas de PCV1 y PCV2 comparten solo aproximadamente un 68-76 % de identidad de secuencia nucleotídica (Fenaux, M. et al., 2004, *Detection and in vitro and in vivo characterization of porcine circovirus DNA from a porcine-derived commercial pepsin product*, *J Gen Virol* 85: 3377-82; Hamel, A. L et al., 1998, *Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with*

postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs, J Virol 72: 5262-7; Tischer, I. et al., 1982, A very small porcine virus with circular single-stranded DNA, Nature 295: 64-6) y se han reseñado diferencias en los patrones transcripcionales y el perfil antigénico de la proteína de cápsida (Cheung, A. K. 2003, Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses, Virology 310: 41-9; Lekcharoensuk, P. et al., 2004, Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2, J Virol 78: 8135-45; Shang, S. B. et al., 2009, Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2, Mol Immunol 46: 327-34). Los dos genes principales codificados por el genoma vírico incluyen el gen de replicasa de 942 pb (rep) (Mankertz, A. y B. Hillenbrand, 2001, Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene, Virology 279: 429-38) y el gen de cápsida de 702 pb (cap) (Nawagitgul, P. et al., 2000, Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein, J Gen Virol 81: 2281-7). El gen rep está altamente conservado entre PCV1 y PCV2 con aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia nucleotídica mientras que el gen cap comparte solo aproximadamente un 67-70 % de identidad (Mankertz, A. et al., 2004, *supra*). Actualmente, se han identificado al menos tres subtipos de PCV2 en piaras de cerdos en el mundo: PCV2a, PCV2b y PCV2c (Dupont, K. et al., 2008, Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time, Vet Microbiol 128: 56-64; Segales, J. et al., 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162: 867-8). PCV2a y PCV2b se han asociado ambos con PCVAD clínica de grados variables de gravedad (An, D. J. et al., 2007, Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006, Virus Res 129: 115-22; Ciacci-Zanella, J.R. et al., 2009, Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population, Res Vet Sci 87: 157-60; Lager, K. M et al., 2007, Mortality in pigs given porcine circovirus type 2 subgroup 1 and 2 viruses derived from DNA clones, Vet Rec 161: 428-9; Madson, D. M. et al., 2008, Characterization of shedding patterns of Porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars, J Vet Diagn Invest 20: 725-34; Opriessnig, T. et al., 2006, Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence, J Gen Virol 87: 2923-32; Opriessnig, T. et al., 2008, Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection, J Gen Virol 89: 2482-91). Antes de 2005, se encontraba solo PCV2a en las poblaciones de cerdos en los Estados Unidos y Canadá, mientras que estaban presentes tanto PCV2a como PCV2b en Europa y China (Chae, J. S. y K. S. Choi, 2009, Genetic diversity of porcine circovirus type 2 from pigs in Republic of Korea, Res Vet Sci; Dupont, K. et al., 2008, *supra*). Desde 2005, se reconocieron cepas de PCV2b novedosas en los Estados Unidos y ha habido un desplazamiento global en la prevalencia dominante de PCV2b en poblaciones de cerdos, simultáneamente a una gravedad aumentada de la PCVAD clínica (Carman, S. et al., 2008, The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease-2004-2006, Can J Vet Res 72: 259-68; Chae, J. S. y K. S. Choi, 2009, *supra*; Cheung, A. K. et al., 2007, Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds, Arch Virol 152: 1035-44; Ciacci-Zanella, J. R. et al., 2009, *supra*; Dupont, K. et al., 2008, *supra*; Gagnon, C. A. et al., 2007, The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada, Can Vet J 48: 811-9; Lipej, Z. et al., 2005, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Croatia: detection and characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2), Acta Vet Hung 53: 385-96; Wang, F. et al., 2009, Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2, Virus Res 145: 151-6; Wiederkehr, D. D. et al., 2009, A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland, Vet Microbiol 136: 27-35). La patogenicidad de PCV2c es incierta, ya que se ha reseñado solo en piaras no enfermas en Dinamarca en 1980, 1987 y 1990 (Dupont, K. et al., 2008, *supra*).

Las vacunas comerciales actualmente disponibles son todas vacunas muertas o recombinantes basadas en el subtipo PCV2a (Opriessnig, T. et al. 2007, *supra*; Ramamoorthy, S. y X. J. Meng, 2009, *supra*). Los inventores han desarrollado con éxito anteriormente una vacuna inactivada, Suvaxyn PCV2® One dose™, basada en el virus quimérico PCV1-2a (con el gen de cápsida de PCV2a en el esqueleto de PCV1) (Fenau, M. et al., 2004A, A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs, J Virol 78: 6297-303; Fenau, M. et al., 2003, Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs, J Virol 77: 11232-43; Gillespie, J. et al., 2008, A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) is genetically stable in vitro and in vivo, Vaccine 26: 4231-6). Sin embargo, puesto que el subtipo PCV2b se ha convertido ahora en el genotipo mundialmente dominante asociado con PCVAD clínica grave en cerdos comerciales, y puesto que PCV2a y PCV2b difieren tanto como en un 10 % de identidad de secuencia nucleotídica (Fenau, M. et al., 2000, 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; Olvera, A. et al., 2007, Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality, Virology 357: 175-85), es desconocido si las vacunas muertas o recombinantes basadas en el subtipo PCV2a actuales proporcionan una protección completa frente al subtipo PCV2b recién reconocido. Varios estudios han demostrado eficacia de las vacunas comerciales actuales frente a exposición a PCV2b (Fort, M. et al., 2008, Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins, Vaccine 26: 1063-71; Fort, M. et al., 2009, One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model, Vaccine

27:4031-7; Opriessnig, T. et al., 2009, Comparison of efficacy of comercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination, Vaccine 27: 1002-7), sin embargo, es indispensable desarrollar una vacuna basada en el subtipo PCV2b, preferiblemente una vacuna viva atenuada, contra PCVAD. Una vacuna viva atenuada basada en el nuevo subtipo PCV2b proporcionaría posiblemente mucha mayor protección en el campo que las vacunas muertas y de subunidades actualmente disponibles basadas en el subtipo PCV2a.

El documento US 2009/017064 A1 describe composiciones y métodos para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora cruzada frente a un circovirus porcino patógeno mediante la administración a un cerdo de una cantidad inmunogénicamente eficaz de una vacuna de circovirus porcino quimérico de tipo 1-tipo 2. La referencia describe también que la administración de la vacuna quimérica da como resultado la reducción de la mortalidad mayor de la media asociada con las cepas de tipo 2B de alta mortalidad de circovirus porcino.

El documento US 2010/055122 A1 describe clones de ADN infeccioso, clones de ADN quimérico infeccioso de circovirus porcino (PCV), vacunas y medios para proteger a cerdos frente a infección vírica o síndrome consuntivo multisistémico posdestete (PMWS) causado por PCV2. El clon de ADN infeccioso quimérico y su virus quimérico avirulento derivado se construyen a partir de PCV1 no patógeno en que el gen ORF inmunogénico del PCV2 patógeno reemplaza un gen del PCV1 no patógeno, preferiblemente en la misma posición. El virus quimérico retiene ventajosamente el fenotipo no patógeno de PCV1 pero desencadena respuestas inmunitarias específicas contra el PCV2 patógeno.

COMPENDIO DE LA INVENCION Y DIVULGACION ADICIONAL

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico de un circovirus porcino (PCV) que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un PCV quimérico no patógeno (PCV1-2b) y que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la proteína de cápsida del subtipo PCV2b en el esqueleto genómico de PCV de tipo 1 (PCV 1) en lugar de la secuencia que codifica la proteína de cápsida de PCV1, en el que la proteína de cápsida del subtipo PCV2b se codifica por el gen de cápsida ORF2 de una cepa de PCV2b de tipo silvestre.

En una realización de la presente invención, la molécula de ácido nucleico comprende más de una copia de la secuencia nucleotídica que codifica PCV1-2b.

La presente invención proporciona adicionalmente un plásmido o vector vírico que contiene dicha molécula de ácido nucleico, una célula hospedadora adecuada que contiene dicho vector y un PCV quimérico producido por dicha célula.

La presente invención proporciona también una vacuna vírica que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica de un PCV quimérico no patógeno (PCV1-2b) codificado por una secuencia nucleotídica que contiene una secuencia que codifica la proteína de cápsida del subtipo PCV2b en el esqueleto genómico de un PCV1 en lugar de la secuencia que codifica la proteína de cápsida de PCV1, en la que la proteína de cápsida del subtipo PCV2b se codifica por el gen de cápsida ORF2 de una cepa PCV2b.

La presente invención proporciona adicionalmente dicha vacuna para uso en un método de inmunización de un cerdo frente a infección vírica por PCV2 o para uso en un método de protección de un cerdo frente a enfermedad asociada a circovirus porcino (PCVAD), en la que la vacuna es para administrar a un cerdo una cantidad inmunológicamente eficaz.

En una realización de la presente invención, la vacuna es para administrar a un cerdo en una cantidad inmunológicamente eficaz, en particular por vía intramuscular o intranasal.

Se divulga adicionalmente en la presente memoria una molécula de ácido nucleico de circovirus porcino (PCV) que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patógeno derivado de una secuencia genómica de PCV de tipo 1 (PCV1) y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), preferiblemente del subtipo PCV2b.

En una realización de la presente divulgación, la secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 se selecciona del grupo consistente en los subtipos PCV2a, PCV2b y PCV2c.

En otra realización de la presente divulgación, la secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 es de subtipo PCV2b.

En una realización adicional de la presente divulgación, la secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 es al menos una porción del marco abierto de lectura 2 (ORF2) de PCV2, preferiblemente del subtipo PCV2b.

En aún otra realización de la presente divulgación, la molécula de ácido nucleico codifica más de una copia de un PCV quimérico no patógeno derivado de una secuencia genómica de PCV de tipo 1 (PCV1) y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), preferiblemente del subtipo PCV2b.

Se divulga también en la presente memoria un plásmido o vector vírico biológicamente funcional que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patógeno derivado de una secuencia genómica de

PCV de tipo 1 (PCV1) y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), preferiblemente del subtipo PCV2b.

5 Se divulga adicionalmente en la presente memoria una célula hospedadora adecuada transfectada por un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV de tipo 1 (PCV1) y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), preferiblemente del subtipo PCV2b.

10 Se divulga adicionalmente en la presente memoria un PCV quimérico infeccioso avirulento producido por una célula hospedadora adecuada transfectada por un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV de tipo 1 (PCV1) y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), preferiblemente del subtipo PCV2b.

Se divulga adicionalmente en la presente memoria un PCV quimérico inactivado que comprende al menos una porción de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), preferiblemente del subtipo PCV2b.

En una realización de la presente divulgación, se selecciona la secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 del grupo consistente en los subtipos PCV2a, PCV2b y PCV2c.

15 En otra realización de la presente divulgación, la secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 es del subtipo PCV2b.

En una realización adicional de la presente divulgación, la secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 es al menos una porción del marco abierto de lectura 2 (ORF2) de PCV2.

20 Se divulga adicionalmente en la presente memoria una vacuna vírica que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica de un miembro seleccionado del grupo consistente en: (a) una molécula de ácido nucleico de circovirus porcino (PCV) que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV de tipo 1 (PCV1) y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), (b) un plásmido o vector vírico biológicamente funcional que contiene una molécula de ácido nucleico de PCV que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV1 y al menos una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2, (c) un PCV quimérico no patogénico infeccioso avirulento que contiene una molécula de ácido nucleico de PCV que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV1 y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 y (d) un PCV quimérico inactivado que comprende al menos una porción de una proteína de cápsida de PCV2, preferiblemente del subtipo PCV2b.

En una realización de la presente divulgación, la vacuna contiene virus PCV quimérico vivo.

En una realización de la presente divulgación, la vacuna contiene virus PCV quimérico inactivado.

En otra realización de la presente divulgación, la vacuna contiene adicionalmente un coadyuvante.

En una realización adicional de la presente divulgación, la vacuna protege frente a infección por PCV2a y PCV2b.

35 También se divulga en la presente memoria un método de inmunización de un cerdo frente a infección vírica por PCV2, que comprende administrar a un cerdo una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna vírica que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica de un miembro seleccionado del grupo consistente en: (a) una molécula de ácido nucleico de circovirus porcino (PCV) que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV de tipo 1 (PCV1) y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), (b) un plásmido o vector vírico biológicamente funcional que contiene una molécula de ácido nucleico de PCV que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV1 y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2, (c) un PCV quimérico no patogénico infeccioso avirulento que contiene una molécula de ácido nucleico de PCV que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV1 y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 y (d) un PCV quimérico inactivado que comprende al menos una porción de una proteína de cápsida de PCV2, preferiblemente del subtipo PCV2b.

50 En una realización de la presente divulgación, el método comprende administrar la molécula de ácido nucleico o virus PCV quimérico atenuado vivo al cerdo.

En una realización de la presente divulgación, el método comprende administrar el virus PCV quimérico inactivado al cerdo.

En otra realización de la presente divulgación, el método comprende administrar la vacuna por vía parenteral, intranasal, intradérmica o transdérmica al cerdo.

En una realización adicional de la presente divulgación, el método comprende administrar la vacuna por vía intralinfoide o intramuscular al cerdo.

Se divulga también en la presente memoria un método de protección de un cerdo frente a la enfermedad asociada a circovirus porcino (PCVAD), que comprende administrar a un cerdo una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna vírica que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica de un miembro seleccionado del grupo consistente en: (a) una molécula de ácido nucleico de circovirus porcino (PCV) que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV de tipo 1 (PCV1) y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV de tipo 2 (PCV2), (b) un plásmido o vector vírico biológicamente funcional que contiene una molécula de ácido nucleico de PCV que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV1 y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2, (c) un PCV quimérico no patogénico infeccioso avirulento que contiene una molécula de ácido nucleico de PCV que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un PCV quimérico no patogénico derivado de una secuencia genómica de PCV1 y al menos una porción de una secuencia codificante de una proteína de cápsida de PCV2 y (d) un PCV quimérico inactivado que comprende al menos una porción de una proteína de cápsida de PCV2, preferiblemente del subtipo PCV2b.

Breve descripción de los dibujos

Los rasgos anteriormente mencionados de la invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada de la invención leída junto con los dibujos en que:

La Figura 1 ilustra la construcción y organización genómica de clones de ADN de PCV2b de longitud completa y PCV1-2b quimérico. La Figura 1(A) muestra un clon de ADN monomérico de PCV2b. Se clonó el genoma completo de PCV2b de tipo silvestre en un vector pBSK+ usando un único sitio SacII después de amplificación con los cebadores de PCR A (SEQ ID NO: 3) y B (SEQ ID NO: 4) (Tabla 1). La Figura 1(B) muestra el clon de ADN monomérico de PCV1-2b quimérico. Se construyó el clon de ADN de PCV1-2b quimérico mediante PCR de extensión por superposición usando los cebadores de PCR C-H (SEQ ID NO: 5-10) (Tabla 1).

La Figura 2 ilustra la respuesta de anticuerpo específica de cápsida de PCV2 en cerdos desprovistos de colostro y nacidos por cesárea (CD/CD) inoculados experimentalmente con el virus PCV1-2b quimérico y el virus PCV2b de tipo silvestre. Se representa la relación S/P sérica media $\pm$ EEM para cada grupo de tratamiento a lo largo del experimento, indicando (*) diferencias significativas ese día. Debido a la muerte o sacrificio temprano de algunos cerdos infectados con PCV2b, se muestrearon menos de 5 cerdos en ese grupo a 35-42 dpi. Los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes ese día.

La Figura 3 muestra una comparación de las puntuaciones de lesión linfóide global a 21 dpi en los cerdos desprovistos de colostro y nacidos por cesárea (CD/CD) inoculados con tampón PBS, virus PCV1-2b quimérico y virus PCV2b de tipo silvestre. Se compararon las puntuaciones combinadas de agotamiento linfóide, reemplazo histiocítico y antígeno específico de PCV2 para nódulos linfáticos, bazo y amígdala entre tratamientos. El cerdo inoculado con PCV2b que murió a 18 dpi se incluyó en el análisis. Los círculos indican medias, las cajas son los cuartiles 1º y 3º y los bigotes indican el intervalo total de datos. Los tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes.

