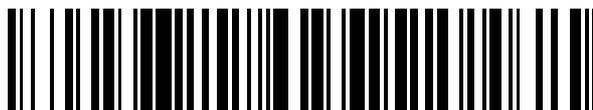


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 510**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)  
**C07K 14/01** (2006.01)  
**C12N 15/34** (2006.01)  
**A61P 31/20** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C07K 14/005** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/BR2014/000019**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14113855**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14742935 (1)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2949341**

54 Título: **Antígenos recombinantes del circovirus porcino 2 (PCV-2) para formulaciones de vacuna, kit de diagnóstico y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**25.01.2013 BR 102013001893**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.11.2020**

73 Titular/es:

**FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG (50.0%)  
 Rua Raul Pompeia nº 101 Bairro São Pedro Belo Horizonte  
 30330-080 Minas Gerais, BR y  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DE ALMEIDA, MÁRCIA ROGÉRIA;  
 JUNIOR, ABELARDO SILVA;  
 FIETTO, JULIANA LOPES RANGEL;  
 BRESSAN, GUSTAVO COSTA;  
 SALGADO, RAFAEL LOCATELLI;  
 ONOFRE, THIAGO SOUZA;  
 FAUSTO, MARIANA COSTA;  
 VIDIGAL, PEDRO MARCUS PEREIRA;  
 KALKS, STHEFANY PATARELI;  
 CRISPIM, JOSICELLI SOUZA;  
 ANDRADE TEIXEIRA, JACKSON DE;  
 AMAZILES SILVA LEITE, ROBERTA;  
 JAQUEL ZILCH, TIAGO;  
 LINO DE SOUZA, LUIZ FERNANDO;  
 DE MORAIS MONTEIRO, ANTÔNIO;  
 FIALHO GONZAGA, NATÁLIA y  
 DA CRUZ SOUZA, AMANDA MARTINS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 792 510 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

Antígenos recombinantes del circovirus porcino 2 (PCV-2) para formulaciones de vacuna, kit de diagnóstico y uso de los mismos

5

**Campo de la invención**

El primer objeto de esta solicitud de patente se refiere a la proteína recombinante purificada de la cápside del PCV-2 producida en *E. coli* como antígenos de vacuna y antígeno de diagnóstico. El segundo objeto de la patente se refiere a partículas pseudovíricas (VLP) del PCV2 producidas por *E. coli* como antígeno de vacuna o antígeno de diagnóstico. El tercer objeto de esta solicitud se refiere a una vacuna recombinante frente al PCV-2 que contiene antígenos de VLP purificados o recombinantes del PCV2 producido en *E. coli*, añadida a hidróxido de aluminio como adyuvante. El cuarto objeto de la solicitud de patente se refiere a un kit de ELISA de captura para la cuantificación de los antígenos de vacuna del PCV-2. Los antígenos de vacuna (objetos 1 y 2) y la vacuna (objeto 3) descritos en el presente documento pueden emplearse para la inmunización de un animal en programas de control de las enfermedades asociadas con el PCV-2 en sistemas convencionales de producción porcina, y representan alternativas a las vacunas disponibles en el mercado. El kit de ELISA (objeto 4) puede emplearse para un análisis de calidad en vacunas comerciales y/o experimentales contra el PCV-2. Estos productos mencionados anteriormente pueden usarse en el campo farmacéutico o veterinario.

10

15

20

**Estado de la técnica anterior**

En 1974 se identificó por primera vez el circovirus porcino (PCV) como un contaminante persistente presente en un cultivo de células de riñón de origen porcino. Sin embargo, este virus no se asoció a una patología en cerdos hasta finales de los 90. Era el síndrome consuntivo multisistémico posdestete (PMWS), que se describió por primera vez en Canadá. Debido a las diferencias genéticas e inmunológicas entre este nuevo PCV aislado en los animales con los síntomas de PMWS y los contaminantes de las células de laboratorio, estos dos virus se denominaron respectivamente circovirus *porcino-2* (PCV-2) y circovirus *porcino-1* (PCV -1) (Silva Junior, A., Carvalho, O.V., Bulos, L.H.S., Fietto, J.L.R., Moraes, M.P., Almeida, M.R. Porcine circovirus 2: immunopathogenesis and recent developments in vaccines; World journal vaccine, vol. 2, págs. 96-104, 2012).

25

30

Dado que el PCV-2 está asociado con un diferente conjunto de síndromes en cerdos, aparte del PMWS, el término *enfermedad asociada con el circovirus porcino* (PCVAD) fue introducido en 2006 por la American Association of Swine Veterinarians (AASV), para agrupar todos estos síndromes. Entre ellos se incluyen la enteritis, la insuficiencia reproductiva, la dermatitis y la nefropatía porcina, fundamentalmente en las fases de crecimiento y de finalización. Más recientemente, en 2011, se describió un nuevo síndrome caracterizado por un edema pulmonar agudo que afecta a los animales jóvenes y vacunados contra el PCV-2, que dio lugar a una tasa de mortalidad de aproximadamente el 20 % (Cino-Ozuna A.G., Henry S., Hesse, R., Nietfeld, J.C., Bai, J., Scott, H.M., Rowland, R.R.R. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 49, págs. 2012-2016, 2011). En la actualidad, el PCV-2 está distribuido por todo el mundo y las PCVAD son endémicas en la mayoría de los países productores.

35

40

No todos los animales infectados por el PCV-2 presentan los signos clínicos evidentes de estas enfermedades. Por lo tanto, para realizar un diagnóstico preciso, es necesario observar la presencia de signos clínicos compatibles y la presencia de lesiones microscópicas características, aparte de la detección del virus en el animal mediante técnicas de laboratorio tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una inmunohistoquímica (IHC) y entre otras (Silva Junior, A., Carvalho, O.V., Bulos, L.H.S., Fietto, J.L.R., Moraes, M.P., Almeida, M.R. Porcine circovirus 2: immunopathogenesis and recent developments in vaccines World journal vaccine, vol. 2, págs. 96-104, 2012).

45

50

Dado que los animales enfermos presentan normalmente linfopenia, son frecuentes las infecciones secundarias por patógenos oportunistas, lo que aumenta la importancia del control de las PCVAD. En este sentido, algunos estudios han sugerido que el desarrollo de una PCVAD está relacionado directamente con la interacción del virus, así como de otros agentes infecciosos oportunistas, con el sistema inmunitario del animal, lo que demuestra la naturaleza multifactorial de estas enfermedades (Silva Junior, A., Carvalho, O.V., Bulos, L.H.S., Fietto, J.L.R., Moraes, M.P., Almeida, M.R. Porcine circovirus 2: immunopathogenesis and recent developments in vaccines World journal vaccine, vol. 2, págs. 96-104, 2012).

55

El PCV-2 puede ser diseminado en el ambiente a través de las secreciones orales y nasales, las heces y la sangre. La transmisión del virus se produce por vía nasal, oral, fecal y el tracto urinario. La partícula vírica infecciosa es resistente a los factores físicos y químicos, y es capaz de soportar entornos ácidos (pH 3), la inactivación por calor (120 °C durante 30 minutos), la congelación y la exposición a luz ultravioleta. Los desinfectantes basados en monopersulfato de potasio, ácido peracético con peróxido de hidrógeno, compuestos que contienen sales de amonio cuaternario, hipoclorito de sodio o hidróxido de sodio, son eficaces en la reducción del número de partículas infecciosas. Por otro lado, los productos que contienen yodo o compuestos fenólicos no son capaces de reducir la infectividad del virus *in vitro*. Debido a la naturaleza multifactorial de las PCVAD, su control debería realizarse a través de una combinación de factores tales como una buenas prácticas de gestión recomendadas por los conocidos

60

65

"Madec's 20 points", la reducción del estrés del animal, reducir las mezclas de lotes, la adopción de espacios sanitarios, así como la vacunación y la vigilancia serológicas de la piara, han demostrado ser eficaces (Madec, F., Rose, N., Grasland, B., Cariolet, R., Jestin, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 55, págs. 273-283, 2008).