La Figura 4 ilustra la cuantificación de cargas de ADN vírico en suero y tejidos linfoides en cerdos desprovistos de colostro y nacidos por cesárea (CD/CD) inoculados experimentalmente con el virus PCV1-2b quimérico y el virus PCV2b. La Figura 4(A) muestra una cuantificación de la viremia y cargas de ADN vírico en sueros usando qPCR. Se representa para cada tratamiento el logaritmo de la media de grupo de copias genómicas víricas/ml de suero $\pm$ EEM, indicando (*) diferencias significativas ese día. Todas las muestras a 0 dpi así como todas las muestras de cerdos inoculados con PBS eran negativas. Debido a la muerte o sacrificio temprano de algunos cerdos infectados con PCV2b, se muestrearon menos de 5 cerdos en el grupo a 35-42 dpi. La Figura 4(B) muestra una cuantificación de ADN vírico en tejidos de TBLN usando qPCR. Se representan las cargas de ADN vírico de tejido de nódulo linfático determinadas para cada cerdo el día que murieron o se sacrificaron, representando medias $\pm$ EEM del grupo a 21 y 42 dpi. Todas las muestras de cerdos inoculados con PBS eran negativas, y los cerdos infectados con PCV2b que murieron o se sacrificaron tempranamente debido a PCVAD (círculos negros) no se incluyeron en el análisis de media de grupo. El (*) indica diferencias significativas ese día.

La Figura 5 ilustra la respuesta de anticuerpo específica de PCV2 en cerdos libres de patógeno específico convencionales vacunados con el virus quimérico PCV1-2b y posteriormente expuestos al virus de tipo silvestre PCV2a o PCV2b. Se representa la relación de S/P sérica media $\pm$ EEM para cada grupo de tratamiento a lo largo del experimento, indicando (*) diferencias significativas entre los grupos vacunados (vax) y no vacunados (PBS). Se expusieron todos los cerdos a PCV2a o PCV2b a 56 dpv. Los grupos con letras diferentes a 77 dpv (o 21 dpc) son significativamente diferentes ese día.

La Figura 6 muestra una comparación de las puntuaciones de lesión linfóide global en cerdos SPF convencionales vacunados con PCV1-2b o tampón PBS y expuestos posteriormente a PCV2a o PCV2b. Se compararon las puntuaciones combinadas de agotamiento linfóide, reemplazo histiocítico y antígeno específico de PCV2 para nódulos

linfáticos, bazo y amígdala entre cerdos vacunados y no vacunados por exposición al subtipo de virus PCV2. Los círculos indican mediana, las cajas son los cuartiles 1º y 3º y los bigotes indican el intervalo de datos. Los pares de tratamientos con (*) son significativamente diferentes.

La Figura 7 ilustra la detección y cuantificación de cargas de ADN vírico de PCV2 en muestras de suero y tejido linfático en cerdos convencionales vacunados con tampón PBS o PCV1-2b y posteriormente expuestos a PCV2a o PCV2b. La Figura 7(A) muestra una cuantificación de viremia y cargas víricas en sueros usando qPCR. Se representa para cada tratamiento el logaritmo de la media de grupo de copias genómicas víricas/ml de suero $\pm$ EEM. Todas las muestras a 56 dpv (o 0 dpc) así como todas las muestras de cerdos vacunados eran negativas de ADN de PCV2a o PCV2b. La Figura 7(B) muestra una cuantificación de cargas de ADN vírico en tejidos de TBLN usando qPCR. Se representan las cargas de ADN vírico medianas en tejidos linfáticos para cada cerdo. Los círculos indican mediana, las cajas son los cuartiles 1º y 3º y los bigotes indican el intervalo total de datos. Tras exposición a PCV2a o PCV2b, se detectó ADN vírico en los nódulos linfáticos de todos los cerdos no vacunados, mientras que solo 1/10 cerdos *vax*/PCV2b y 5/10 cerdos *vax*/PCV2a tenían ADN vírico detectable. El (*) indica diferencias significativas entre pares vacunados y no vacunados, basadas en el subtipo de virus de exposición.

Descripción detallada de la invención

La infección por PCV2 y la PCVAD siguen planteando una amenaza importante a las poblaciones mundiales de cerdos. La PCVAD es probablemente la enfermedad económicamente más importante a la que se enfrenta la industria porcina actualmente. La consunción, lesiones microscópicas de agotamiento linfático con infiltración histiocítica y la conservación del antígeno o ADN de PCV2 en las lesiones son tres criterios característicos para diagnosticar PCVAD en un cerdo (Segales, J. et al., 2005, *supra*). Es conocido, sin embargo, que no todos los cerdos infectados con PCV2 desarrollarán PCVAD clínica y son habitualmente necesarios patógenos víricos y bacterianos coinfectiosos para inducir el espectro completo de PCVAD clínica (Albina, E. et al., 2001, An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets, J Comp Pathol 125: 292-303; Magar, R. et al., 2000, Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study, J Comp Pathol 123: 258-69). Antes de 2005, el virus detectado en casos de PCVAD en los Estados Unidos y Canadá era casi exclusivamente del subtipo PCV2a. En consecuencia, se desarrollaron cuatro vacunas comerciales basadas todas en el subtipo PCV2a y se usan actualmente en todo el mundo en piaras de cerdos. Las cepas de PCV2a aisladas en todo el mundo están estrechamente relacionadas y comparten identidades de secuencia nucleotídica de 95 a 99 %, y por tanto estas vacunas comerciales han sido eficaces frente a PCV2a y PCVAD en las poblaciones mundiales de cerdos.

Últimamente, los brotes de casos de PCVAD más graves en ciertas zonas de Estados Unidos y Canadá se han atribuido a la emergencia de un nuevo subtipo de PCV2b (Gagnon, C. A. et al., 2007, *supra*). Las secuencias nucleotídicas entre los subtipos PCV2a y PCV2b difieren tanto como un 10 % y se han identificado distintos motivos de secuencia aminoacídica que distinguen los dos subtipos (Cheung, A. K. et al., 2007, *supra*), planteando por tanto la pregunta de si las vacunas comerciales actuales basadas exclusivamente en el subtipo PCV2a pueden proteger totalmente frente a la nueva infección del subtipo PCV2b. En los últimos años, la prevalencia de PCV2 en las piaras mundiales de cerdos se ha desplazado predominantemente al subtipo PCV2b, y de hecho, la mayoría de los casos de PCVAD recientes en los Estados Unidos están asociados con el nuevo subtipo de PCV2b (Cheung, A. K. et al., 2007, *supra*; Firth, C et al., 2009, Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2, J Virol 83: 12813-21). Las vacunas basadas en el subtipo PCV2a siguen aún en uso en todo el mundo puesto que las vacunas de PCV2a han mostrado proporcionar protección cruzada (Fort, M. et al., 2008, *supra*; Fort, M. et al. 2009, *supra*; Opriessnig, T. et al., 2009, *supra*; Segales, J. et al., 2008, *supra*). Sin embargo, la extensión de la protección cruzada ofrecida por las vacunas basadas en PCV2a frente al subtipo PCV2b nuevo circulante es desconocida, y la industria porcina mundial se beneficiará ciertamente de tener acceso a una vacuna que está basada en el subtipo PCV2b predominante en circulación actualmente. Por lo tanto, uno de los objetivos de la presente invención es desarrollar una vacuna de nueva generación basada en el nuevo subtipo PCV2b, y evaluar la eficacia de la vacuna basada en PCV2b frente a exposiciones tanto a PCV2a como a PCV2b.

La presente invención proporciona un virus quimérico vivo atenuado de PCV1 y PCV2 (PCV1-2b), concretamente, se construye un virus PCV1 que expresa una proteína de cápsida del subtipo de PCV2 PCV2b. Como proceso ejemplar, los inventores generaron primero un clon de ADN infeccioso del subtipo PCV2b y construyeron entonces un virus quimérico novedoso, PCV1-2b, que contiene el gen de cápsida inmunogénico del subtipo PCV2b en el esqueleto genómico del PCV1 no patogénico. Se evaluaron primero la patogenicidad e inmunogenicidad del virus PCV1-2b quimérico novedoso en cerdos CD/CD. Posteriormente, se efectuó una exposición y exposición cruzada en cerdos convencionales para determinar la eficacia de la vacuna de virus de vacuna quimérico PCV1-2b. Los inventores demostraron que el virus de vacuna de PCV1-2b quimérico se atenúa en cerdos e induce inmunidad protectora frente a PCV2b e inmunidad protectora cruzada frente a PCV2a. Por lo tanto, este nuevo virus PCV1-2b quimérico debería ser un excelente candidato a vacuna atenuada viva frente a infecciones tanto por PCV2b como PCV2a y PCVAD.

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. Sin embargo, ha de entenderse que estos ejemplos son solo para ilustración y no pretenden ser totalmente definitivos en cuanto a las condiciones y alcance de esta invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas. Debería apreciarse que cuando se han dado condiciones de reacción típicas (p. ej., temperatura, tiempos de reacción, etc.), pueden usarse también condiciones tanto por encima como por debajo de los intervalos especificados, aunque generalmente es menos conveniente. Los

ejemplos se realizan a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C a aproximadamente 28 °C) y presión atmosférica. Todas las partes y porcentajes a los que se hace referencia en la presente memoria están basados en peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifique otra cosa.

Ejemplo 1.

5 Aislamientos de virus PCV1 y PCV2:

Se construyó el clon de ADN infeccioso de PCV1 en estudios anteriores y se mostró que era no patogénico en cerdos (Fenau, M. et al., 2002, Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions, J Virol 76: 541-51; Fenau, M. et al. 2004A, *supra*; Fenau, M. et al., 2003, *supra*). Se recuperó el aislamiento ISU-40895 de PCV2a (SEQ ID NO: 1, número de acceso a Genbank AF264042) de un cerdo con PCVAD en una granja de Iowa en 1998 (Fenau, M. et al., 2000, *supra*) y se ha usado extensamente en estudios de patogenicidad de PCV2 (Fenau, M. et al., 2002, *supra*; Fenau, M. et al., 2004, *supra*; Fenau, M. et al., 2003, *supra*; Opriessnig, T. et al., 2006, Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions, Vet Pathol 43: 281-93; Opriessnig, T. et al., 2006, Effects of the timing of the administration of Mycoplasma hyopneumoniae bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2, Vet Rec 158: 149-54; Opriessnig, T. et al., 2004, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with Mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2, Vet Pathol 41: 624-40; Opriessnig, T. et al., 2003, Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus, Vet Pathol 40: 521-9). El PCV2a-40895 es capaz de causar lesiones microscópicas de PCVAD y la enfermedad clínica en condiciones experimentales (Opriessnig, T. et al., 2006, *supra*; Opriessnig, T. et al., 2004, Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus, Vet Microbiol 98: 209-20; Opriessnig, T. et al., 2004, *supra*). La cepa de PCV2b usada en el estudio se confirmó que era un subtipo PCV2b auténtico por secuenciación del genoma vírico completo (SEQ ID NO: 2, n.º de acceso a Genbank GU799576). Se usó el ADN genómico de PCV2b como fuente para la construcción de los clones de ADN infeccioso de PCV2b, así como el clon de ADN infeccioso de PCV1-2b quimérico. No se determinó la patogenicidad del virus PCV2b, antes de la presente invención, en infecciones experimentales.

Ejemplo 2.

Generación de clones de ADN infeccioso de PCV2b y PCV1-2b quimérico:

Se ha reseñado anteriormente el método para la construcción del clon de ADN infeccioso de PCV2a-40895 (Fenau, M. et al., 2002, *supra*), y se usó un enfoque similar en la presente invención para producir un clon de ADN infeccioso de PCV2b (Fig. 1a). Brevemente, se amplificó el genoma de longitud completa de PCV2b por PCR usando un par de cebadores A (SEQ ID NO: 3) y B (SEQ ID NO: 4) (Tabla 1) con una región superpuesta que contiene el sitio de enzima de restricción SacII que está presente en todas las cepas de PCV2. Se digirió entonces el producto de PCR con Sac II (New England Biolabs) y se ligó en pBluescript II SK(+) (pBSK+) (Stratagene) para producir un clon de ADN infeccioso de PCV2b.

Para producir el clon de ADN infeccioso de PCV1-2b quimérico, se usó PCR de extensión por superposición para reemplazar el gen de cápsida de PCV1 en el esqueleto de un clon infeccioso de PCV1 por el gen de cápsida de PCV2b (Fig. 1b). Se ensambló el genoma de PCV1-2b quimérico de longitud completa a partir de tres fragmentos de PCR superpuestos (Tabla 1). Se generó cada amplicón usando una mezcla maestra Platinum Taq HiFi (Invitrogen) con los mismos parámetros de amplificación (95 °C 3 min.; 40 ciclos de 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min). Se purificaron los productos de PCR usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Se usaron PCR de fusión consistentes en dos etapas para ensamblar el clon de ADN de PCV1-2b quimérico: una reacción de ensamblaje sin cebadores usando 50 ng de cada fragmento como molde (20 ciclos de 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min) seguido de amplificación usando cebadores externos (40 ciclos de 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min). Se fusionó el fragmento de 1.043 pb amplificado a partir de un clon de PCV1 con los cebadores G (SEQ ID NO: 9) y H (SEQ ID NO: 10) (Tabla 1) en primer lugar con el fragmento de 718 pb que contiene el gen de cápsida completo amplificado a partir de PCV2b con los cebadores C (SEQ ID NO: 5) y D (SEQ ID NO: 6) (Tabla 1). Se añadió entonces el fragmento de 122 pb amplificado a partir de PCV1 con los cebadores E (SEQ ID NO: 7) y F (SEQ ID NO: 8) (Tabla 1), dando como resultado un genoma de PCV1-2b quimérico completo flanqueado por sitios de restricción Kpn I. Se digirió posteriormente el producto de fusión quimérico con Kpn I (New England Biolabs) y se clonó en pBSK+. Se secuenciaron completamente los clones de ADN monomérico para confirmar que no se habían introducido mutaciones indeseadas durante las etapas de amplificación de PCR.

Ejemplo 3.

Dimerización de clones de ADN de PCV2b y PCV1-2b:

Estudios anteriores mostraron que los clones de PCV2a dimerizados con dos copias de genoma de PCV2a de longitud completa ligadas de cabeza a cola en tándem son más eficaces en la generación de virus infeccioso tanto en transfección *in vitro* en células PK-15 como en transfección *in vivo* en cerdos (Fenau, M. et al., 2002, *supra*; Fenau, M. et al., 2004A, *supra*; Fenau, M. et al., 2003, *supra*). Por lo tanto, en la presente invención, se dimerizaron ambos

clones de PCV2b y PCV1-2b para producir clones infecciosos más robustos y eficaces. Brevemente, se extrajeron ADN de plásmido que contenían genomas monoméricos de PCV2b y PCV1-2b usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Se linealizó el ADN de plásmido purificado usando Sca I (New England Biolabs) y se sometió a digestión parcial con Kpn I por incubación a 37 °C durante 30 s generando dos fragmentos de aproximadamente 3.100 y 3.700 pb que se purificaron entonces por extracción en gel. Se combinaron los dos fragmentos y se ligaron usando ADN ligasa T4 (Promega) generando clones de ADN infeccioso dimerizado para ambos PCV2b y PCV1-2b.

Ejemplo 4.