5 Desde la aparición de las PMWS y la confirmación del PCV-2 y su agente causal, los investigadores de todo el mundo se han dedicado a desarrollar formas de controlar esta enfermedad, especialmente a través de vacunas. Se han empleado numerosas estrategias con objeto de desarrollar inmunógenos. Entre ellas, vacunas con virus inactivados cultivados en cultivo celular, destacan las vacunas de ADN y las vacunas de subunidad que contienen la proteína de la cápside vírica producida en células de insecto modificadas (Silva Junior, A., Carvalho, O.V., Bulos, L.H.S., Fietto, J.L.R., Moraes, M.P., Almeida, M.R. Porcine circovirus 2: immunopathogenesis and recent developments in vaccines *World journal vaccine*, vol. 2, págs. 96-104, 2012).

15 La proteína estructural de la cápside del *circovirus*, SEQ ID NO: 04, está codificada por el ORF2, SEQ ID NO: 03, y tiene una masa molecular aproximada de 28 kDa y un punto isoeléctrico (PI) teórico de aproximadamente 10,7. Al interactuar específicamente con los receptores de la superficie celular, es la proteína más relevante implicada en la respuesta inmunitaria del hospedador. Tiene una señal de localización nuclear en su porción amino terminal (primeros 41 residuos de aminoácidos) con un gran número de residuos de aminoácidos con carga positiva, donde aproximadamente el 40 % son residuos de arginina. Algunos estudios han demostrado que la presencia de tres epítopos inmunógenos de la proteína de la cápside del PCV-2 son capaces de generar anticuerpos neutralizantes. Éstos comprenden las secuencias de aminoácidos 47 a 57, desde el 165 hasta el 200, y los cuatro últimos residuos de aminoácidos del C terminal (Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Marsh, P.S., Thangthumnyom, N., Wajjwalku, W., Meng, X.J. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of Virology*, Vol. 78, págs. 8135-8145, 2004).

25 La proteína de la cápside vírica del PCV-2 fue producida por primera vez en *Escherichia coli* en 2001 por Liu y colaboradores en forma de una cadena polipeptídica fusionada con la proteína de unión a la maltosa (MBP) y una cola de histidina - (MBP)-His8 (Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*, vol. 285, págs. 91-99, 2001). Esta proteína recombinante purificada mediante cromatografía de afinidad reaccionaba específicamente tanto con los sueros policlonales de conejos previamente inmunizados con el PCV-2 como con los sueros de cerdos infectados por el virus.

30 Existe una dificultad para expresar grandes cantidades de la proteína de la cápside del PCV-2 en células de *Escherichia coli* debido a la gran cantidad de residuo de arginina en la señal de localización nuclear y a la presencia de otros residuos de aminoácidos sintetizados a partir de codones raros de este organismo. Otra forma de sortear el problema de la baja expresión de la proteína de la cápside del PCV-2 es usar cepas bacterianas que sobre expresan los ARNt de los codones raros, tales como el codon-plus-DE3-RIL BL21. La ventaja es que se conservan todos los residuos de aminoácidos de la proteína (se conserva la estructura primaria), lo que asegura la posibilidad de generar anticuerpos producidos a partir de los epítopos presentes en la región de la señal de localización nuclear. Sin embargo, para la expresión pueden usarse otros sistemas bacterianos comercializados o desarrollados por compañías.

45 En la actualidad, la expresión recombinante de la Cap-PCV-2 se realiza, fundamentalmente, en dos sistemas: el primero usa células de insecto infectadas con baculovirus recombinante, mientras que el otro consiste en la inducción de la proteína recombinante en sistemas bacterianos transformados. En este último, el sistema de expresión está sometido normalmente al control del operador *lac*, de forma que su inducción se realiza normalmente mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio de crecimiento. Sin embargo, diversas compañías comercializan numerosos vectores para la expresión en sistemas bacterianos. Por lo tanto, también pueden usarse otros promotores, homólogos o heterólogos, como promotores sometidos a una modulación por arabinosa. Las partículas pseudovíricas (VLP) son proteínas estructurales de la cápside vírica, que están dispuestas en una estructura similar a la partícula vírica natural formando una cápside que carece de material genético en su interior. Estas partículas no infecciosas tienen una elevada inmunogenicidad debido a que presentan la forma estructural de viriones (partícula infecciosa vírica). Por lo tanto, el uso de las VLP en las vacunas recombinantes aumenta la eficacia de dichas vacunas al estimular el sistema inmunitario de una forma similar a la de la partícula vírica natural. Se ha demostrado la capacidad de formación de las VLP mediante la proteína de la cápside del PCV-2 tanto en sistemas de expresión eucariotas (Bucarey S.A., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Saenz, L. Zuniga, A. Tobar, J.A. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine*, vol. 27, págs. 5781-5790, 2009) como en sistemas procariotas (Lou, Z.Z., Li, Z.Y., Wang, G., Li, J.Q., Lan, X., Li, X.R., Yin, X.P., Liu, J.X., Liu S.D. Prokaryotic expression and potential application of the truncated PCV-2 capsid protein. *Virological Sinica*, vol. 25, págs. 86-97, 2010).

65 La técnica usada en la presente invención usa un sistema bacteriano. éste es capaz de generar cantidades de antígeno en el intervalo de entre decenas y cientos de miligramos por litro de medio inducido en unas pocas horas de inducción. Sin embargo, el sistema de expresión en células de insecto requiere días para producir lo mismo. Otra ventaja es los costes asociados con su producción. El sistema bacteriano usa un medio de inducción más barato que

el de las células de insecto. No obstante, los sistemas que emplean células de insecto no requieren etapas posteriores desde la expresión para la concentración y la purificación del antígeno. Sin embargo, en la presente invención, los antígenos recombinantes se recubren por medio de técnicas más baratas para su uso posterior.

5 Otro posible inconveniente del sistema bacteriano es la ausencia de modificaciones postraduccionales en la proteína de la cápside, cuando es un sistema procariota. Sin embargo, la presente invención demuestra que la proteína de la cápside vírica, cuando es expresada en un sistema bacteriano, es capaz de autoensamblarse y promover la generación de VLP no infecciosas con un tamaño y una forma similares a los de las partículas víricas naturales, de forma similar a lo que se observa para la expresión en sistemas eucariotas.

10 Otra dificultad que se encuentra la producción de un compuesto de vacuna que contiene la proteína de la cápside vírica del PCV-2 es la cuantificación en la formulación de vacuna. Las vacunas recombinantes comercializadas normalmente usan la tecnología de cuantificación mediante densitometría en gel de poliacrilamida, usando como referencia una proteína patrón tal como la albúmina sérica bovina (BSA). En esta solicitud, se hace uso de los anticuerpos anti-PCV-2 para cuantificar la proteína inmunógena. Dichos anticuerpos interactúan específicamente con la proteína de la cápside del PCV-2 presente en una muestra en particular, y debido al marcador específico del anticuerpo, se produce la generación de una señal (color, radioactividad, etc.) proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Por lo tanto, la cuantificación se produce tras la lectura de esta señal producida y por medio de una comparación con una muestra que contiene la proteína recombinante purificada.