Prueba de viabilidad de clones de ADN infeccioso de PCV2b y PCV1-2b en células PK-15:

Se probaron la viabilidad e infectividad de los clones de ADN de PCV2b y PCV1-2b quimérico *in vitro* después de transfección usando un ensayo fluorescente indirecto (IFA) como se describe anteriormente (Fenaux, M. et al., 2002, *supra*). Brevemente, se añadieron 6,5 µg de cada clon de ADN dimerizado a 1.250 µl de medio OPTIMEM (Invitrogen) y 6,25 µl de reactivo PLUS (Invitrogen) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Después de la adición de 16 µl de Lipofectamine LTX (Invitrogen), se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min, seguido de la adición de 250 µl de medio OPTIMEM. Se lavaron matraces de cultivo celular T25 (Corning) que contenían células PK-15 a 60-70 % de confluencia con medio MEM (Invitrogen), se añadió la mezcla de transfección y se incubaron entonces los matraces durante 6 h a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 8 ml de medio de crecimiento (MEM que contiene 10 % de suero fetal bovino y 2x solución de antibiótico/antimicótico [Invitrogen]) a cada matraz y se incubaron durante 72 horas adicionales a 37 °C. Se congelaron y descongelaron entonces las células transfectadas en cada matraz T25 tres veces a -80 °C y se centrifugaron los lisados celulares a 2.500 x g a 4 °C durante 10 min para retirar los residuos celulares. Se recolectaron los sobrenadantes y se usaron para infectar células PK-15 recientes sembradas en placas de 48 pocillos (BD-Falcon) a 50 % de confluencia. Después de la adición de 100 µl de sobrenadante de transfección por pocillo, se incubaron las placas durante 1 h a 37 °C, seguido de la adición de 500 µl de medio de crecimiento a cada pocillo e incubación durante 72 h a 37 °C. Se visualizaron las proteínas de cápsida en los núcleos de células PK-15 infectadas usando IFA como se describe anteriormente (Fenaux, M. et al. 2002, *supra*). Brevemente, se fijaron las células usando acetona al 80 % en PBS a 4 °C durante 30 min, se lavaron una vez con tampón PBS y se incubaron con una dilución 1:1.000 de un anticuerpo monoclonal de ratón mono específico de PCV2 (Rural Technologies, Inc.; Brookings, South Dakota) a 37 °C durante 45 min. Después de lavar 3 veces con tampón PBS, se incubaron las células con una dilución 1:50 de IgG de cabra anti-ratón (KPL) secundario marcado con FITC a 37 °C durante 45 min. Después de lavar con tampón PBS, se cubrieron entonces las células con Fluoromount G (Southern Biotech) y se examinaron bajo microscopio fluorescente.

Los clones de ADN de PCV2b y PCV1-2b quimérico son infecciosos cuando se transfectan en células PK-15: se construyeron clones de ADN de una copia de longitud completa y dimerizados en tándem de PCV2b y PCV1-2b quimérico y se verificaron mediante secuenciación de longitud completa. La transfección de células PK-15 con dímeros de ambos clones de ADN daba como resultado la producción de viriones de progenie infecciosa detectados por IFA con anticuerpos monoclonales específicos de cápsida de PCV2. Los títulos infecciosos de ambas soluciones madre de virus PCV2b y PCV1-2b quimérico eran de aproximadamente 10^{4.5} TCID₅₀/ml.

Ejemplo 5.

Generación y titulación de soluciones madre de virus PCV2a, PCV2b y PCV1-2b infecciosos:

Para preparar inóculos para los estudios en cerdo *in vivo*, se generaron soluciones madre de virus infecciosos para PCV2a-40895, PCV2b y PCV1-2b por transfección de células PK-15 en matraces T25 con clones de ADN infeccioso dimerizado (véase anteriormente) (Fenaux, M. et al. 2002, *supra*; Fenaux, M. et al. 2003, *supra*). Se efectuó la titulación de estas soluciones madre de virus infecciosos por IFA esencialmente como se describe anteriormente (Fenaux, M. et al. 2002, *supra*). Brevemente, se sembraron células PK-15 en placas de 48 pocillos (BD-Falcon) a 60 % de confluencia y se incubaron durante 3 h a 37 °C. Se produjeron diluciones en serie de 10 veces de cada una de las soluciones madre de virus en MEM y se inoculó cada dilución en cuatro pocillos separados con 100 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 1 h a 37 °C, seguido de la adición de 500 µl de medio de crecimiento a cada pocillo y se continuó la incubación durante 72 horas a 37 °C. Se visualizaron las señales positivas en los núcleos de células infectadas en cada pocillo usando IFA (véase anteriormente). Se calculó la dosis infectiva del 50 % en cultivo celular (TCID₅₀) por ml según el método de Reed y Muench.

Ejemplo 6.

Diseño experimental para el estudio de patogenicidad de PCV2b y PCV1-2b quimérico en cerdos desprovistos de colostro y nacidos por cesárea (CD/CD):

Los cerdos CD/CD se considera que son un sistema modelo superior para el estudio de la patogenicidad de PCV2 puesto que las lesiones patológicas características y la PCVAD clínica pueden reproducirse en este modelo (Allan, G. et al., 2003, *supra*; Bolin, S. R. et al., 2001, *supra*; Harms, P. A. et al., 2001, *supra*; Kennedy, S. et al., 2000, *supra*; Tomas, A. et al., 2008, *supra*). Para determinar la patogenicidad del virus PCV1-2b quimérico y compararla con el virus PCV2b de tipo silvestre, se asignaron aleatoriamente un total de 30 cerdos CD/CD (Struve Labs, Manning, IA), de aproximadamente 9 semanas de edad, a tres grupos en salas de 10 animales cada uno. Antes de la inoculación,

se pesó cada cerdo, se tomó sangre y se confirmó que era negativa de la presencia de anticuerpos de PCV2. Los cerdos del grupo 1 se inocularon ficticiamente cada uno con 3 ml de tampón PBS 1 (2 ml por vía intranasal y 1 ml por vía intramuscular) y sirvieron como controles no infectados. Los cerdos en el grupo 2 se inocularon cada uno con 3 ml de inóculo que contenía $2 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀ de virus PCV1-2b quimérico (2 ml por vía intranasal y 1 ml por vía intramuscular). Los cerdos en el grupo 3 se inocularon cada uno de forma similar con $2 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀ de virus PCV2b de tipo silvestre. Se recogieron muestras de sangre antes de la inoculación, y semanalmente después de ello, de cada cerdo hasta la necropsia a los 21 o 42 días después de inoculación (dpi). A 21 dpi, se necropsiaron 5 cerdos asignados aleatoriamente de cada grupo. Los 5 cerdos restantes en cada grupo se necropsiaron a 42 dpi.

Ejemplo 7.

- 10 Diseño experimental para el estudio de patogenicidad de PCV2b y PCV1-2b quimérico en cerdos desprovistos de colostro y nacidos por cesárea (CD/CD):

Los cerdos CD/CD se considera que son un sistema modelo superior para el estudio de la patogenicidad de PCV2 puesto que las lesiones patológicas características y la PCVAD clínica pueden reproducirse en este modelo (Allan, G. et al., 2003, *supra*; Bolin, S. R. et al., 2001, *supra*; Harms, P. A. et al., 2001, *supra*; Kennedy, S. et al. 2000, *supra*; Tomas, A. et al. 2008, *supra*). Para determinar la patogenicidad del virus PCV1-2b quimérico y compararla con el virus PCV2b de tipo silvestre, se asignaron aleatoriamente un total de 30 cerdos CD/CD (Struve Labs, Manning, IA), de aproximadamente 9 semanas de edad, a tres grupos en salas de 10 animales cada uno. Antes de la inoculación, se pesó cada cerdo, se tomó sangre y se confirmó que era negativa de la presencia de anticuerpos de PCV2. Los cerdos del grupo 1 se inocularon ficticiamente cada uno con 3 ml de tampón PBS (2 ml por vía intranasal y 1 ml por vía intramuscular) y sirvieron como controles no infectados. Los cerdos en el grupo 2 se inocularon cada uno con 3 ml de inóculo que contiene $2 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀ de virus PCV1-2b quimérico (2 ml por vía intranasal y 1 ml por vía intramuscular). Los cerdos en el grupo 3 se inocularon cada uno de forma similar con $2 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀ de virus PCV2b de tipo silvestre. Se recogieron muestras de sangre antes de la inoculación, y semanalmente después de ello, de cada cerdo hasta la necropsia los días 21 o 42 después de la inoculación (dpi). A 21 dpi, se necropsiaron 5 cerdos asignados aleatoriamente de cada grupo. Se necropsiaron los 5 cerdos restantes en cada grupo a 42 dpi.

El virus PCV1-2b se atenúa en cerdos CD/CD, mientras que el virus PCV2b de tipo silvestre induce lesiones patológicas y enfermedades clínicas características de PCVAD: para valorar definitivamente el potencial patogénico del virus PCV1-2b quimérico, se realizó el estudio de patogenicidad en un modelo de cerdos CD/CD que se ha mostrado que es el más reproducible y altamente sensible modelo de enfermedad PCVAD (Allan, G. et al., 2003, *supra*; Bolin, S. R. et al., 2001, *supra*; Harms, P. A. et al., 2001, *supra*; Kennedy, S. et al. 2000, *supra*).

Signos clínicos y lesiones macroscópicas: Los cerdos CD/CD inoculados experimentalmente con virus PCV1-2b quimérico o tampón PBS no tenían signos clínicos aparentes de PCVAD a lo largo del estudio, mientras que la inoculación experimental de cerdos CD/CD con PCV2b de tipo silvestre daba como resultado la muerte asociada a PCVAD o un sacrificio temprano en 4 de los 10 cerdos infectados con PCV2b: un cerdo murió a 18 dpi, otro murió a 27 dpi y los otros dos cerdos tuvieron que sacrificarse a 34 dpi debido a una pérdida de peso progresiva.

Los cerdos de cada uno de los tres grupos de tratamiento tenían una ganancia de peso similar a lo largo de los 21 dpi, pero los cerdos infectados con PCV2b de tipo silvestre tenían una disminución de la ganancia de peso en 4 de los 5 cerdos después de 21 dpi (3 de los cuales murieron o se sacrificaron tempranamente debido a la pérdida de peso). No se observaron lesiones pulmonares macroscópicas en cerdos inoculados con el virus PCV1-2b quimérico, mientras que los 3 cerdos inoculados con PCV2b necropsiados a 27 dpi y 34 dpi exhibían lesiones pulmonares moderadas. Los nódulos linfáticos aumentaban en cerdos infectados tanto con PCV1-2b como PCV2b en comparación con los controles de PBS. Sin embargo, el número de cerdos con nódulos linfáticos aumentados y la magnitud del aumento era menor en cerdos infectados con PCV1-2b que en cerdos PCV2b de tipo silvestre (datos no mostrados).

Lesiones microscópicas: Se analizaron las lesiones microscópicas por tratamiento en dos grupos: todos los cerdos necropsiados a 21 dpi o antes (incluyendo el cerdo infectado con PCV2b que murió a 18 dpi) y todos los cerdos necropsiados a 42 dpi (incluyendo los tres cerdos infectados con PCV2b que murieron o se sacrificaron a 27 dpi o 34 dpi).

Las lesiones microscópicas en pulmón, hígado, timo, corazón, riñón, íleon, colon, nódulos linfáticos, bazo y amígdala se resumen en la Tabla 2. Como se esperaba, no había lesiones microscópicas destacables en cerdos inoculados con tampón PBS. Las lesiones microscópicas asociadas a PCV2 características en tejidos linfoides en cerdos inoculados con virus PCV1-2b quimérico disminuían en incidencia y gravedad en comparación con los cerdos inoculados experimentalmente con el PCV2b de tipo silvestre tanto a 21 como 42 dpi (Tabla 2). Las lesiones microscópicas en otros tejidos no linfoides incluían infiltración de leve a grave con linfocitos y macrófagos (Tabla 2). Las lesiones en intestino delgado y grueso se encontraron casi exclusivamente en cerdos infectados con PCV2b de tipo silvestre.

La puntuación de lesión linfóide global de grupo media en cerdos inoculados con el virus PCV1-2b quimérico era significativamente ($p = 0,045$) menor que en cerdos inoculados con el virus PCV2b de tipo silvestre y no era diferente de los cerdos inoculados con tampón PBS a 21 dpi (Fig. 3).

Serología de PCV2: Se analizaron muestras de suero tomadas de cerdos que murieron o se sacrificaron tempranamente junto con aquellas de la siguiente necropsia programada (p. ej., el suero del cerdo que murió a 18 dpi se incluyó en el análisis de muestras de la necropsia a 21 dpi). Se detectaron anticuerpos de IgG específicos de cápsida de PCV2 en los sueros de algunos cerdos infectados con PCV1-2b tan tempranamente como a 7 dpi, con seroconversión en 9/10 cerdos a 21 dpi (Fig. 2). Los títulos de anticuerpo de IgG de PCV2 en cerdos inoculados con virus PCV1-2b quimérico se estabilizaban a 28 dpi y permanecían altos hasta el final del estudio a 42 dpi. En cerdos inoculados experimentalmente con virus PCV2 de tipo silvestre, la seroconversión era menos uniforme: solo 3/10 cerdos eran seropositivos a 21 dpi, y 5/10 cerdos no tenían seroconversión detectable en el estudio. Sin embargo, solo 2/5 cerdos infectados con PCV2b sobrevivieron a la necropsia programada a dpi 42, y ambos se seroconvirtieron a 28 dpi, con títulos de anticuerpo de IgG crecientes hacia el final del estudio. De los cerdos que murieron o se sacrificaron tempranamente debido a PCVAD clínica, solo 1/4 tenían anticuerpo específico de PCV2 detectable en algún momento, y ninguno tenía anticuerpo anti-PCV2 sérico detectable el día en que se necropsiaron. No se detectaron anticuerpos específicos de cápsida de PCV2 en ninguno de los cerdos inoculados con tampón PBS a lo largo del estudio.

Prevalencia y cantidad de antígeno específico de PCV2 en tejidos por IHC: Se resumen en la Tabla 3 la prevalencia y cantidades medias de grupo de antígeno de PCV2 en los diferentes tejidos. Todos los cerdos necropsiados a 21 dpi o antes (incluyendo el cerdo infectado con PCV2b que murió a 18 dpi) se analizaron conjuntamente, y todos los cerdos necropsiados a 42 dpi (incluyendo los tres cerdos infectados con PCV2b que murieron o se sacrificaron a 27 dpi y 34 dpi) se analizaron conjuntamente. En general, la incidencia y cantidad de antígeno de PCV2 eran menores en cerdos inoculados con el virus PCV1-2b quimérico en comparación con los cerdos inoculados con el virus PCV2b de tipo silvestre (Tabla 3). Había un solo cerdo inoculado con PCV1-2b que daba cuenta de resultados positivos en todos los tejidos a 21 dpi excepto la amígdala, donde 4 de los 5 cerdos eran positivos. Los tejidos de los cerdos inoculados con PCV1-2b eran mayoritariamente negativos a 42 dpi, con la excepción de los nódulos linfáticos, en que eran detectables bajas cantidades de antígeno de PCV2 en 4 de los 5 cerdos.

Viremia y cargas víricas séricas de PCV2: Se determinó la carga vírica de PCV2 en los sueros de animales infectados usando un ensayo qPCR modificado que amplifica parte del gen de cápsida de PCV2b y el ensayo qPCR es conocido por funcionar tanto con PCV2b como PCV1-2b (Yang, Z. Z. et al., 2007, Detection of PCV2 DNA by SYBR Green 1-based quantitative PCR. J Zhejiang Univ Sci B 8: 162-9). Se confirmó que todas las muestras de suero tomadas antes de la inoculación a día 0 y de cerdos inoculados con tampón PBS a lo largo del estudio no tenían ADN de PCV2 detectable. Las muestras séricas tomadas de cerdos que murieron o se necropsiaron tempranamente debido a enfermedad PCVAD se analizaron junto con las de la siguiente necropsia programada (p. ej., el suero del cerdo que murió a 18 dpi se incluyó en el análisis de muestras a 21 dpi).

Las cargas víricas séricas presentes en cerdos inoculados con el virus PCV1-2b quimérico eran significativamente ($p \leq 0,009$) menores que las cargas víricas séricas en cerdos inoculados con PCV2b a 14 dpi hasta el final del estudio (Fig. 4a). Las cargas víricas séricas medias tenían un máximo a 10^7 copias genómicas/ml a 14 dpi en cerdos infectados con PCV1-2b, y disminuían constantemente hacia el final del estudio. El valor máximo conseguido para cualquier cerdo infectado con PCV1-2b individual era de 10^8 copias genómicas/ml a 14 dpi. En contraposición, las cargas víricas séricas medias en cerdos infectados con PCV2b permanecían por encima de 10^8 copias genómicas/ml de 14 dpi hasta después de 28 dpi, siendo 10^{12} el valor máximo conseguido por un cerdo individual. Los 4 cerdos que murieron tempranamente o se sacrificaron debido a PCVAD tenían niveles mayores de cargas víricas séricas que los demás cerdos inoculados con PCV2b. Después de 7 dpi, los cerdos infectados con PCV2b tenían copias genómicas víricas por ml de suero al menos 10 veces mayores que los cerdos infectados con PCV1-2b, y 100 veces mayores a 21 dpi y 28 dpi.