20 En la bibliografía se describen numerosos potenciadores de las respuestas inmunitarias y, según la presente invención, pueden usarse junto con las formulaciones descritas en el presente documento. Se prefieren los adyuvantes acuosos, tales como hidróxido de aluminio o polímeros de carbono, tales como carboximetil celulosa, debido a que generan menos inflamación y dolor que los adyuvantes oleosos.

25 Los compuesto de vacuna desarrollados en la presente invención pueden ser administrados por cualquiera de las vías descritas en la bibliografía, preferentemente, intramuscularmente.

30 En la búsqueda realizada en bancos de patentes, se encontraron documentos de patentes en el área de los procesos para la producción de inmunógenos en cerdos, sin embargo, ninguna de estas patentes usa productos o procesos relacionados con el objeto de esta patente. En esta investigación, se encontró el documento de patente PI 0412855-9 del 07/26/2004, titulado VACCINE FORMULATIONS, que se refiere a "una nueva emulsión de aceite-agua con una estabilidad aumentada en presencia de suspensiones bacterianas o víricas, especialmente aquellas que están concentradas y no purificadas o poco purificadas", en donde se describe una solución que contiene el PCV-2 inactivado. El objeto de la presente solicitud de patente es diferente al de la patente descrita debido a que se centra en el uso de la proteína recombinante producida en un sistema bacteriano, además de proponer nuevos procedimientos específicos para la recuperación y la cuantificación de este antígeno.

40 Otra solicitud encontrada era una con el número BRPI0615862-5 del 09/08/2006, titulada VACCINE PCV-2, AND, METHOD FOR MANUFACTURING A VACCINE, que es "a vaccine against porcine *circovirus* (PCV-2) and a method for manufacturing such a vaccine to protect swine against infection with PCV", en la que los inventores han desarrollado un proceso para la producción de antígenos recombinantes, preferentemente en un sistema eucariota (células de insecto) con objeto de sortear el problema de la baja recuperación de las partículas en las células cultivadas. De forma similar a esta patente, el 29 de diciembre de 2005, se presentó la Patente de EE.UU. 770.028 en la base de datos de patentes de EE.UU., que tiene el título: "PCV2 immunogenic compositions and methods of producing such compositions", que describe un método para mejorar la recuperación de la proteína recombinante de la cápside del PCV-2 en el sobrenadante de las células inducidas, comenzando aproximadamente 5 días después de la infección. Por el contrario, la presente invención proporciona la producción de entre decenas y cientos de miligramos de proteínas en unas pocas horas de inducción, después de la lisis y la recuperación de la proteína recombinante.

55 Otro depósito encontrado en la base de datos de patentes de EE.UU. es el documento S 8008001, del 11 de diciembre de 2009, titulada "PCV-2 VACCINE" which deals with a vaccine and a method to protect piglets against PCV-2 infection by administering a vaccine containing at least 20 microgram/dose of capsid protein of the PCV-2. Dicha patente divulga el uso preferido del sistema de expresión eucariota (células de insecto a las que se les ha inoculado un baculovirus recombinante). Este sistema difiere del propuesto en la presente invención, como se describe en el presente documento, es el uso de sistemas bacterianos, con nuevos métodos para la recuperación y cuantificación del antígeno.

60 En la base datos de patentes EE.UU. también se encontró la patente US 6287856 del 03/12/1999, titulada "Vaccines against *circovirus* infections", que trata de composiciones de vacuna que son protectoras frente a infecciones por el PCV. Se basan en un vector de ácidos nucleicos que contiene la secuencia codificante de un polipéptido del PCV, donde el ácido nucleico carece de un origen de replicación vírico, por lo tanto son relativas a vacunas de ADN, distintas a las de la presente solicitud, que produce el antígeno en *E. coli*.

65 El primer objeto de esta solicitud de patente es la proteína recombinante de la cápside del PCV-2 purificada

producida en una *E. coli* como antígeno de vacuna y antígeno diagnóstico. El segundo objeto de la patente son las partículas pseudovíricas (VLP) del PCV2 producidas por la *E. coli* genomodificada como un antígeno de vacuna. Ambos objetos pueden usarse en programas de control y prevención de infecciones causadas por el PCV-2. El tercer objeto de esta solicitud es una vacuna recombinante contra el PCV-2 que contiene antígeno purificado de PCV2 o VLP recombinantes, o sus variantes producidas en *E. coli* genomodificada con la adición de hidróxido de aluminio como adyuvante. Que también pueden usarse en programas de control y prevención de infecciones causadas por el PCV-2.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un kit de ELISA de captura por medio de la proteína recombinante producida para una cuantificación adicional en formulaciones de vacuna. Esta técnica tiene como ventajas principales su facilidad ejecución y de automatización, precisión, adaptabilidad y bajo coste. Además, la principal ventaja del ELISA de captura propuesto es que no es necesario purificar las muestras ni analizar altas concentraciones, dado que el antígeno está fijado por anticuerpos específicos, haciendo que esta conexión sea proporcional a la concentración de estas proteínas, dando como resultado una mayor reproducibilidad en los resultados cuando se requiere una cuantificación. Pueden detectarse unas cantidades muy bajas, tales como de 50 microgramos de proteína, cuando se diluye con un litro de solución. Por lo tanto, debido a sus beneficios y capacidades, este ensayo se presenta como un importante candidato para ser usado como una referencia en los análisis de seguridad y en los ensayos de dosis-respuesta, para verificar la potencia de la vacuna requerida para la liberación de diferentes vacunas comerciales, adaptado según sea necesario.

El desarrollo de compuestos inmunógenos capaces de generar protección frente a la infección del PCV-2 ha sido una investigación dirigida dentro de la estructura general del control de investigación de las PCVAD. La proteína recombinante de la cápside del PCV-2, producida en un sistema bacteriano y recuperada de la forma descrita anteriormente, destaca como un inmunógeno potencial.

El documento WO 2010/061000 A1 divulga la secuencia de una proteína PCV2B a partir de una cepa específica como PCV2B-RM en la Figura 6. Dicha proteína PCV2B se divulga en el contexto de vacunación en el ejemplo 6. Parece, sin embargo, que las puntuaciones de inmunoquímica proporcionadas en dicho ejemplo apenas tienen relevancia estadística.

Adicionalmente, la sustitución de las laboriosas técnicas para la detección y la cuantificación del PCV-2 como método diagnóstico es algo interesante para la industria diagnóstica veterinaria. Por lo tanto, la inversión en la producción y la recuperación de los antígenos recombinantes divulgados en el presente documento para la producción de compuestos objetivo con fines diagnósticos y de vacuna, así como para otras aplicaciones, es muy prometedora.

### Descripción de los dibujos

La Figura 01 muestra el análisis en gel de agarosa al 1 % de los productos de la PCR. M: marcador de escalera de ADN de 100 pb; 1, 2, 3 y 4: ADN correspondiente al ORF2 del PCV-2 amplificado; C-: control negativo (ADN extraído de células SK6 exentas de PCV-2).

La Figura 02 muestra el análisis en gel de agarosa al 1 % de las reacciones de escisión de los plásmidos con *EcoRI*, mostrando las bandas de 400 y 316 pb de la escisión del ORF2. M: marcador de escalera de ADN de 100 pb; 1.1, 1.2, 1.4, 1.6 y 1.8: colonias de color blanco elegidas al azar; 1.9, 1.10 y 1.11: control negativo (colonias de color azul).

La Figura 03 muestra el análisis en gel de agarosa al 1 % de las reacciones de escisión del plásmido recombinante pCap-PCV2 con *EcoRI* (canal 1) y con *XbaI* (canal 2). M: marcador de escalera de ADN de 100 pb.