Carga vírica de PCV2 en tejidos linfoides: Se determinó la cantidad de ADN vírico de PCV2 en tejidos de TBLN recogidos en la necropsia de cada cerdo usando el mismo ensayo de qPCR que anteriormente. Se confirmó que todas las muestras de tejido de TBLN de cerdos inoculados con tampón PBS eran negativas de ADN de PCV2. Para posibilitar una comparación significativa de las cargas víricas medias de grupo a 21 dpi y 42 dpi, se probaron los cerdos que murieron tempranamente o se sacrificaron debido a enfermedad PCVAD, pero no se incluyeron en el análisis. La carga vírica presente en cada mg de tejido de TBLN se encontró que era significativamente menor en cerdos inoculados con PCV1-2b que en cerdos inoculados con PCV2b a 21 dpi ($p = 0,005$) (Fig. 4b). Los cerdos que murieron o se sacrificaron tempranamente debido a PCVAD tenían las cargas víricas máximas en tejidos de TBLN entre todos los ensayados.

Ejemplo 8.

Diseño experimental para vacunación y estudio de inmunogenicidad del virus PCV1-2b quimérico en cerdos libres de patógenos específicos (SPF) convencionales:

Se adquirieron un total de 40 cerdos SPF cruzados de 3 semanas de edad de una granja comercial (Virginia Tech Swine Center, Blacksburg, VA) que es conocida por estar libre de PCV, PRUSV, PPV, M. hyopneumonia y virus de la hepatitis E porcina. Se asignaron aleatoriamente los lechones a dos grupos de 20 cerdos cada uno, y se albergaron separadamente. Antes de la inoculación, se pesó cada cerdo, se tomó sangre y se confirmó que era negativa de anticuerpos de PCV2. Los cerdos del grupo 1 se vacunaron cada uno por vía intramuscular (IM) con 1 ml de virus

PCV1-2b quimérico ($10^{3.5}$ TCID₅₀ de virus infeccioso por cerdo). Los cerdos del grupo 2 se vacunaron ficticiamente cada uno IM con 1 ml de tampón PBS y sirvieron como controles no vacunados. Se monitorizaron diariamente en todos los animales los signos clínicos, y se recogieron muestras de sangre antes de la inoculación, y semanalmente después de ello, de cada cerdo durante 56 días después de la vacunación (dpv).

5 Ejemplo 9.

Diseño experimental para exposición y exposición cruzada de cerdos vacunados con el subtipo PCV2b de tipo silvestre y el subtipo PCV2a, respectivamente:

A 56 dpv, se dividieron adicionalmente los 20 cerdos vacunados en dos grupos de 10 cerdos cada uno y se albergaron en salas separadas: 10 cerdos vacunados se expusieron cada uno a $2 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀ de virus PCV2b de tipo silvestre (2 ml por vía intranasal y 1 ml IM) y los otros 10 cerdos vacunados se expusieron cada uno cruzadamente de forma similar a $2 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀ de virus PCV2a de tipo silvestre. Los 20 cerdos de control no vacunados se dividieron adicionalmente también en dos grupos de 10 cerdos cada uno, y se inocularon de forma similar con PCV2b y PCV2a, respectivamente. Se recogieron muestras de sangre semanalmente durante 21 días después de la exposición (dpc) (o 77 dpv), en cuyo momento se necropsiaron todos los cerdos.

La vacunación con el virus PCV1-2b quimérico confiere inmunidad protectora a cerdos convencionales frente a exposición al subtipo PCV2b y exposición cruzada al subtipo PCV2a: puesto que la vacuna de PCV1-2b quimérico se pretende para uso en cerdos convencionales en el campo, los inventores realizaron por tanto este estudio de eficacia y exposición a vacuna usando cerdos SPF convencionales.

Signos clínicos y lesiones macroscópicas: Ninguno de los cerdos desarrolló signos clínicos coherentes con PCVAD a lo largo del estudio, y no se observó diferencia en la ganancia de peso entre los grupos de tratamiento. Un solo cerdo asignado al grupo no vacunado/de exposición a PCV2b murió a 2 dpc por septicemia bacteriana no relacionada con PCVAD, y no se incluyó en el análisis. Tras la necropsia, no se observaron lesiones pulmonares macroscópicas en ninguno de los grupos de tratamiento. Se vieron nódulos linfáticos aumentados de leve a moderadamente en todos los grupos de tratamiento, sin diferencias significativas observadas entre tratamientos.

Serología: Se determinó que todos los cerdos eran negativos de anticuerpos contra PCV2, PRRSV, PPV, y SIV antes del estudio. Se detectaron anticuerpos específicos de cápsida de PCV2 en los sueros de cerdos vacunados con PCV1-2b tan temprano como a 14 dpv, ocurriendo la seroconversión en 15/20 cerdos a 21 dpv y 20/20 a 28 dpv (Fig. 5). Los títulos de anticuerpos de IgG de PCV2 se estabilizaban a 35 dpv y permanecían altos en el momento de exposición a 56 dpv. No se detectaron anticuerpos de PCV2 en cerdos de control no vacunados después de exposición a 14 dpc (Fig. 5): 10/10 cerdos expuestos a PCV2a eran seropositivos, en comparación con solo 2/9 cerdos expuestos a PCV2b seropositivos a 14 dpc. Para 21 dpc, 7/9 cerdos expuestos a PCV2b no vacunados se habían seroconvertido.

Lesiones microscópicas: Después de la exposición, la incidencia y gravedad de las puntuaciones de lesión microscópica en tejidos linfoides eran mayores en cerdos no vacunados en comparación con los vacunados (Tabla 4). En general, las puntuaciones de agotamiento linfoide y reemplazo histiocítico características eran menores en cerdos vacunados en comparación con los controles no vacunados (Tabla 4). La puntuación de lesión linfoide global en cerdos vacunados era significativamente menor que en cerdos no vacunados tanto para los grupos de exposición a PCV2a ($p = 0,0001$) como PCV2b ($p = 0,04$) (Fig. 6).

Cantidad de antígeno de PCV2 por IHC en tejidos: Se usó IHC para detectar antígenos específicos de PCV2 en cada tipo de tejido (Tabla 4). De forma similar a las lesiones histológicas, en general la incidencia y cantidad de antígeno de PCV2 en tejidos se redujeron en cerdos vacunados en comparación con controles no vacunados (Tabla 4).

Viremia y carga vírica sérica: Se cuantificaron las cantidades de ADN vírico de PCV2a o PCV2b en el suero después de exposición usando un ensayo qPCR modificado que es específico de la detección del gen rep de PCV2a o PCV2b pero no es capaz de amplificar el virus de vacuna PCV1-2b (Mcintosh, K. A. et al. 2009. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. Vet Microbiol 133: 23-33). Se confirmó que las muestras recogidas antes de la exposición a 56 dpv no tenían ADN de PCV2 detectable. No había viremia de PCV2a ni PCV2b detectable en cerdos vacunados en ningún momento después de la exposición. En contraposición, se detectó viremia de PCV2a o PCV2b en todos los cerdos no vacunados en todos los puntos temporales después de la exposición (Fig. 7a). No había diferencia estadísticamente significativa en la carga vírica sérica entre los cerdos vacunados expuestos al virus PCV2a o PCV2b.

Carga vírica de PCV2a o PCV2b en tejidos linfoides: Se resumen en la Figura 7b las cantidades de ADN vírico de PCV2a o PCV2b en tejidos de TBLN recogidos en la necropsia. Se encontró que las cargas víricas en cada mg de tejido de TBLN eran significativamente menores en cerdos vacunados en comparación con no vacunados con los grupos de exposición tanto a PCV2a ($p = 0,0001$) como a PCV2b ($p < 0,0001$) (Fig. 7b). Solo 1/10 de los cerdos vacunados y expuestos a PCV2b tenía ADN vírico de PCV2b detectable en los tejidos de TBLN, con una carga vírica de 10^5 copias genómicas/mg. 5 de los 10 cerdos vacunados y expuestos a PCV2a tenían ADN vírico de PCV2a detectable en los tejidos de TBLN, cada uno con una carga vírica de 10^5 - 10^6 copias genómicas/mg. La carga vírica en los tejidos de TBLN de los cerdos no vacunados oscilaba de 10^8 - 10^{10} copias genómicas/mg, independientemente de la exposición a PCV2a o PCV2b.

Materiales y métodos experimentales

Células: Se produjo anteriormente un subclón de la estirpe celular PK-15 que está libre de contaminación de PCV1 por dilución de punto final de las células PK-15 (ATCC CCL-33) (Fenau, M. et al., 2000, *supra*; Fenau, M. et al., 2002, *supra*). Se usó la estirpe de células PK-15 libre de PCV1 para la generación de soluciones madre de virus infecciosos y para la titulación de infectividad de las soluciones madre de virus usadas en la presente invención.

Serología: Se usó ELISA para detectar IgG anti-PCV2 en cada muestra de suero como se describe anteriormente (Nawagitgul, P. et al., 2002, Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV, Clin Diagn Lab Immunol 9: 33-40). Las muestras de suero con relaciones de muestra:positivo (S:P) mayores de 0,2 se consideraron positivas de anticuerpos anti-PCV2. Se confirmó que todos los cerdos eran seronegativos de PCV2 por ELISA antes del inicio de los experimentos animales.

Evaluación clínica: Después de la inoculación, vacunación o exposición, se evaluaron diariamente en los cerdos los signos clínicos de PCVAD incluyendo consunción, distrés respiratorio y cambios de comportamiento tales como letargia e inapetencia.

Patología macroscópica e histopatología: Se efectuaron necropsias en los momentos designados para patogenicidad (dpi 21 y 42) o experimento de exposición (dpc 21 o dpv 77) en todos los cerdos de forma anonimizada. Se hicieron estimaciones de las lesiones pulmonares macroscópicas (en el intervalo de 0-100 % del pulmón afectado) y el tamaño de nódulo linfático (en el intervalo de 0 [normal] a 3 [cuatro veces el tamaño normal]) y se puntuaron para cada cerdo (Halbur, P. G. et al., 1995, Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus, Vet Pathol 32: 648-60; Opriessnig, T. et al., 2004, *supra*).

Se recogieron secciones de pulmón, nódulos linfáticos (inguinal superficial, mediastinal, traqueobronquial y mesentérico), amígdala, corazón, timo, íleon, riñón, colon, bazo e hígado durante cada necropsia, se fijaron con formalina tamponada neutra al 10 % y se procesaron rutinariamente para examen histológico e inmunohistoquímica (IHC). Se recogieron también muestras del nódulo linfático traqueobronquial (TBLN) de cada cerdo para extracción de ADN y cuantificación de los genomas víricos por PCR instantánea. Se puntuaron las lesiones microscópicas en pulmones, corazón, hígado, riñón, íleon y colon de manera anonimizada, como se describe anteriormente (Opriessnig, T. et al., 2004, *supra*). Se evaluaron los tejidos linfoides incluyendo nódulos linfáticos, bazo y amígdala basándose en el agotamiento linfoide y el reemplazo histiocítico de folículos, en el intervalo de 0 (normal) a 3 (grave) (Opriessnig, T. et al., 2004, *supra*).

Inmunohistoquímica (IHC): Se efectuó la IHC para la detección de antígeno específico de PCV2 en secciones fijadas en formalina y embebidas en parafina de pulmón, nódulos linfáticos (inguinal superficial, mediastinal, traqueobronquial y mesentérico), amígdala, corazón, timo, íleon, riñón, colon, bazo e hígado usando un antisuero policlonal de conejo (Sorden, S. D. et al. 1999. 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: 528-30). Se estimaron las puntuaciones de antígeno de PCV2 en cada tejido de forma anonimizada y las puntuaciones oscilaban de 0 (sin antígeno) a 3 (más de un 50 % de folículos linfoides contenían células con tinción positiva de antígeno de PCV2 en tejidos linfoides o una alta cantidad de antígeno de PCV2 en otras secciones de tejido) (Opriessnig, T. et al., 2004, *supra*).

Puntuaciones de lesión linfoide microscópica global: Se calcularon las puntuaciones medias de las lesiones linfoides microscópicas globales para cada cerdo como se describe anteriormente (Opriessnig, T. et al., 2004, *supra*). Estas puntuaciones de lesión están basadas en el agotamiento linfoide (LD), reemplazo histiocítico (HR) y antígeno de PCV2 presente combinados en los tejidos linfoides como se determina por IHC.

PCR cuantitativa instantánea para determinar las cargas de ADN vírico: Se extrajo el ADN total de muestras de suero usando el minikit QIAamp DNA (Qiagen Inc) según el protocolo de "sangre y fluidos corporales" suministrado por el fabricante. Se homogeneizaron los tejidos de TBLN recogidos durante las necropsias para producir una suspensión de homogeneizado de tejido al 10 % en tampón PBS estéril, y se extrajo el ADN total usando el minikit QIAamp DNA con el protocolo de "tejido" suministrado por el fabricante (Qiagen Inc). Se diluyeron todos los extractos de ADN de TBLN al menos 1:100 en H₂O estéril para eliminar la fluorescencia de fondo de unión de SYBR verde a ADN genómico porcino. Debido a las concentraciones de ADN vírico extremadamente altas en algunas muestras, se diluyeron algunos extractos de suero y TBLN tanto como 1:10⁶ para llevarlas al intervalo lineal de detección de qPCR. Se modificaron dos ensayos de qPCR basados en SYBR green I para uso en la presente invención para cuantificar los genomas de PCV2 presentes en extractos de TBLN y ADN sérico (Mcintosh, K. A. et al., 2009, Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues, Vet Microbiol 133: 23-33; Yang, Z. Z. et al., 2007, *supra*).

En el estudio de patogenicidad de cerdos CD/CD, los inventores utilizaron un ensayo de qPCR publicado anteriormente que amplifica parte del gen de cápsida de PCV2b para cuantificar los genomas víricos presentes en suero y TBLN (Yang, Z. Z. et al., 2007, *supra*).

Se modificó el protocolo para posibilitar el uso del kit de SYBR y fluoresceína Sensimix (Quantace). Cada 25 µl de reacción contenían 200 nM de cada cebador (P1 (SEQ ID NO: 11): 5'-ATAACCCAGCCCTTCTCCTACC-3'); P2 (SEQ ID NO: 12): 5'-GGCCTACGTGGTCTACATTTCC-3'), dNTP 200 µM, MgCl₂ 3 mM y 5 µl de extracto de ADN. Se hicieron tandas de reacciones por triplicado para cada muestra en un termociclador MyIQ qPCR (BioRad) usando un programa modificado (95 °C 10 min.; 35 ciclos de 95 °C 15 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s). Se cuantificaron los genomas víricos frente a patrones duplicados de clon de ADN infeccioso de PCV2b usando el método de C_t relativo, con un intervalo lineal de cuantificación de 6 unidades logarítmicas (10³-10⁸ copias).

En el estudio de exposición y exposición cruzada de cerdos SPF convencionales, los inventores usaron un ensayo de qPCR anteriormente publicado que amplifica una región altamente conservada de la región del gen replicasa de PCV2 para cuantificar las cantidades de genomas víricos presentes en suero y tejidos de TBLN (Mcintosh, K. A. et al., 2009, *supra*). Este ensayo no detecta el virus de vacuna PCV1-2b quimérico usado en la vacunación, y por tanto permite una cuantificación exacta de los virus de exposición PCV2a o PCV2b solo. Este protocolo se modificó para posibilitar el uso del kit de SYBR y fluorescencia Sensimix. Cada 25 µl de reacción contenían 200 nM de cada cebador (PCV2-83F (SEQ ID NO: 13): 5'-AAAAGCAAATGGGCTGCTAA-3'; PCV2-83R (SEQ ID NO: 14): 5'-TGGTAACCATCCCACTT-3'), dNTP 200 µM, MgCl₂ 5 mM y 5 µl de extracto de ADN. Se hicieron tandas de reacciones por triplicado en un termociclador de qPCR MyIQ usando un programa modificado (95 °C 10 min.; 35 ciclos de 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s). Se cuantificaron los genomas de ADN vírico frente a patrones duplicados de clon de ADN infeccioso de PCV2b usando el método de C_t relativo, con un intervalo lineal de cuantificación de 5 unidades logarítmicas (5x10²-5x10⁶ copias).

Confirmación de secuencia de virus detectados por qPCR: Se probaron extractos de ADN de tejidos de TBLN de cerdos seleccionados de cada grupo para confirmar que el virus detectado por qPCR era el mismo virus que se inoculó en cerdos al inicio de cada estudio. Se confirmó PCV1-2b en el estudio de patogenicidad de CD/CD por amplificación por PCR y secuenciación parcial usando cebadores específicos de PCV1-2b (PCV2F (SEQ ID NO: 15): 5'-TGTTGAAGATGCCATTTTCC-3'; PCV1R (SEQ ID NO: 16): 5'-GAGGAGTTCTACCTCTTCC-3'). Se amplificaron y secuenciaron PCV2a y PCV2b usando cebadores específicos de PCV2 (PCV2F (SEQ ID NO: 17): 5'-TGTTGAAGATGCCATTTTCC-3'; PCV2R (SEQ ID NO: 18): 5'-GAGGTGTTGCTCCTTCTCA-3').

Análisis estadístico: Se analizaron la serología y qPCR sérica usando análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. Se analizó la qPCR de TBLN del estudio de patogenicidad de CD/CD usando ANOVA simple. Para todos los modelos de ANOVA, se investigaron las comparaciones de efectos simples usando la opción de corte del procedimiento Glimmix seguido por el procedimiento de Tukey para comparaciones múltiples. Se analizaron los resultados de qPCR de TBLN del estudio de exposición usando la prueba de 2 muestras de Wilcoxon exacta. Se valoraron las puntuaciones de lesiones linfoides, lesiones de histopatología e IHC de ambos experimentos con el ANOVA de un factor de Kruskal-Wallis exacto, seguido de la prueba de 2 muestras de Wilcoxon exacta para las comparaciones de interés de 2 factores. Se ajustaron las comparaciones de 2 factores para comparaciones múltiples usando el procedimiento de Bonferroni. Se fijó la significancia estadística en alfa= 0,05. Se efectuaron todos los análisis usando software comercialmente disponible (SAS versión 9.2, Cary, NC, EE. UU.).

Los inventores han desarrollado anteriormente una vacuna inactivada, Suvaxyn PCV2® One doce™, basada en un virus quimérico elaborado a partir del subtipo PCV2a (Fenaux, M. et al. 2004, *supra*; Fenaux, M. et al. 2003, *supra*) y esta vacuna muerta ha sido eficaz y está actualmente disponible en el mercado mundial. Usando una estrategia similar, en este presente estudio los inventores desarrollaron primero un virus PCV1-2b quimérico novedoso con el gen de cápsida del subtipo PCV2b clonado en el esqueleto genómico del PCV1 no patogénico. El uso de este virus PCV1-2b quimérico como vacuna de nueva generación atenuada vida contra PCV2 y PCVAD se investigó concienzudamente en modelos de cerdos CD/CD y convencionales.

Para uso del virus PCV1-2b quimérico como una vacuna atenuada viva, es importante establecer que el virus de vacuna está atenuado. Aunque el PCV2 solo raramente causa enfermedad clínica de espectro completo en modelos experimentales, el uso de cerdos CD/CD ha dado como resultado una reproducción exitosa de la PCVAD clínica (Allan, G. et al., 2003, *supra*; Bolin, S. R. et al., 2001, *supra*; Harms, P. A. et al., 2001, *supra*; Kennedy, S. et al., 2000, *supra*; Tomas, A. et al., 2008, *supra*). Por lo tanto, en la presente invención, para determinar definitivamente la patogenicidad del virus PCV1-2b quimérico y compararlo con su virus PCV2b de tipo silvestre parental, los inventores eligieron el modelo de cerdos CD/CD para el estudio de patogenicidad. Como se esperaba, el PCV2b de tipo silvestre solo causaba PCVAD clínica grave en cerdos CD/CD, dando como resultado la muerte o sacrificio temprano debido a la manifestación clínica de PCVAD en 4/10 cerdos infectados con PCV2b. Esto es coherente con estudios anteriores que han mostrado un 25 % de mortalidad y PCVAD clínica significativa en cerdos CD/CD infectados con PCV2 (Allan, G. et al., 2003, *supra*; Bolin, S. R. et al., 2001, *supra*; Harms, P. A. et al., 2001, *supra*). Las puntuaciones de lesión linfóide global para cerdos infectados con PCV2b eran coherentes con una PCVAD sistémica de moderada a grave (Opriessnig, T. et al. 2007, *supra*). El umbral generalmente aceptado para viremia en casos de PCVAD graves es de 10⁷ copias genómicas víricas por ml de suero, aunque la variación de hospedadores evita un corte diagnóstico definitivo único (Brunborg, I. M. et al., 2004, Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR, J Virol Methods 122: 171-8; Olvera, A. et al., 2004, Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs, J Virol Methods 117:75-80; Segales, J. et al., 2005, Quantification of porcine

circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheobronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Microbiol* 111: 223-9). Para 21 dpi, 9/10 cerdos infectados con PCV2b estaban por encima de este umbral, en comparación con solo 1/10 cerdos infectados con virus PCV1-2b quimérico. Los 4 cerdos que murieron o se sacrificaron tempranamente debido a PCVAD tenían todos altas cargas víricas de ADN de PCV2 en suero y tejidos linfoides, pero no tenían anticuerpos de IgG de PCV2 detectables, indicando que estos cerdos infectados con PCV2b murieron debido a respuestas inmunitarias insuficientes y un alto nivel de replicación vírica. Este resultado es coherente con una correlación reseñada anteriormente entre baja respuesta de anticuerpo y gravedad aumentada de la PCVAD (Meerts, P. et al., 2006, Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease, *BMC Vet Res* 2:6). Los datos demostraban claramente que el subtipo PCV2b usado en la presente invención es altamente virulento.

Se encontró que el virus PCV1-2b quimérico estaba significativamente atenuado en el modelo de cerdos CD/CD, a pesar del hecho de que los cerdos CD/CD se inoculaban con una dosis que es al menos 20 veces mayor que la dosis de vacunación normal (Fenaux, M. et al., 2004, *supra*). La atenuación del virus PCV1-2b quimérico se demostraba claramente por todos los parámetros cuantitativos y cualitativos que se usaron para comparar los virus PCV1-2b quimérico y PCV2b de tipo silvestre. No se observó mortalidad ni morbilidad en cerdos infectados con el virus PCV1-2b quimérico, en comparación con la muerte y consunción observadas en aproximadamente la mitad de los cerdos infectados con PCV2b. Las puntuaciones de lesión microscópica y las cantidades de antígeno específico de PCV2 en tejidos linfoides eran significativamente menores en los cerdos infectados con PCV1-2b quimérico que en los cerdos infectados con PCV2b de tipo silvestre, indicando que el virus PCV1-2b quimérico causa solo infección subclínica. Globalmente, las puntuaciones de lesión linfoides en cerdos infectados con PCV1-2b quimérico no eran significativamente diferentes de los cerdos de control inoculados con tampón PBS. Adicionalmente, una menor carga vírica de PCV2b en suero y tejidos linfoides se correlaciona directamente con significativamente menos lesiones características o gravedad de la enfermedad en los cerdos infectados con PCV1-2b quimérico, como se observa en estudios anteriores (Brunborg, I. M. et al., 2004, *supra*; Dupont, K. et al., 2009, Transmission of different variants of PCV2 and viral dynamics in a research facility with pigs mingled from PMWS-affected herds and non-affected herds, *Vet Microbiol* 139:219-26; Fenaux, M. et al., 2004, *supra*; Harding, J. C et al., 2008, Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity, *J Vet Diagn Invest* 20: 274-82; Krakowka, S. et al., 2005, Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome, *J Vet Diagn Invest* 17: 213-22; McIntosh, K. A. et al., 2009, *supra*; Olvera, A. et al., 2004, *supra*; Yang, Z. Z. et al., 2007, *supra*).

Después de demostrar que el virus PCV1-2b quimérico se atenúa en el modelo de cerdos CD/CD susceptibles y sensibles, los inventores realizaron entonces un estudio combinado de inmunogenicidad y exposición en cerdos SPF convencionales. Se eligieron cerdos SPF cruzados convencionales de 3 semanas de edad para el experimento de inmunogenicidad/exposición para imitar más estrechamente las condiciones de vacunación de campo, puesto que tal vacuna atenuada viva se usará eventualmente en cerdos convencionales. Aunque no se esperaba PCVAD clínica en este modelo de SPF convencional basándose en estudios publicados previos (Fenaux, M. et al., 2002, *supra*; Fenaux, M. et al., 2004, *supra*; Fenaux, M. et al., 2004, *supra*; Fenaux, M. et al., 2003, *supra*; Fenaux, M. et al., 2004A. *supra*; Opriessnig, T. et al., 2009, Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs, *J Anim Sci* 87: 1582-90; Opriessnig, T. et al., 2008, *supra*), se previó que el nivel de viremia, cargas víricas y lesiones histológicas características en tejidos linfoides inducidas por PCV2 en el modelo de cerdo convencional son parámetros suficientes para evaluar la eficacia de la vacuna (Fenaux, M. et al., 2004, *supra*). Como vacuna atenuada viva, es importante determinar si el virus PCV1-2b quimérico induce suficiente nivel de respuesta de anticuerpo protector tras la vacunación de cerdos. 2 de las 4 vacunas actualmente disponibles están basadas en proteínas de cápsida de PCV2a recombinantes, y por tanto es conocido que la respuesta inmunitaria humoral específica de cápsida de PCV2 es importante para protección. Los resultados de la presente invención mostraban que se detectaban anticuerpos específicos de cápsida de PCV2 en los sueros de cerdos vacunados con PCV1-2b tan temprano como a 14 dpv, y para 28 dpv todos los 20 cerdos vacunados se habían seroconvertido a anticuerpo específico anti-cápsida de PCV2. Los títulos de anticuerpo se estabilizaban para 35 dpv y permanecían altos en el momento de exposición a 56 dpv, indicando que el virus de vacuna de PCV1-2b quimérico es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria humoral fuerte en cerdos convencionales.

Tras exposición a cualquiera de los subtipos PCV2a o PCV2b de tipo silvestre, los cerdos SPF convencionales vacunados con el virus PCV1-2b quimérico atenuado tenían cargas de ADN vírico significativamente menores en suero y tejidos de TBLN, un nivel significativamente disminuido de gravedad e incidencia de lesiones microscópicas características y cantidades significativamente menores de antígeno específico de PCV2 en tejidos linfoides en comparación con los controles no vacunados, indicando que el virus PCV1-2b quimérico induce inmunidad protectora frente a exposición al virus de tipo silvestre. Los resultados mostraban también que los cerdos vacunados con el virus PCV1-2b quimérico se protegían igualmente frente a la exposición homóloga al subtipo PCV2b y la exposición heteróloga al subtipo PCV2a, como se evidenciaba por la falta completa de viremia de PCV2a o PCV2b, reducciones significativas en las 7 cargas víricas en tejidos linfoides y puntuaciones de lesión linfoides global significativamente menores en cerdos vacunados en comparación con controles no vacunados, independientemente del subtipo de virus de exposición. Por lo tanto, parece que el nuevo candidato a vacuna PCV1-2b quimérico atenuado vivo induce tanto inmunidad protectora como protectora cruzada frente a ambos subtipos de PCV2.

Algunos estudios recientes han reseñado que, en general, el subtipo PCV2b está asociado con enfermedad clínica más grave cuando se compara con el subtipo PCV2a (Carman S. et al., 2008, *supra*; Chae, J. S. y K. S. Choi, 2009, *supra*; Grau-Roma, L et al., 2008, A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence, Vet Microbiol 128: 23-35). Sin embargo, sigue siendo discutible si el subtipo PCV2b es más virulento o no que el subtipo PCV2a, puesto que otros estudios no pudieron mostrar definitivamente diferencias significativas en la virulencia entre PCV2a y PCV2b (An, D. J. et al., 2007, *supra*; Lager, K. M. et al., 2007, *supra*; Madson, D. M. et al., 2008, *supra*; Opreissnig, T. et al., 2006, *supra*; Opreissnig, T. et al., 2008, *supra*). Debido a la divergencia de secuencia entre PCV2a y PCV2b, es posible que los dos subtipos de PCV2 puedan diferir en patogenicidad, puesto que se ha mostrado que solo dos cambios de aminoácido en el gen cap eran suficientes para alterar la patogenicidad de PCV2a (Fenau, M. et al., 2004, Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo, J Virol 78: 13440-6). En el grupo de control no vacunado en el actual estudio, donde la mitad de los cerdos se expusieron a PCV2a o PCV2b, los inventores no observaron ninguna diferencia significativa en la virulencia entre grupos. Las dosis de exposición para PCV2a y PCV2b eran equivalentes, pero no había diferencia significativa en las cargas víricas de PCV2 en suero y tejidos de TBLN, las puntuaciones de lesión microscópica característica ni las cantidades de antígeno de PCV2 en tejidos linfoides entre los grupos de exposición a PCV2a y PCV2b. Había algunas diferencias menores en la respuesta de anticuerpo, incluyendo una seroconversión ligeramente retardada a PCV2b en comparación con PCV2a en los cerdos no vacunados (Fig. 5). En los cerdos vacunados, la exposición a PCV2b daba como resultado puntuaciones de lesión linfóide ligeramente mayores, mientras que la exposición a PCV2a daba como resultado un mayor número de tejidos de TBLN positivos por qPCR. Globalmente, los resultados son coherentes con otros estudios que no han encontrado diferencias significativas en la patogenicidad de PCV2a y PCV2b en condiciones experimentales (An, D. J. et al., 2007, *supra*; Lager, K. M. et al., 2007, *supra*; Madson, D. M. et al., 2008, *supra*; Opreissnig, T. et al., 2006, *supra*; Opreissnig, T. et al., 2008, *supra*).

Se han reseñado diferencias en los perfiles antigénicos entre los subtipos PCV2a y PCV2b, y se ha especulado que la falta de un nivel suficiente de protección cruzada por las vacunas comerciales basadas en PCV2a actuales puede haber contribuido a un aumento de la gravedad de PCVAD asociada con el subtipo PCV2b en las poblaciones mundiales de cerdos (Cheung, A. K. et al., 2007, *supra*; Dupont, K. et al., 2008, *supra*; Lekcharoensuk, P. et al., 2004, *supra*; Shang, S. B. et al., 2009, *supra*). La mayoría de las variaciones de secuencia entre PCV2a y PCV2b aparecen en el gen de cápsida, incluyendo un motivo aminoacídico distintivo señal (Cheung, A. K. et al., 2007, *supra*; Olvera, A. et al., 2004, *supra*). Los anticuerpos creados contra este motivo son capaces de diferenciar entre PCV2a y PCV2b *in vitro*, indicando posibles diferencias de antigenicidad (Beach et al, datos no publicados). Los resultados de la presente invención mostraban que una vacuna viva atenuada, PCV1-2b, basada en la cápsida del nuevo subtipo PCV2b protege frente a exposición heteróloga a PCV2a, apoyando por tanto evidencias anteriores de protección cruzada del subtipo PCV2b conferida por vacunas comerciales inactivadas basadas en PCV2a (Fort, M., et al., 2008, *supra*; Fort, M. et al., 2009, *supra*; Opreissnig, T. et al., 2009, *supra*; Opreissnig, T. et al., 2008, *supra*).

En resumen, los datos de la presente invención demuestran que el candidato a vacuna PCV1-2b quimérico basado en el nuevo subtipo PCV2b se atenúa en cerdos CD/CD e induce inmunidad protectora y protectora cruzada en cerdos convencionales vacunados frente a exposición tanto a PCV2b como a PCV2a, respectivamente. Los resultados de la presente invención fijarán el escenario para un desarrollo adicional de este virus PCV1-2b quimérico como primera vacuna viva atenuada frente a infección por PCV2 y PCVAD. Aunque el virus de vacuna PCV1-2b solo ofrecía protección cruzada frente a ambos subtipos PCV2a y PCV2b, puede ser más ventajoso en el futuro combinar la vacuna de PCV1-2b de la presente invención con las vacunas comerciales basadas en PCV2a actuales para una protección más completa.

Se divulgan también en la presente memoria vacunas de clones de ADN vírico y molecular infeccioso, y métodos de uso de las mismas. Los cerdos inoculados se protegen de una infección vírica grave y otras enfermedades causadas por infección o coinfección con PCV2. El método novedoso protege a cerdos necesitados de protección frente a infección vírica mediante la administración al cerdo de una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna según la invención. Pueden procurarse otros antígenos tales como PRRSV, PPV, otros agentes porcinos infecciosos e inmunostimulantes simultáneamente al cerdo para proporcionar un amplio espectro de protección frente a infecciones víricas.