La Figura 04 muestra la confirmación de la expresión de la rCap-PCV-2. Gel de SDS-PAGE al 15 % (izquierda) y membrana de nitrocelulosa obtenida mediante una inmunoelectrotransferencia (derecha). M: marcador de peso molecular; C-: control negativo (fracción soluble de extracto de *E. coli* transformado con el plásmido de expresión bacteriana vacío e inducida con IPTG); y 2: muestra (fracción soluble de extracto de *E. coli* transformado con la pCap-rPCV2 e inducida con IPTG). La flecha indica la banda de aproximadamente 30 kDa correspondiente a la rCap-PCV-2.

La Figura 05 muestra el perfil proteico obtenido durante el proceso de purificación a partir de la fracción soluble. M: marcador de peso molecular; 1: fracción soluble de extracto de *E. coli* inducida; 2: volumen no interactivo; 3: lavar con tampón de dilución al 10 %; 4: Lavar con tampón de dilución al 20 %; 5: elución con tampón de elución al 100 %. La flecha indica la rCap-PCV-2 purificada.

La Figura 06 muestra el perfil proteico de las fracciones resultantes del proceso de precipitación de la fracción soluble con diferentes niveles de saturación con sulfato de amonio. M: marcador de peso molecular; 1: fracción soluble, 2: Fracción del 0-20 %, 3: Fracción del 20-40 %, 4: Fracción del 40-60 %, 5: Fracción del 60-80 %, 6: rCap purificada. La flecha indica la rCap-PCV-2.

Las Figuras 07A, B y C muestran micrografías electrónicas: formación de partículas pseudovíricas (VLP) mediante la rCap-PCV-2. Aumento de 140.000X (A y B). Aumento de 250.000X (C). Las muestras se analizaron con el microscopio electrónico de transmisión, usándose rejillas de malla de 200 cubiertas con formvar/carbono. Las VLP pueden visualizarse por las flechas.

La Figura 08 muestra las diluciones de la muestra: rCap-PCV-2: diluciones desde 10 mg/l hasta 0,004883 mg/l.

Vacuna experimental: dilución desde 1:50 hasta 1:103.200. Lisado de *E. coli* negativo: diluciones desde 1:50 hasta 1:103.200. La ecuación obtenida es  $y = 0,875x + 0,196$  ( $R^2 = 0,996$ ), donde  $y$  es la DO a 492 nm, y  $x$  es la concentración de la proteína que se va a detectar.

La Figura 09 muestra la respuesta humoral r específica inducida por la rCap-PCV-2 en ratones antes y después de la vacunación medida mediante un ELISA indirecto. A los animales se les inocularon los días 0 y 14, y fueron expuestos el día 35. Los animales a los que se les inoculó la vacuna experimental mostraron unas cantidades significativas de anticuerpos, especialmente después de la segunda inoculación.

La Figura 10 muestra la evaluación de la viremia de los animales vacunados con la vacuna comercial 1 en el momento del muestreo. En el eje vertical se muestra la carga vírica, en el eje horizontal se muestran las 4 etapas de recolección: a los 21, 63, 105 y 154 días de edad del cerdo. La regresión lineal está representada por la fórmula  $y = 5E + 10e^{0,1847x}$ . No hubo ninguna reducción significativa en la carga vírica durante el periodo posterior a la vacunación ( $R^2 = 0,1195$ ).

La Figura 11 muestra la evaluación de la viremia de los animales vacunados con la vacuna comercial en dos momentos de muestreo. En el eje vertical se muestra la carga vírica, en el eje horizontal se muestran las 4 etapas de recolección: a los 21, 63, 105 y 154 días de edad del cerdo. La regresión lineal está representada por la fórmula  $y = 2E + 13e^{-1,323x}$ . No hubo ninguna reducción significativa en la carga vírica durante periodo posterior a la vacunación ( $R^2 = 0,5703$ ).

La Figura 12 muestra la evaluación de la viremia en los momentos de recolección de los animales vacunados con la vacuna experimental con una dosis a una concentración de 50 pg. En el eje vertical se muestra la carga vírica, en el eje horizontal se muestran las 4 etapas de recolección: a los 21, 63, 105 y 154 días de edad del cerdo. La regresión lineal está representada por la fórmula  $y = 2E + 12e^{-0,166x}$ . Hubo una reducción significativa en la carga vírica durante el periodo posterior a la vacunación ( $R^2 = 0,9696$ ).

La Figura 13 muestra la evaluación de la viremia en los momentos de recolección de los animales vacunados con la vacuna experimental con dos dosis a una concentración de 50 µg. En el eje vertical se muestra la carga vírica, en el eje horizontal se muestran las 4 etapas de recolección: a los 21, 63, 105 y 154 días de edad del cerdo. La regresión lineal está representada por la fórmula  $y = 1E + 12e^{-0,79x}$ . Hubo una reducción significativa en la carga vírica durante el periodo posterior a la vacunación ( $R^2 = 0,9418$ ).

La Figura 14 muestra la evaluación de la viremia en los momentos de recolección de los animales vacunados con la vacuna experimental con una concentración de dosis de 150 µg. En el eje vertical se muestra la carga vírica, en el eje horizontal se muestran las 4 etapas de recolección: a los 21, 63, 105 y 154 días de edad del cerdo. La regresión lineal está representada por la fórmula  $y = 2E + 17e^{-4,106x}$ . No hubo ninguna reducción significativa en la carga vírica durante el periodo posterior a la vacunación ( $R^2 = 0,7912$ ).

La Figura 15 muestra la evaluación de la viremia en los momentos de recolección de los animales vacunados con la vacuna experimental con dos dosis a una concentración de 150 µg. En el eje vertical se muestra la carga vírica, en el eje horizontal se muestran las 4 etapas de recolección: a los 21, 63, 105 y 154 días de edad del cerdo. La regresión lineal está representada por la fórmula  $y = 4E + 13e^{-1,594x}$ . No hubo ninguna reducción significativa en la carga vírica durante el periodo posterior a la vacunación ( $R^2 = 0,6673$ ).

La Figura 16 muestra la evaluación de la viremia en los momentos de recolección de los animales no vacunados (control negativo). En el eje vertical se muestra la carga vírica, en el eje horizontal se muestran las 4 etapas de recolección: a los 21, 63, 105 y 154 días de edad del cerdo. La regresión lineal está representada por la fórmula  $y = 2E + 13e^{-1,304x}$ . No hubo ninguna reducción significativa en la carga vírica durante el periodo posterior a la vacunación ( $R^2 = 0,7425$ ).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un antígeno recombinante del circovirus porcino 2 (PCV-2) según la reivindicación 1, a partículas pseudovíricas (VLP) como se define en la reivindicación 2, a formulaciones de vacuna como se define en la reivindicación 3, a un kit de diagnóstico de Elisa de captura como se define en la reivindicación 4, al uso de los antígenos y de las VLP según la presente invención para la producción de kits de diagnóstico como se define en la reivindicación 5, a antígenos y VLP según la presente invención para su uso como una vacuna como se define en la reivindicación 6, a formulaciones de vacuna para su uso en la generación de protección frente a la infección por el PCV-2 como se define en la reivindicación 7 y al uso de un kit de diagnóstico según la presente invención para la cuantificación *in vitro* de la proteína de la cápside del PCV-2 como se define en la reivindicación 8.