Las vacunas comprenden, por ejemplo, los clones de ADN vírico y molecular infeccioso, el genoma de ADN infeccioso de PCV clonado en plásmidos o vectores adecuados tales como, por ejemplo, el vector pSCK, un virus vivo avirulento, un virus inactivado, etc. en combinación con un portador no tóxico fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más coadyuvantes. La vacuna puede comprender también el clon de ADN molecular de PCV2 infeccioso descrito en la presente memoria. El ADN de PCV infeccioso, el ADN de plásmido que contiene el genoma vírico infeccioso y el virus vivo son preferidos, siendo el más preferido el virus vivo. La vacuna vírica viva avirulenta de la presente invención proporciona una ventaja frente a vacunas víricas tradicionales que usan virus vivos atenuados, que corren el riesgo de revertir al estado virulento, o virus completo propagado en cultivo celular muerto que puede no inducir suficiente respuesta inmunitaria de anticuerpo para protección frente a la enfermedad vírica.

Las vacunas y los métodos de uso de las mismas están también incluidos en el alcance de la presente invención. Las especies de mamíferos inoculados se protegen de una infección vírica grave, y pueden proporcionar también protección para enfermedades relacionadas con la coinfección de PCV, tales como PCVAD y dermatitis porcina y

síndrome de nefropatía (PDNS) y otras dolencias relacionadas. La vacuna comprende, por ejemplo, un virus TTV porcino inactivado o atenuado, un portador no tóxico fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más coadyuvantes.

El coadyuvante, que puede administrarse junto con la vacuna de la presente invención, es una sustancia que aumenta la respuesta inmunológica del cerdo a la vacuna. El coadyuvante puede administrarse al mismo tiempo y en el mismo sitio que la vacuna, o en un momento diferente, por ejemplo, como refuerzo. Los coadyuvantes pueden administrarse ventajosamente también al cerdo de una manera o en un sitio diferente de la manera o sitio en que se administra la vacuna. Los coadyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, 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 coadyuvantes 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 de la difteria, toxina del tétanos, toxina pertussis, coadyuvante incompleto o completo de Freund, etc. Los coadyuvantes basados en toxinas, tales como toxina de la difteria, toxina del tétanos y toxina pertussis, pueden inactivarse antes del uso, por ejemplo, por tratamiento con formaldehído.

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

Las nuevas vacunas de esta invención no están limitadas a ningún tipo o método particular de preparación. Las vacunas víricas clonadas incluyen, pero sin limitación, vacunas de ADN infeccioso (concretamente, que usan plásmidos, vectores u otros portadores convencionales para inyectar directamente ADN en cerdos), vacunas vivas, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivadas, vacunas de subunidades, vacunas atenuadas, vacunas genomanipuladas, etc. Estas vacunas se preparan mediante métodos estándares conocidos en la materia.

Como beneficio adicional, el virus vivo preferido de la presente invención proporciona una vacuna genéticamente estable que es más fácil de elaborar, almacenar y suministrar que otros tipos de vacunas atenuadas.

Otra vacuna utiliza plásmidos adecuados para suministrar el clon de ADN no patogénico a cerdos. En contraposición con la vacuna tradicional que usa virus completo propagado en cultivo celular vivo o muerto, esta vacuna proporciona la inoculación directa de cerdos con ADN de plásmido que contiene el genoma vírico infeccioso.

Se producen vacunas genomanipuladas adicionales, que son deseables en la presente invención, mediante técnicas conocidas en la materia. Tales técnicas implican, pero sin limitación, la manipulación adicional de ADN recombinante, la modificación o sustitución de las secuencias aminoacídicas de las proteínas recombinantes y similares.

Las vacunas genomanipuladas basadas en la tecnología de ADN recombinante se elaboran, por ejemplo, identificando porciones alternativas del gen vírico que codifica proteínas responsables de la inducción de una respuesta inmunitaria o protectora más fuerte en cerdos (p. ej., proteínas derivadas de ORF3, ORF4, etc.). Tales genes o fragmentos inmunodominantes identificados pueden clonarse en vectores de expresión de proteína estándares, tales como el vector de baculovirus, y usarse para infectar células hospedadoras apropiadas (véase, por ejemplo, O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman & Co., 1992). Las células hospedadoras se cultivan, expresando por tanto las proteínas de vacunas deseadas, que pueden purificarse en la medida deseada y formularse en un producto de vacuna adecuado.

Si los clones retienen cualquier capacidad natural indeseable de causar enfermedades, es también posible localizar las secuencias nucleotídicas en los genomas víricos responsables de cualquier virulencia residual, y genomanipular el virus avirulento, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida a sitio. La mutagénesis dirigida a sitio es capaz de añadir, eliminar o cambiar uno o más nucleótidos (véase, por ejemplo, Zoller et al, DNA 3: 479-488, 1984). Se sintetiza un oligonucleótido que contiene la mutación deseada y se reasocia a una porción de un ADN vírico monocatenario. La molécula híbrida, que es el resultado de ese procedimiento, se emplea para transformar bacterias. Entonces el ADN bicatenario que se aísla, que contiene la mutación apropiada, se usa para producir ADN de longitud completa por ligación a un fragmento de restricción del último que se transfecta posteriormente en un cultivo celular adecuado. La ligación del genoma en el vector adecuado para transferencia puede lograrse mediante cualquier técnica estándar conocida por los especialistas en la materia. La transfección del vector en células hospedadoras para la producción de progenie vírica puede realizarse usando cualquiera de los métodos convencionales tales como transfección mediada por calcio-fosfato o DEAE-dextrano, electroporación, fusión de protoplastos y otras técnicas bien conocidas (p. ej., Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El virus clonado exhibe entonces la mutación deseada. Como alternativa, pueden sintetizarse dos oligonucleótidos que contienen la mutación apropiada. Estos pueden reasociarse formando ADN bicatenario que puede insertarse en el ADN vírico produciendo ADN de longitud completa.

Se administra una cantidad inmunológicamente eficaz de las vacunas de la presente invención a un cerdo necesitado de protección frente a infección vírica. La cantidad inmunológicamente eficaz o la cantidad inmunogénica que se inocular al cerdo puede determinarse fácilmente o titularse fácilmente por pruebas rutinarias. Es una cantidad eficaz

aquella en que se logra una respuesta inmunológica suficiente a la vacuna para proteger al cerdo expuesto al virus PCV. Preferiblemente, el cerdo se protege en la medida en que uno o todos los síntomas o efectos fisiológicos adversos de la enfermedad vírica se reducen, mejoran significativamente o se previenen totalmente.

5 La vacuna puede administrarse en una única dosis o en dosis repetidas. Las dosificaciones pueden oscilar, por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 1.000 microgramos del ADN de plásmido que contiene el genoma de ADN quimérico infeccioso (dependiente de la concentración de componente inmunoactivo de la vacuna), preferiblemente de 100 a 200 microgramos del clon de ADN de PCV1-2 quimérico, pero no debería
10 contener una cantidad de antígeno basado en virus suficiente para dar como resultado una reacción adversa o síntomas fisiológicos de infección vírica. Son conocidos en la materia métodos para determinar o titular dosificaciones adecuadas de agente antigénico activo para encontrar las dosificaciones mínimas eficaces basándose en el peso del cerdo, la concentración del antígeno y otros factores típicos. Preferiblemente, se usa el clon de ADN vírico infeccioso como vacuna, o puede generarse un virus infeccioso vivo *in vitro* y usarse entonces el virus vivo como vacuna. En ese caso, pueden procurarse a un cerdo de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 dosis infectivas del 50 % en cultivo celular (TCID₅₀) de virus vivo, por ejemplo.

15 Las nuevas vacunas de esta invención no están limitadas a ningún tipo o método de preparación particular. Las vacunas incluyen, pero sin limitación, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivadas, vacunas de subunidades, vacunas atenuadas, vacunas genomanipuladas, etc.

Las ventajas de las vacunas vivas son que se activan todas las posibles respuestas inmunitarias en el receptor de la vacuna, incluyendo las respuestas inmunitarias sistémica, local, humoral y mediada por células. La desventaja de las
20 vacunas de virus vivos, que pueden superar las ventajas, se encuentra en el potencial de contaminación con agentes víricos accidentales vivos o el riesgo de que el virus pueda revertir a virulencia en el campo.

Para preparar vacunas de virus inactivados, por ejemplo, la propagación de virus y producción de virus pueden ocurrir en estirpes celulares porcinas cultivadas tales como, sin limitación, células PK-15. Se optimiza entonces la inactivación vírica en serie mediante protocolos generalmente conocidos por los especialistas en la materia o, preferiblemente,
25 mediante los métodos descritos en la presente memoria.

Las vacunas de virus inactivados pueden prepararse tratando el circovirus porcino con agentes inactivantes tales como formalina o disolventes hidrófobos, ácidos, etc., mediante irradiación con luz ultravioleta o rayos X, por calentamiento, etc. La inactivación se realiza de manera entendida en la materia. Por ejemplo, en la inactivación química, se trata una muestra de virus adecuado o muestra de suero que contiene el virus durante un periodo de tiempo suficiente con una
30 cantidad o concentración suficiente de agente inactivante a una temperatura o pH suficientemente alto (o bajo, dependiendo del agente inactivante) para inactivar el virus. La inactivación por calentamiento se realiza a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar el virus. La inactivación por irradiación se realiza usando una longitud de onda de luz u otra fuente de energía durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar el virus. El virus se considera inactivado si es incapaz de infectar una célula susceptible de infección.

35 Las vacunas genomanipuladas, que son también deseables en la presente invención, se producen mediante técnicas conocidas en la materia. Tales técnicas implican, pero sin limitación, el uso de ARN, ADN recombinante, proteínas recombinantes, virus vivos y similares.

Por ejemplo, después de la purificación, el virus de tipo silvestre puede aislarse de muestras biológicas clínicas adecuadas tales como muestras de suero, fecales, de saliva, semen y tejido mediante métodos conocidos en la
40 materia, preferiblemente mediante el método enseñado en la presente memoria que usa cerdos infectados o estirpes celulares adecuadas infectadas. Se extrae el ADN del virus o agente infeccioso biológicamente puro mediante métodos conocidos en la materia y se purifica mediante métodos conocidos en la materia, preferiblemente mediante ultracentrifugación en un gradiente de CsCl. Se clona el ADN del genoma vírico en un hospedador adecuado mediante métodos conocidos en la materia (véase Maniatis et al., id.), y se analiza el genoma vírico entonces para determinar
45 las regiones del genoma esenciales para producir porciones antigénicas del virus. Después de ello, el procedimiento es generalmente el mismo que para la vacuna viva modificada, una vacuna inactivada o una vacuna de subunidades.

Las vacunas genomanipuladas basadas en tecnología de ADN recombinante se elaboran, por ejemplo, mediante la identificación de la porción del gen vírico que codifica las proteínas responsables de inducir una respuesta inmunitaria o protectora más fuerte en cerdos (p. ej., proteína vírica inmunogénica tal como proteína de cápsida derivada de
50 ORF2). Tales genes o fragmentos inmunodominantes identificados pueden clonarse en vectores de expresión de proteína estándares, tales como el vector de baculovirus, y usarse para infectar células hospedadoras apropiadas (véase, por ejemplo, O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual", Freeman & Co. (1992)). Las células hospedadoras se cultivan, expresando por tanto las proteínas de vacuna deseadas que pueden purificarse en la medida deseada y formularse en un producto de vacuna adecuado.

55 Como alternativa, el ADN de PCV porcino aislado que codifica una o más proteínas de cápsida puede insertarse en vectores vivos, tales como un poxvirus o un adenovirus y usarse como vacuna.

Se administra una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna de la presente invención a una especie porcina o de mamífero necesitada de protección frente a dicha infección o síndrome. La "cantidad inmunológicamente eficaz"

puede determinarse fácilmente o titularse fácilmente por pruebas rutinarias. Una cantidad eficaz es aquella en que se alcanza una respuesta inmunológica suficiente a la vacuna para proteger al cerdo u otro mamífero expuesto al virus TTV porcino que puede causar PCVAD, dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS) o dolencias relacionadas. Preferiblemente, el cerdo u otra especie de mamífero se protege en la medida en que se encuentra que uno o todos los síntomas o efectos fisiológicos adversos de la enfermedad vírica se reducen, mejoran significativamente o se previenen totalmente.

La vacuna puede administrarse en una única dosis o en dosis repetidas. Las dosificaciones pueden contener, por ejemplo, de 1 a 1.000 microgramos de antígeno basado en virus (dependiente de la concentración del componente inmunoactivo de la vacuna), pero no deberían contener una cantidad de antígeno basado en virus suficiente para dar como resultado una reacción adversa o síntoma fisiológico de infección vírica. Son conocidos métodos en la materia para determinar o titular dosificaciones adecuadas de agente antigénico activo basándose en el peso del ave o mamífero, la concentración del antígeno y otros factores típicos.

La vacuna puede administrarse a cerdos. También la vacuna puede procurarse a seres humanos tales como granjeros de cerdos que están en riesgo de infectarse por el agente vírico. La vacuna puede administrarse convenientemente por vía oral, intrabucal, intranasal, transdérmica, parenteral, etc. La vía parenteral de administración incluye, pero sin limitación, las vías intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea.

Cuando se administra como un líquido, la presente vacuna puede prepararse en forma de una solución acuosa, un jarabe, un elixir, una tintura y similares. Tales formulaciones son conocidas en la materia y se preparan típicamente mediante la disolución del antígeno y otros aditivos típicos en el sistema portador o disolvente apropiado. Los portadores o disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, etc. Son aditivos típicos, por ejemplo, tintes certificados, aromas, edulcorantes y conservantes antimicrobianos tales como timerosal (etilmercuritiosalicilato de sodio). Tales soluciones pueden estabilizarse, por ejemplo, mediante la adición de gelatina parcialmente hidrolizada, sorbitol o medio de cultivo celular, y pueden tamponarse mediante métodos convencionales usando reactivos conocidos en la materia, tales como hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, una mezcla de los mismos y similares.

Las formulaciones líquidas pueden incluir también suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión o emulsionantes en combinación con otros coformulantes estándares. Estos tipos de formulaciones líquidas pueden prepararse mediante métodos convencionales. Las suspensiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un molino coloidal. Las emulsiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un homogeneizador.

Las formulaciones parenterales, diseñadas para inyección en sistemas de fluidos corporales, requieren una isotonicidad y tamponación de pH apropiados a los correspondientes niveles de los fluidos corporales de mamíferos. La isotonicidad puede ajustarse apropiadamente con cloruro de sodio y otras sales según sea necesario. Pueden usarse disolventes adecuados, tales como etanol o propilenglicol, para aumentar la solubilidad de los ingredientes en la formulación y la estabilidad de la preparación líquida. Los aditivos adicionales que pueden emplearse en la presente vacuna incluyen, pero sin limitación, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las formas de dosificación parenteral deben esterilizarse antes del uso.