### Aislamiento y clonación de la región codificante de la proteína de la cápside del circovirus porcino

El ADN del porcino *circovirus* 2 (PCV-2) usado en la amplificación de la región codificante de la proteína de la cápside (ORF2), SEQ ID NO: 03, se aisló a partir de muestras tisulares porcinas afectadas por el PCV-2, de la región Ponte Nova, MG. El ORF2 se amplificó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el oligonucleótido directo 5'-CGCCATATGACGTATCCAAGGAGG-3' (directo), que inserta un sitio de restricción para la enzima *NdeI* en un extremo 5', y el oligonucleótido inverso 5'-CCCTCGAGTTAGGGTTAAGTGGG-3' (inverso), que crea un sitio para *XhoI* en el extremo de la región codificante. Estos oligonucleótidos se construyeron a partir de la secuencia del genoma de la cepa clínica brasileña del PCV-2 (DQ364650) depositada en el GenBank. La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó en un termociclador usando polimerasa Taq de ADN a 5 U/µl. Las muestras amplificadas se almacenaron a -4 °C y se analizaron mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1 %. El fragmento de ADN de 716 pb se evidenció en

el gel con 0,4 g/ml de bromuro de etidio, bajo luz ultravioleta, como se muestra en la Figura 01.

5 El producto de la PCR se purificó en gel de agarosa. Después, el ORF2 del PCV-2 purificado se clonó en un vector de amplificación (pGEM®-T Easy Vector System-PROMEGA). La mezcla de unión obtenida, según indicaba el fabricante del kit, se añadió a aproximadamente 100 µl de una solución que contiene bacterias *E. coli* DH5α, hechas competentes de antemano (Sambrook J., Russell, D.W., Molecular Cloning: A laboratory manual. 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y se llevó a cabo una incubación en hielo durante 30 min. Después, la mezcla de células y de ADN de plásmido se sometió a un choque térmico en un baño de agua a 42 °C durante 1 minuto, y de nuevo en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 900 µl de LB-Net (1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl; pH 7,5) sin antibiótico y las células se incubaron a 37 °C durante 2 horas a 250 rpm en un agitador orbital. Esta mezcla se colocó en placas en medio sólido de LB-agar (1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl, 1,5 % de agar Select; a pH 7,5) que contiene ampicilina (entre 5 y 10 mg/ml) y se incubaron durante entre 12 y 14 h a 37 °C.

15 Se recuperaron los clones resistentes a la ampicilina y se usaron para confirmar la presencia del plásmido que contiene el gen de interés por medio de una PCR y un ensayo enzimático del plásmido extraído mediante minipreparaciones de plásmido (Sambrook J., Russell, D.W., Molecular Cloning: A laboratory manual. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001). El ensayo enzimático se realizó con la enzima de restricción *EcoRI* y la posterior reacción de escisión analizada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 02). La PCR de la colonia se realizó de la misma forma que la PCR descrita anteriormente, sin embargo, en lugar del ADN genómico de los tejidos infectados, se añadió una alícuota de las colonias transformantes con la ayuda de bastoncillos estériles. Los productos de la PCR también se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

25 Las muestras de plásmido obtenidas que contenían el ADN vírico, confirmadas mediante el ensayo enzimático y la PCR de la colonia, se purificaron usando un kit de purificación del producto de la PCR y después se enviaron al Genomics Laboratory, BIOAGRO/UFV para la posterior secuenciación, para confirmar el correcto ensamblaje del vector. Las reacciones de secuenciación se basaban en la técnica de terminación de la cadena mediante didesoxinucleótidos (ddNTP) (Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 74, págs. 5463-5467, 1977). Las secuencias generadas se editaron y se ensamblaron en "cóntigos" usando programas de bioinformática y, posteriormente, se compararon entre sí, y tienen las secuencias depositadas en el GenBank usando el programa informático BLAST. La secuencia traducida del ORF2 se describe en SEQ ID NO: 04. Los clones que contienen la construcción se almacenaron en medio LB-Net en tubos de microcentrifuga con glicerol al 20 % y se almacenaron a -80 °C.

35 Transferencia de la región codificante de la proteína de la cápside del *circovirus* porcino 2 al vector de expresión del sistema bacteriano

40 Después de comprobar la secuencia correcta del inserto en el vector, la muestra de ADN del plásmido pCapPCV-2, SEQ ID NO: 03, (vector de amplificación) se sometió a un ensayo enzimático donde se usaron sitios de restricción específicos para insertar el gen del ORF2 en el vector de expresión bacteriano (pET-16b - Novagen), que está controlado por el promotor lac T7 y tiene una secuencia que codifica una cola de 10 histidinas en el N terminal (usada para la purificación por afinidad con resina que contiene níquel). La secuencia del ORF2 de la pCapPCV-2 se digirió con *NdeI* y *XhoI*, así como el vector de expresión bacteriano. Después de la escisión, los productos (el vector de expresión bacteriano digerido y el inserto de ORF2 eliminado del vector de amplificación) se unieron usando una enzima ligasa T4 de ADN. Después se usó una reacción de unión para transformar la *E. coli* DH5α; como se ha descrito anteriormente. Los clones transformantes se seleccionaron aleatoriamente a partir de las colonias para identificar los plásmidos con el inserto. Para confirmar la clonación, se realizaron PCR de colonias que demostraban que el trabajo de clonación dirigida como se esperaba para los dos grupos de colonias elegidas aleatoriamente, dando lugar a un fragmento de 716 pb. Se seleccionaron las colonias positivas, y cada colonia se sometió por separado a una PCR. Para la colonia que presentaba el plásmido recombinante con el tamaño aproximado de 716 pb, se llevaron a cabo reacciones de escisión del plásmido PCAP-RPCV-2, SEQ ID NO: 01, para confirmar su correcta orientación. Por lo tanto, se observaron los tamaños de banda esperados de 718 pb y 472 pb a partir de la digestión con *EcoRI* y *XbaI*, respectivamente, y un alto peso molecular correspondiente al resto del fragmento del plásmido (Figura 03). Los plásmidos se recombinantes obtenidos se denominaron PCAP-rPCV2 y se almacenaron en tubos de microcentrifuga que contienen entre un 15 y un 30 % de glicerol, y se almacenaron a -70 °C.

55 Expresión de la proteína recombinante de la cápside del *circovirus* porcino 2 y análisis en gel de SDS-PAGE

60 La expresión completa de las proteínas recombinantes se realizó a media escala en 1000 ml de TB (12 g/l de triptona, 24 g/l de extracto de levadura, 4 ml de glicerol, 2,31 g/l de fosfato de potasio monobásico y 12,54 g/l de fosfato de potasio dibásico). Para ello, las bacterias competentes, de la cepa BL21-DE3-RIL codon plus de *E. coli*, se transformaron con las construcciones PCAP-rPCV2, de una forma análoga a la realizada con el vector de amplificación. Por lo tanto, se añadieron aproximadamente 20 nanogramos de plásmido recombinante PCAP-rPCV2 a 100 l de células competentes y la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Después, la mezcla de células y de ADN de plásmido se sometió a un choque térmico en un baño de agua a 42 °C durante 1 minuto, y de nuevo en

- hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 900 µl de medio LB (10 g/l de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de cloruro sódico) sin antibiótico, y las células se incubaron a 37 °C durante 2 horas 250 rpm. Las células se diluyeron cien veces (1:100) en medio LB que contiene 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C y 200 rpm durante 12 horas (pre-inoculación). También se realizó un cultivo de control negativo (bacterias BL21 no transformadas) en LB-Net, a pH 7,0, 17 µg/ml de cloranfenicol. Después, las células se diluyeron a 1:100 en medio líquido TB, a pH 7,0, con 100 µg/ml de ampicilina y el cultivo se cultivó a 30 °C/250 rpm durante aproximadamente 3 horas hasta que se alcanzó la densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de 0,6-0,8. Se realizó el mismo procedimiento para el control negativo usando 17 µg/ml de cloranfenicol. Después de alcanzar la DO, se transfirieron alícuotas del cultivo a tubos nuevos, donde se realizaron inducciones durante 1, 2, 3, 4 y 5 horas para conocer el mejor tiempo de inducción. Las concentraciones de IPTG analizadas eran 0,1; 0,5 y 1 mM, y las temperaturas usadas eran 30 °C y 37 °C, siempre con una agitación vigorosa y una aireación suficiente. Con el control negativo, se llevó a cabo el mismo procedimiento. Se recogieron muestras de 1 ml en cada condición, se centrifugaron a 10.000 x g durante 1 min, se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se almacenó a -20 °C para un análisis mediante SDS-PAGE.
- 15 Para la purificación, se observó el mejor tiempo de producción (4 horas), temperatura (30 °C) y concentraciones de IPTG (0,25 mM) durante la inducción, y, por lo tanto, se indujo 1 litro de colonias en cultivo que contienen el plásmido recombinante pCap-rPCV2. Después de la inducción a las condiciones óptimas, la muestra se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento celular se almacenó a -20 °C.
- 20 El precipitado resultante de un volumen de 100 ml del medio inducido se descongeló y se resuspendió en tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 300 mM, imidazol 5 mM, a pH 8,0) hasta un volumen final de aproximadamente 2,5 ml. A este tampón se añadió lisozima a 1 mg/ml y después la muestra se incubó a 0 °C durante 30 min. El proceso de lisis celular se realizó con 6 ciclos de ultrasonidos de 10 s a 200-300 vatios cada uno, con intervalos de 10 s y los tubos en hielo para impedir el calentamiento de la muestra. Los residuos celulares y los cuerpos de inclusión se precipitaron mediante una centrifugación a 15.000 x g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante (fracción soluble) se recogió en un tubo nuevo y se usó para la purificación de la proteína recombinante de la cápside del PCV-2, denominada rCap-PCV-2 (SEQ ID NO: 02).
- 25 Las muestras (incluyendo los controles negativos) se analizaron en un gel de poliacrilamida al 15 % (Sambrook J., Russell D.W., Molecular Cloning: A laboratory manual. 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001). Después del análisis, el gel se reveló mediante una solución de tinción (azul brillante de Coomassie R-250 al 0,1 %, ácido acético al 9 %, etanol al 45 %). El análisis por electroforesis confirmó la presencia de una banda de aproximadamente 30 kDa presente en la muestra inducida. Esta masa se corresponde con la proteína codificada por el ORF2 del PCV-2 añadida a la cola de histidina. La confirmación de la expresión se llevó a cabo a través de la técnica de inmunoelectrotransferencia (Figura 04).
- 30
- 35

#### Purificación de la proteína recombinante de la cápside del *circovirus* porcino 2 y análisis en gel de SDS-PAGE

- 40 La proteína recombinante de la cápside vírica del PCV-2 se purificó a partir de la fracción soluble por medio de una cromatografía de afinidad en resina de níquel inmovilizada sobre agarosa. La técnica usada era la "cromatografía de líquidos de rendimiento rápido" (FPLC), con una columna cromatográfica cargada con níquel para la purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a las colas de histidina. La purificación se estandarizó por medio de numerosos parámetros del análisis como: el flujo lineal, los volúmenes de lavado y de dilución, y las concentraciones de imidazol y de urea. Después de la purificación, la solución que contenía la proteína se dializó tres veces en 50 volúmenes de tampón de carbonato 50 mM a pH 7,2 que contiene NaCl 300 mM en un total de nueve horas (diálisis de tres horas). Las muestras de todas las etapas de purificación se analizaron en un gel de poliacrilamida al 15 % como se ha descrito previamente. La proteína se purificó con éxito, y puede observarse en la Figura 05.
- 45

#### Estimación de la concentración de rCap-PCV-2

- 50 La cantidad de proteína recombinante de la cápside vírica del PCV-2 purificada y dializada puede determinarse usando el método descrito por Bradford (Bradford, M.M., 1976, Un método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína que utiliza el Principio de unión de proteína-colorante. *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, págs. 248-254, 1976). El cálculo se realiza mediante una regresión lineal, donde se obtuvo la ecuación  $y = 0,3267 + 0,0108x$  a partir del mejor ajuste a los valores de la densidad óptica para las diluciones analizadas de BSA.
- 55

#### Recuperación de la proteína recombinante de la cápside del *circovirus* porcino 2 mediante una precipitación con sulfato de amonio, y preparación del compuesto de vacuna, y verificación de la formación de las partículas seudovíricas (VLP)

- 60 Para ello, a la fracción soluble que contiene la rCap-PCV-2 se añadió una cantidad de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suficiente para una saturación del 20 % (a 0°) y, posteriormente, la muestra se incubó en hielo, a 100 rpm durante 30 minutos. A continuación, el extracto de proteína se centrifugó a 15.000 x g durante 20 minutos a 0 °C. Al final de la centrifugación, se recogió el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el mismo volumen de tampón de carbonato a pH 7,0 que contiene NaCl 300 mM (fracción proteica de sulfato de amonio del 0-20 %). Al sobrenadante
- 65

se añadió una cantidad de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suficiente para una saturación al 40 %, partiendo de una saturación inicial del 20 % de esta solución salina. Después, se repitieron las etapas de incubación y de agitación en hielo para obtener fracciones de sulfato de amonio con una saturación del 20-40 %, del 40-60 % y del 60-80 %. Las fracciones se dializaron en tampón de carbonato a pH 7,0 que contiene NaCl 300 mM y después se almacenaron a 4 °C durante, como máximo, dos días, para ser analizadas mediante una SDS-PAGE (Figura 06), una inmunoelectrotransferencia y un ELISA de captura. Se usó una dosis por vacuna de 1 ml del adyuvante de gel de hidróxido de aluminio (OMEGA - Chemicals Inc.).

Para la verificación de las VLP, las fracciones del gradiente de CsCl con un resultado positivo en la inmunoelectrotransferencia se dializaron por separado contra 500 ml de tampón de carbonato (NaCl 300 mM, carbonato 50 mM, a pH 7,0), 2 veces cada una durante 4 horas. Se añadieron aproximadamente 10 µl de cada fracción a las rejillas de malla de 200 cubiertas con formvar/carbono y se dejaron reposar durante 1 minuto a la temperatura ambiente. Después, el exceso de muestra se eliminó con papel de filtro y se añadió una gota de acetato de uranio al 2 % en cada rejilla, y se dejó actuar durante 1 minuto. El exceso de este contraste se eliminó con papel de filtro y las rejillas se dejaron en un desecador durante 2 días. El análisis se realizó con un microscopio electrónico de transmisión y se fotografiaron las imágenes (Figuras 07 A, B y C).

#### Quantificación de los antígenos de vacuna del PCV2 mediante un ELISA de captura

En este ensayo ELISA, se precipitaron los anticuerpos anti-rCap-PCV-2 generados en conejo y se usaron como anticuerpos de captura y de detección, estando los últimos conjugados con peroxidasa. En la estandarización, la concentración óptima de antígeno era de 0,625 g/ml, la dilución óptima del anticuerpo de captura era de 15 µg/ml, y el anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa era de 1:800. Todos los procedimientos se realizaron según el método Checkerboard (Crowther J.R. ELISA. Theory and Practice. Methods in Molecular Biology. Vol. 42, págs. 1-223, 1995). Después de optimizar las condiciones de trabajo del ELISA de captura, se usaron las concentraciones de la rCap-PCV-2 para construir una curva patrón ( $y = 0,196 + 0,875x$ ) mediante una regresión lineal (Figura 08). La construcción de la curva patrón se realizó mediante el cálculo de la media de los valores de absorbancia obtenidos a partir de la dilución sucesiva, en base 2, de la proteína, partiendo desde 5 mg/l hasta 0,0048 mg/l, en una microplaca de 96 pocillos recubierta con el anticuerpo de captura a una concentración de 0,625 g/ml. El intervalo de trabajo del ensayo se definió como la región lineal de la curva con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0,996$ . Por lo tanto, la calibración de siete puntos era desde los 0,625 hasta los 0,0391 mg/l de la rCap-PCV-2 correspondientes al resultado del análisis por regresión lineal.