TABLA 1. Cebadores oligonucleotídicos usados en la construcción de clones de ADN infeccioso de PCV2b y PCV1-2b quimérico

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño de amplicón (pb)
A	TTT CCG CGG GCT GGC TGA ACT TTT GAA AG	1 779
B	AGC CCG CGG AAA TTT CTG ACA AAC GTT AC	
C	CGT AAT GGT TTT TAT TTT TAA GGG TTA AGT GG	718
D	CTT TCA CTT TTA TAG GAT GAC GTA TCC AAG GAG G	
E	TTC GGG TAC CCG AAG GCC GAT T	122
F	CAC TTA ACC CTT AAA AAT AAA AAC CAT TAC GAT	
G	CCT CCT TGG ATA CGT CAT CCT ATA AAA GTG AAA G	1 043
H	CAG TGG ATC CCC CGG GCT GCA GGA	

TABLA 2: Distribución de las lesiones histopatológicas en tejidos de cerdos desprovistos de colostro y nacidos por cesárea (CD/CD) experimentalmente inoculados con tampón PBS, virus PCV1-2b quimérico y virus PCV2b de tipo silvestre

n° de cerdos con lesiones/n° de examinados (puntuación media)																
dpi	Grupo	Inóculo	Pulmón	Hígado	Timo	Corazón	Riñón	Íleon	Colon	Nódulos linfáticos			Bazo		Amígdala	
										LD ^b	HR ^c	LD ^b	LD ^b	HR ^c	LD ^b	HR ^c
21/nec ^a	1	PBS	3/5 (0.8)	1/5 (0.4)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 (0.2) ⁱ	0/5 ⁱ	0/5	0/5 ⁱ	0/5 ⁱ	0/5 ⁱ	
	2	PCV1-2b	4/5 (1.0)	3/5 (1.0)	1/5 (0.2)	0/5	2/5 (0.6)	1/5 (0.2)	0/5	2/5 (0.6) ^{i,ii}	1/5 (0.4) ⁱⁱⁱ	1/5 (0.2)	1/5 (0.2)	1/5 (0.2) ⁱⁱⁱ	1/5 (0.4) ⁱⁱⁱ	
	3	PCV2b	5/5 (2.8)	5/5 (2.4)	2/5 (0.6)	1/5 (0.2)	3/5 (0.8)	4/5 (2.0)	3/5 (1.0)	5/5 (2.6) ⁱⁱ	5/5 (2.2) ⁱⁱ	4/5 (2.0)	4/5 (1.8)	5/5 (2.4) ⁱⁱ	5/5 (2.2) ⁱⁱ	
42/nec ^a	1	PBS	0/5	0/5 ⁱ	0/5	0/5	0/5 ⁱ	0/5	0/5	0/5 ⁱ	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	2	PCV1-2b	4/5 (1.0)	4/5 (0.8) ^{i,ii}	0/5	3/5 (0.6)	3/5 (1.6) ⁱⁱⁱ	1/5 (0.2)	0/5	2/5 (0.4) ⁱⁱⁱ	1/5 (0.4)	0/5	0/5	1/5 (0.2)	1/5 (0.2)	
	3	PCV2b	3/5 (2.0)	5/5 (1.4) ⁱⁱ	2/4 ⁱⁱ (0.75)	1/5 (0.2)	5/5 (2.6) ⁱⁱ	4/5 (1.6)	4/5 (1.0)	5/5 (2.2) ⁱⁱ	4/5 (2.0)	3/5 (1.2)	3/5 (1.0)	4/5 (2.0)	3/5 (1.8)	

^a los cerdos que murieron o se sacrificaron tempranamente debido a PCVAD se incluyeron en el análisis

^b agotamiento linfide

^c reemplazo histiocítico

^d el timo no estaba presente en uno de los cerdos probados

^{i, ii} los grupos que tienen diferencias estadísticamente significativas en la puntuación media de grupo tienen diferentes numerales

TABLA 3. Detección inmunohistoquímica de antígeno específico de cápsida de PCV2 en cerdos desprovistos de colostro y nacidos por cesárea (CD/CD) inoculados experimentalmente con tampón PBS, virus quimérico PCV1-2b y virus PCV2b de tipo silvestre

dpi	Grupo	Inóculo	nº de cerdos positivos/nº de probados (puntuación media)									
			Pulmón	Hígado	Timo	Corazón	Riñón	Íleon	Colon	Nódulos linfáticos	Bazo	Amígdala
21/nec ^a	1	PBS	0/5 ¹	0/5 ¹	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 ¹	0/5	0/5 ¹
	2	PCV1-2b	0/5 ¹	1/5 (0.2) ^{1,II}	1/5 (0.2)	0/5	1/5 (0.2)	1/5 (0.2)	1/5 (0.2)	1/5 (0.4) ^{1,II}	1/5 (0.2)	4/5 (1.6) ^{1,II}
	3	PCV2b	5/5 (1.6) ^{II}	5/5 (1.4) ^{II}	4/5 (1.6)	1/5 (0.2)	2/5 (0.4)	4/5 (2.0)	3/5 (1.6)	5/5 (2.2) ^{II}	4/5 (1.6)	5/5 (2.4) ^{II}
42/nec ^a	1	PBS	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 (0.2)	0/5 ¹	0/5	0/5 ¹
	2	PCV1-2b	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 (0.2)	0/5	0/5	4/5 (0.8) ^{1,II}	1/5 (0.2)	1/5 (0.2) ^{1,II}
	3	PCV2b	3/5 (1.6)	3/5 (1.4)	2/4 ^b (1.5)	1/5 (0.2)	4/5 (1.8)	4/5 (1.8)	3/5 (1.2)	5/5 (2.2) ^{II}	3/5 (1.4)	5/5 (2.2) ^{II}

^a los cerdos que murieron o se sacrificaron tempranamente debido a PCVAD se incluyeron en el análisis

^b el timo no estaba presente en uno de los cerdos probados

^{1, II} los grupos que tienen diferencias estadísticamente significativas en la puntuación media de grupo tienen diferentes numerales

TABLA 4. Lesiones microscópicas y antígeno específico de PCV2 en tejidos linfoides durante la necropsia en cerdos convencionales vacunados con tampón PBS o candidato a vacuna PCV1-2b quimérico y posteriormente expuestos a virus PCV2a o PCV2b de tipo silvestre

Grupo	Inóculo (0 dpv)	Exposición (56 dpv)	nº de cerdos con lesiones/nº de examinados (puntuación media)							
			Nódulos linfáticos				Bazo			
			LD ^a	HR ^b	IHC ^c	LD ^a	HR ^b	IHC ^c	LD ^a	HR ^b
1	PCV1-2b	PCV2b	8/10 (0.9) ⁱ	3/10 (0.3) ^j	2/10 (0.2)	7/10 (0.7)	5/10 (0.5)	1/10 (0.1)	2/10 (0.2)	0/10
2	PBS	PCV2b	9/9 (1.7) ⁱⁱ	9/9 (1.6) ⁱⁱ	6/9 (0.8)	5/9 (0.6)	2/9 (0.3)	0/9	0/9	1/9 (0.1)
3	PCV1-2b	PCV2a-40895	0/10 ⁱ	0/10	0/10 ⁱ	0/10 ⁱ	0/10	0/10	0/10	1/10 (0.1)
4	PBS	PCV2a-40895	9/10 (1.1) ⁱⁱ	3/10 (0.4)	7/10 (1.1) ⁱⁱ	6/10 (0.6) ⁱⁱ	0/10	0/10	2/10 (0.2)	0/10

^a agotamiento linfide

^b reemplazo histiocítico

^c detección de antígeno específico de PCV2 mediante inmunohistoquímica (IHC); nº de cerdos con IHC positivo/nº de examinados (puntuación antigénica de IHC media)

^{i, ii} los grupos que tienen diferencias estadísticamente significativas en la puntuación media de grupo tienen diferentes numerales

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico de un circovirus porcino (PCV) que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un PCV quimérico no patogénico (PCV1-2b) y que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la proteína de cápsida del subtipo PCV2b en el esqueleto genómico de PCV de tipo 1 (PCV1) en lugar de la secuencia que codifica la proteína de cápsida de PCV1, en la que la proteína de cápsida del subtipo PCV2b se codifica por el gen de cápsida ORF2 de una cepa de PCV2b de tipo silvestre.
5
2. La molécula de ácido nucleico expuesta en la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico comprende más de una copia de la secuencia nucleotídica que codifica PCV1-2b.
3. Un plásmido o vector vírico que contiene la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1.
- 10 4. Una célula hospedadora adecuada que contiene el vector según la reivindicación 3.
5. Un PCV quimérico producido por la célula según la reivindicación 4.
6. Una vacuna vírica que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénica de un PCV quimérico no patogénico (PCV1-2b) codificado por una secuencia nucleotídica que contiene una secuencia que codifica la proteína de cápsida del subtipo PCV2b en el esqueleto genómico de un PCV1 en lugar de la secuencia que codifica la proteína de cápsida de PCV1, en la que la proteína de cápsida del subtipo PCV2b se codifica por el gen de cápsida ORF2 de una cepa de PCV2b.
15
7. La vacuna según la reivindicación 6 para uso en un método de inmunización de un cerdo frente a infección vírica por PCV2, en la que la vacuna es para administrar a un cerdo en una cantidad inmunológicamente eficaz.
8. La vacuna para uso según la reivindicación 7, en la que la vacuna es para administrar al cerdo por vía intramuscular o intranasal.
20
9. La vacuna según la reivindicación 6 para uso en un método de protección de un cerdo frente a enfermedad asociada a circovirus porcino (PCVAD), en la que la vacuna es para administrar a un cerdo en una cantidad inmunológicamente eficaz.

FIG. 1

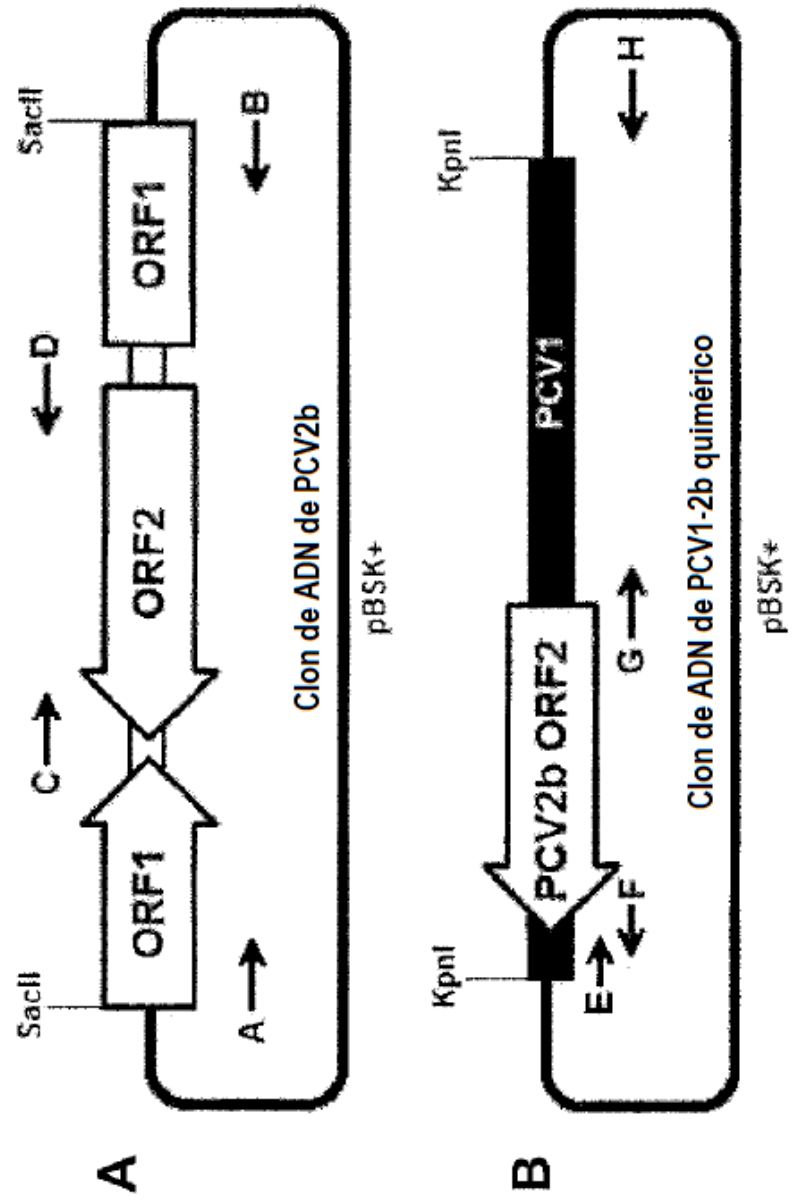


FIG. 2

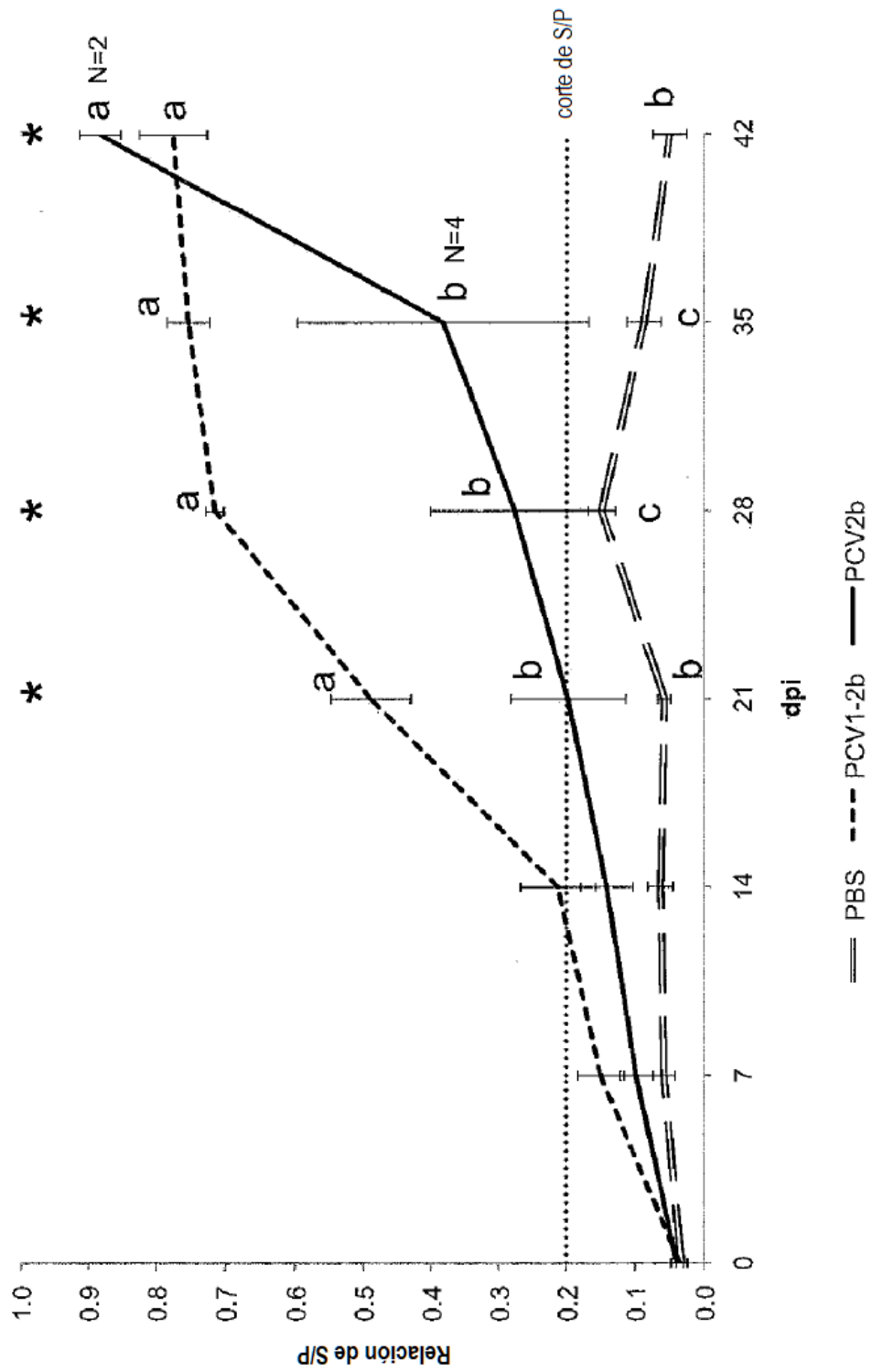
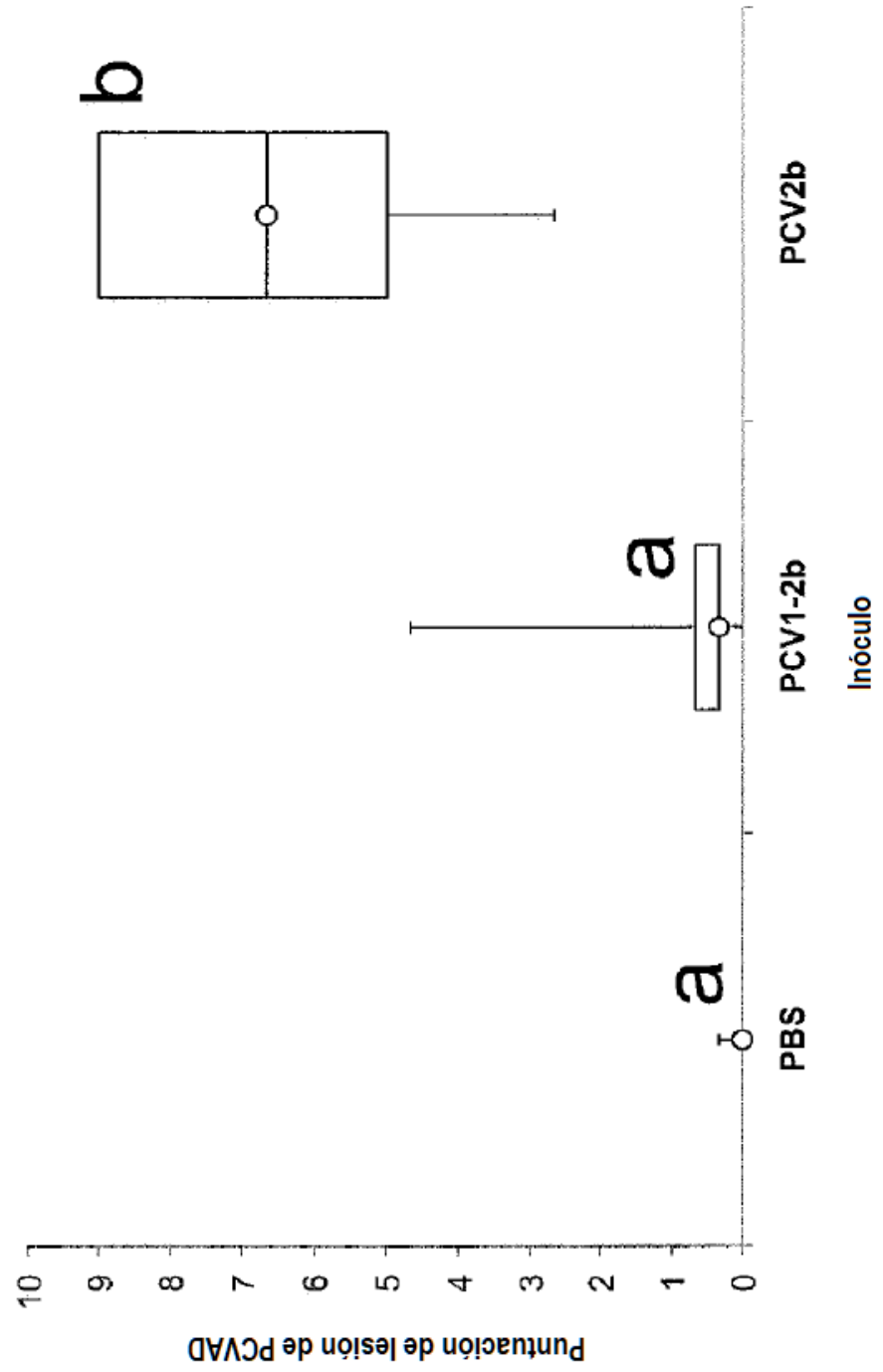