Para la cuantificación de la proteína en el compuesto de vacuna se usaron 0,6 g del precipitado, equivalentes a 100 ml de medio inducido de células de *E. coli* transformadas con el plásmido recombinante pCap-2-RPCV que contiene el gen correspondiente al ORF2 del PCV-2 e inducidas con IPTG para la producción de la proteína recombinante. Como muestra negativa se usó la misma cantidad de extracto de células transformadas con el vector de expresión bacteriano vacío. Los precipitados de estas células se descongelaron y se resuspendieron en 2 ml de tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 5 mM, a pH 8,0). Al tampón de lisis se añadieron 1 mg/ml de lisozima y PMSF, 1 mM y después se incubó en hielo durante 30 minutos. El proceso de lisis celular se realizó con 6 ciclos de ultrasonidos de 10 segundos a 200-300 W cada uno, con intervalos de 10 segundos y los tubos en hielo para impedir el calentamiento de las muestras. La concentración desconocida de la rCap-PCV-2 en la vacuna experimental se determinó mediante Holden and colleagues (Holden, L., Faeste, CK, Egaas, E. Quantitative Sandwich ELISA for the determination of lupine-lupinus spp. in foods. Journal of Agriculture Food Chemistry, Vol. 53, págs. 5866-5871, 2005), donde se realizaron diluciones sucesivas de la vacuna, y se usó la dilución a la cual el valor de la DO a 492 nm más cercano al punto medio de la porción lineal de la curva patrón, para calcular la concentración de la proteína en la vacuna. Por lo tanto, la concentración de la rCap-PCV-2 (SEQ ID NO: 02) en la vacuna experimental, después del cálculo del factor de dilución de la muestra, era de 0,73 mg/ml.

## **EXPERIMENTOS DEMOSTRATIVOS**

### Experimentos con ratones

Se dividieron ratones hembra de cinco semanas de edad en cuatro grupos de cinco animales cada uno como sigue: un grupo para la vacuna experimental desarrollada (precipitado proteico del sulfato de amonio dializado al 0-40 %); un grupo con la rCap-PCV-2 purificada; a un grupo se le inoculó tampón de fosfato PBS (control negativo); y a un grupo se le inocularon las vacunas comerciales contra el circovirus porcino (control positivo). En los grupos vacunados con la vacuna experimental, con la proteína purificada y al grupo al que se le inoculó PBS, se añadió hidróxido de aluminio usado como adyuvante, excepto en los animales a los que se le inoculó la vacuna comercial. Los animales se vacunaron dos veces (dos dosis) por vía i.p., con un intervalo de 14 días entre las dosis. La cantidad de rCap-PCV-2 inoculada en el grupo con la vacuna experimental y en el grupo al que se le inoculó la proteína purificada era de 30 µg para la primera dosis y de 15 µg para la segunda. Las muestras de sangre se recogieron a través de una punción en el seno ocular los días 0, 14, 28 y 35 para un análisis serológico. Los animales se sacrificaron 14 días después de la exposición. Se siguieron todos los principios éticos para la experimentación con animales adoptados por el Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) (Certificate of Ethics for Animal Use (CEUA)/UFV, nº de caso 054/2011).

La evaluación de la respuesta inmunitaria humoral se realizó mediante una técnica de ELISA indirecto. Las concentraciones de trabajo óptimas del antígeno contra la rCap-PCV-2 y la mejor dilución del suero (anticuerpo primario) se evaluaron mediante una valoración por Checkerboard (Crowther J.R. ELISA. Theory and Practice. Methods in Molecular Biology. Vol. 42, págs. 1-223, 1995). Se determinó, como la concentración óptima de antígeno (rcap-PCV-2), 0,156 µg/pocillo y 1:4.000, respectivamente, usando para esto un solo de ratón positivo para el PCV-2.

Los ratones a los que se les inoculó la vacuna experimental mostraron unos niveles similares a los obtenidos en los ratones a los que se les inocularon las vacunas comerciales, especialmente después de la segunda dosis de la vacuna (Figura 09), debido posiblemente a la existencia de VLP (Figura 07) y a la concentración de adyuvante usada.

#### Experimentos con cerdos

Se vacunaron cerdos de una granja comercial convencional de veintiún días de edad con la vacuna experimental, y se compararon con las vacunas comerciales. Se evaluó el potencial antigénico del compuesto de vacuna que contiene la proteína recombinante de la cápside vírica del PCV-2 (rCap-PCV-2) en cerdos. Para ello, se usaron 140 cerdos de aproximadamente 21 días de edad de una granja comercial de la región Ponte Nova - MG. El experimento se llevó a cabo respetando la gestión adoptada por la granja. Este estudio de campo se realizó siguiendo los *Standards of Conduct for the use of Animals in Teaching, Research, and Extension* del Department of Veterinary Medicine DVT/UFV, número de registro 37/2012.

Los animales se dividieron en 7 grupos de 20 animales. Los grupos 1 y 2 se vacunaron con las vacunas comerciales según las recomendaciones del fabricante. Los grupos 3 y 4 se vacunaron con el candidato comercial que contiene 50 µg de la proteína recombinante, en donde los animales del grupo 3 recibieron una dosis a los 21 días de edad y los animales del grupo 4 recibieron dos dosis a los 21 y 35 días de edad. Por el contrario, los grupos 5 y 6 se vacunaron con la vacuna experimental que contiene 150 µg de la proteína recombinante, usando una y dos dosis, respectivamente, con el mismo esquema de vacunación que los grupos 3 y 4. El grupo 7, el grupo de control, fue vacunado con tampón de fosfato (PBS). Todas las inmunizaciones se realizaron por vía intramuscular. Se recolectaron muestras de sangre desde la fase de adaptación inicial hasta el día del sacrificio para la cuantificación de la carga vírica. Las muestras de sangre se recolectaron los días de vida 21, 63, 105 y 154 de los animales. La extracción del ADN total se realizó usando un kit de extracción comercial. La cuantificación de la carga vírica del PCV-2 en el suero recogido se realizó mediante una PCR en tiempo real según el protocolo descrito por Silva *et al.* (Silva, F.M.F., Silva Jr., A., Vidigal P.M., Oliveira C.R., Viana, V.W., Silva, C.H.O., Vargas, I., Fietto, J.L.R., Almeida, M.R. Porcine Circovirus-2 Viral Load versus Lesions in Pigs: Perspectives for Post-weaning multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, Vol. 144, págs. 296-302, 2011). Las reacciones se realizaron por triplicado, y todas analizaron el Ct (ciclo umbral) que representa el Ct promedio de cada muestra, por lo tanto, a partir del Ct promedio de cada muestra se calculó la desviación estándar y promedio por grupo y recolección. Se usaron los valores medios encontrados para la evaluación de la tendencia de disminución de la carga vírica a través del análisis de regresión exponencial. Estadísticamente no se observó ninguna tendencia de disminución de la carga vírica en las vacunas comerciales 1 y 2 (Figura 10 y 11). Se demostró estadísticamente una reducción en la carga vírica en los grupos 3 y 4 (50 µg de la rCap-PCV2, una y dos dosis)  $R^2 = 0,96$  y  $R^2 = 0,94$ , respectivamente (Figuras 12 y 13), donde había una tendencia descendente a partir de la tercera semana de análisis. Los grupos 5 y 6 (150 µg de la rCap-PCV2, una y dos dosis) no mostraron una tendencia de disminución de la carga vírica estadísticamente admisible ( $R^2 = 0,7184$  y  $R^2 = 0,638$ , respectivamente - figuras 14 y 15). El grupo de control negativo no mostró estadísticamente ninguna tendencia de disminución de la carga vírica (Figura 16).