FIG. 3



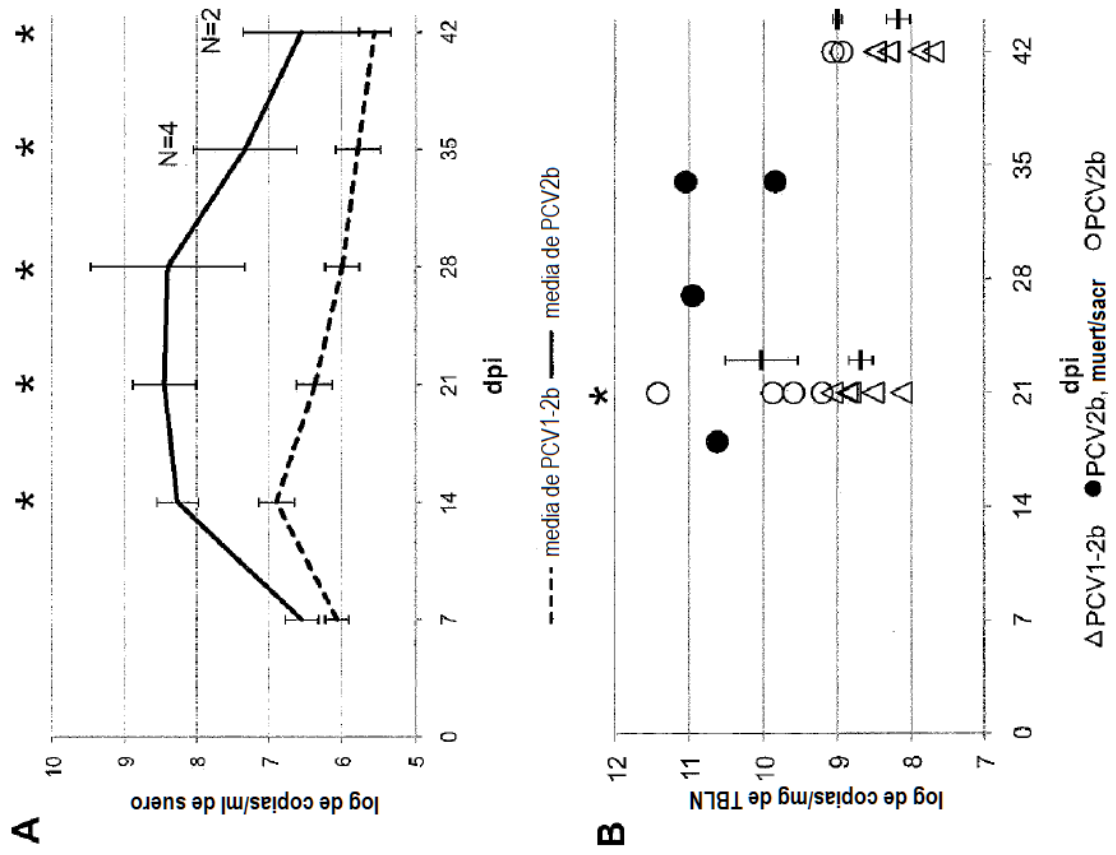


FIG. 4

FIG. 5

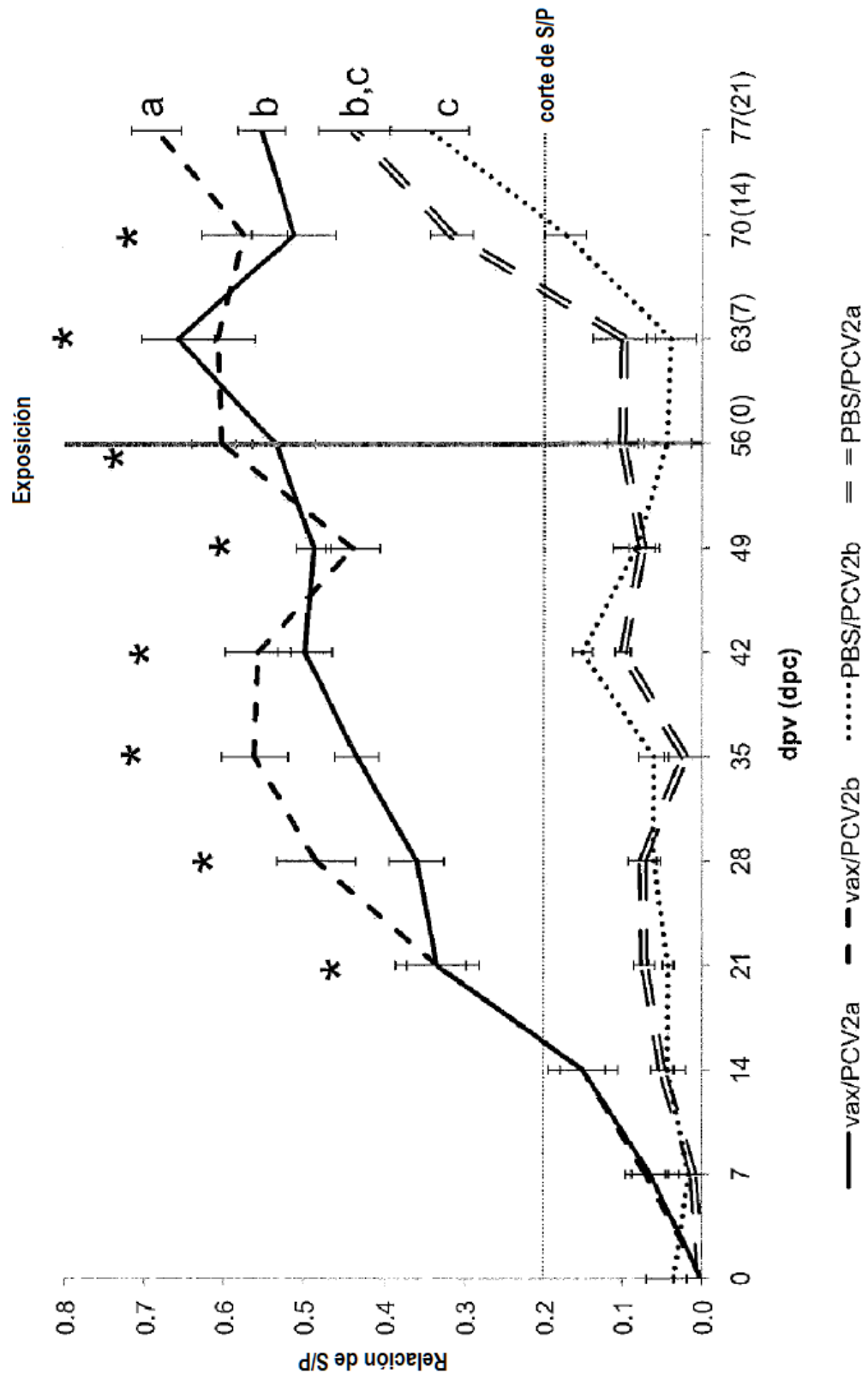
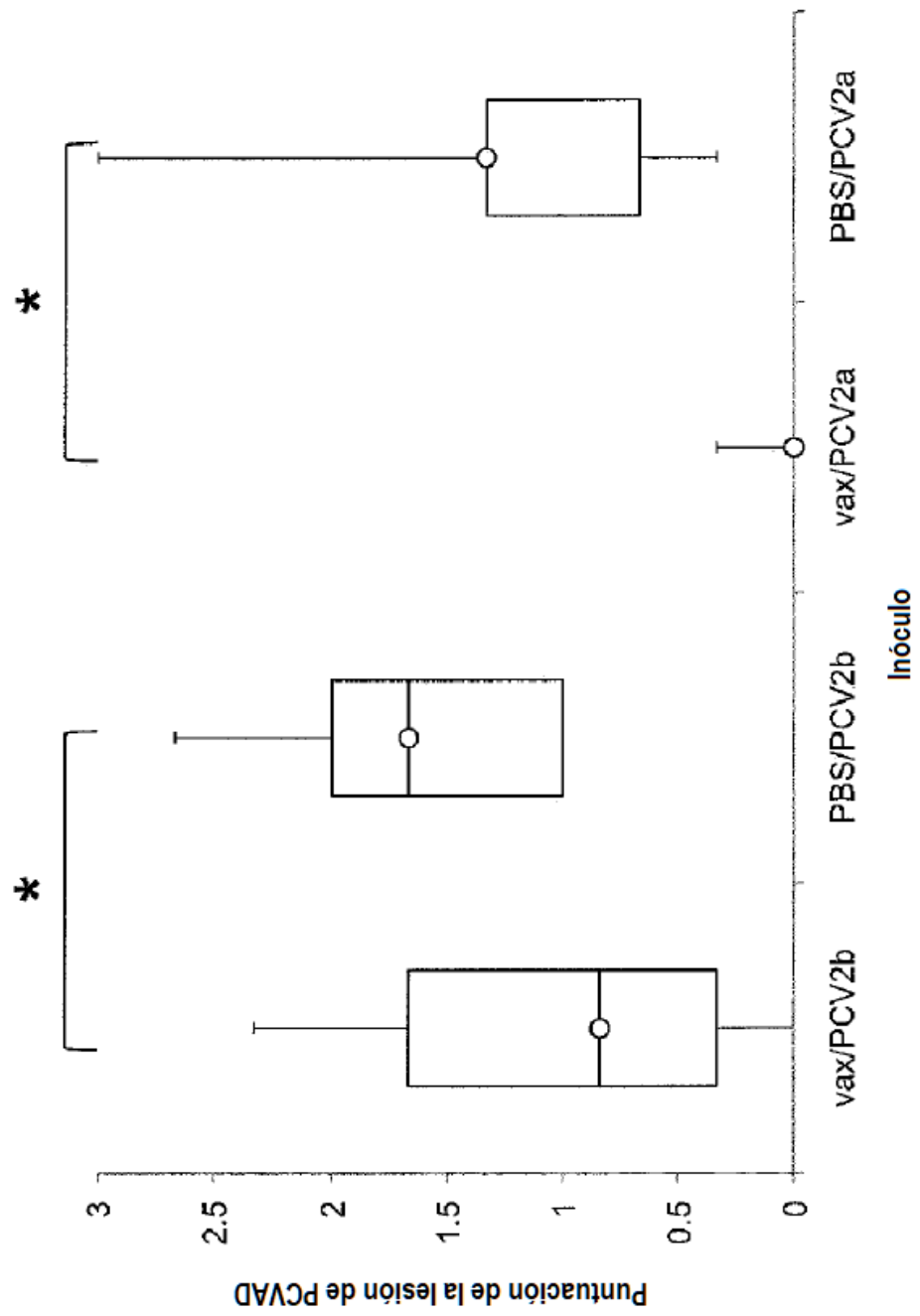


FIG. 6



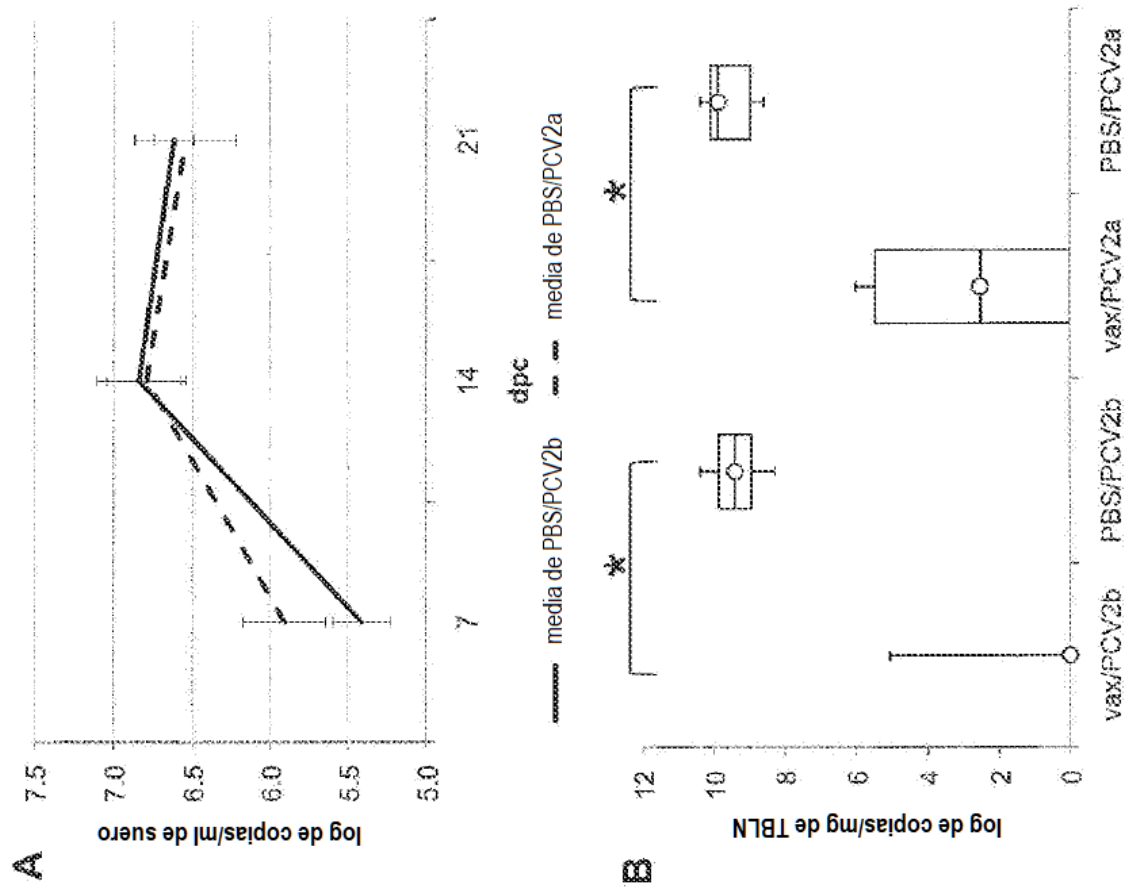


FIG. 7