#### **CONCLUSIÓN**

En la actualidad, en el mercado veterinario, las vacunas comerciales contra el PCV-2 son comercializadas por compañías extranjeras, y se producen fuera de Brasil, teniendo por lo tanto el coste de importación de los lotes de vacuna. Los antígenos de vacuna pueden usarse en la vacunación de animales en programas de control para enfermedades asociadas con el PCV-2 en los sistemas convencionales de producción porcina, y representa una alternativa a las vacunas disponibles comercialmente. El kit de ELISA puede usarse en la cuantificación de los antígenos de vacuna del PCV-2, que puede usarse para los análisis de garantía de calidad en una vacuna comercial y/o experimental.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS  
 <120> ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE CIRCOVIRUS PORCINO 2 (PCV-2) PARA FORMULACIONES DE VACUNA, KIT DE DIAGNÓSTICO Y USO DE LOS MISMOS  
 <130> 02 - 2013  
 <160> 4

ES 2 792 510 T3

<210> SEQ ID N 01

<211> 764

<212> ADN

5 <213> Circovirus porcino recombinante 2

<400> 1

```

atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gcggccatat cgaaggctcgt 60
catatgacgt atccaaggag gcgttaccg agaagaagac accgcccacg cagccatctt 120
ggccagatcc tccgccgccg cccctggctc atccaccccc gccaccgta ccgctggaga 180
aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tccgcacct tcggatatac tatcaaacga 240
accacagtca aaacgccctc ctgggcggtg gacatgatga gattcaatat taatgacttt 300
cttccccccag gagggggctc aaacccccgc tctgtgccct ttgaatacta cagaataaga 360
aagggttaagg ttgaattctg gccctgctcc ccgatcacc agggtgacag gggagtgggc 420
tccagtgctg ttattctaga tgataacttt gtaacaaagg ccacagccct cacctatgac 480
ccctatgtaa actactcctc ccgccatacc ataaccagc cttctccta cactcccgc 540
tactttacc ccaaacctgt cctagattcc actattgatt acttccaacc aaacaacaaa 600

```

```

agaaatcagc tgtggctgag actacaaaact gctggaaatg tagaccacgt aggcctcggc 660
actgcgttcg aaaacagtat atacgaccag gaatacaata tccgtgtaac catgtatgta 720
caattcagag aatttaactt taaagacccc cacttaaca ctaa 764

```

10

<210> SEQ ID N 02

<211> 254

<212> Proteina

<213> Circovirus porcino recombinante 2

15

<400> 2

```

Met Gly His Ser Ser Gly
01 05 10 15
His Ile Glu Gly Arg His Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg
20 25 30
Arg Arg Arg His Arg Pro Arg Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg
35 40 45
Arg Arg Pro Trp Leu Ile His Pro Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg
50 55 60
Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly
65 70 75
Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr Pro Ser Trp Ala Val
80 85 90
Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly Gly
95 100 105
Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg
110 115 120
Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly
125 130 135
Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe
140 145 150
Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
155 160 165
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg
170 175 180
Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe

```

ES 2 792 510 T3

				185					190					195
Gln	Pro	Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr
				200					205					210
Ala	Gly	Asn	Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe	Glu	Asn
				215					220					225
Ser	Ile	Tyr	Asp	Gln	Glu	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Met	Tyr	Val
				230					235					240
Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Asn	Thr	
				245					250				254	

<210> SEQ ID N 03

<211> 702

5 <212> ADN

<213> Circovirus porcino 2

<400> 3

atgacgtatc	caaggaggcg	ttaccggaga	agaagacacc	gcccacgcag	ccatcttggc	60
cagatcctcc	gccgccgccc	ctggctcatc	cacccccgcc	accgttaccg	ctggagaagg	120
aaaaatggca	tcttcaacac	ccgcctctcc	cgcaccttcg	gatatactat	caaacgaacc	180
acagtcaaaa	cgccctcctg	ggcgggtggac	atgatgagat	tcaatattaa	tgactttctt	240
cccccaggag	ggggctcaaa	cccccgctct	gtgccctttg	aatactacag	aataagaaag	300
gtaaggttg	aattctggcc	ctgctccccg	atcaccagg	gtgacagggg	agtgggctcc	360
agtgctgta	ttctagatga	taactttgta	aaaaggcca	cagccctcac	ctatgacccc	420
tatgtaaaact	actcctcccg	ccataccata	accagccct	tctcctacca	ctcccgtac	480
ttacccccca	aacctgtcct	agattccact	attgattact	tccaacccaa	caacaaaaga	540
aatcagctgt	ggctgagact	acaaactgct	ggaaatgtag	accacgtagg	cctcggcact	600
gcgttcgaaa	acagtatata	cgaccaggaa	tacaatatcc	gtgtaacat	gtatgtacaa	660
ttcagagaat	ttaatcttaa	agacccccca	cttaacactt	aa		702

10

<210> SEQ ID N 04

<211> 233

15 <212> Proteina

<213> Circovirus porcino 2

<400> 4

ES 2 792 510 T3

Met	Thr	Tyr	Pro	Arg	Arg	Arg	Tyr	Arg	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Pro
01				05					10					15
Arg	Ser	His	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Ile
				20					25					30
His	Pro	Arg	His	Arg	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Phe
				35					40					45
Asn	Thr	Arg	Leu	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Tyr	Thr	Ile	Lys	Arg	Thr
				50					55					60
Thr	Val	Lys	Thr	Pro	Ser	Trp	Ala	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe	Asn
				65					70					75
Ile	Asn	Asp	Phe	Leu	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Arg	Ser
				80					85					90
Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Glu	Phe
				95					100					105
Trp	Pro	Cys	Ser	Pro	Ile	Thr	Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser
				110					115					120
Ser	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn	Phe	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala
				125					130					135
Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val	Asn	Tyr	Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile
				140					145					150
Thr	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser	Arg	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Pro
				155					160					165
Val	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	Pro	Asn	Asn	Lys	Arg
				170					175					180
Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Gly	Asn	Val	Asp	His
				185					190					195
Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Ile	Tyr	Asp	Gln	Glu
				200					205					210
Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Met	Tyr	Val	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	Asn
				215					220					225
Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Asn	Thr							
				230			233							

**REIVINDICACIONES**

1. Antígeno recombinante del *circovirus* porcino 2 (PCV-2) **caracterizado por que** es la SEQ ID NO: 02.
- 5 2. Partículas pseudovíricas (VLP) que comprenden el producto de la oligomerización del antígeno de la reivindicación 1.
3. Formulaciones de vacuna que comprenden el antígeno purificado según la reivindicación 1, o las VLP según la reivindicación 2, asociados a adyuvantes farmacéuticamente aceptables, más particularmente hidróxido de aluminio.
- 10 4. Kit de diagnóstico de Elisa de captura que comprende el antígeno recombinante de la reivindicación 1 y anticuerpos anti-SEQ ID: 02.
- 15 5. Uso de los antígenos según la reivindicación 1 y de las VLP según la reivindicación 2 para la producción de kits de diagnóstico.
6. Antígenos según la reivindicación 1 y VLP según la reivindicación 2 para su uso como vacuna.
7. Formulaciones de vacuna según la reivindicación 3 para su uso en la generación de una protección frente a la infección del PCV-2.
- 20 8. Uso del kit de diagnóstico según la reivindicación 4 para la cuantificación *in vitro* de la proteína de la cápside del PCV-2.

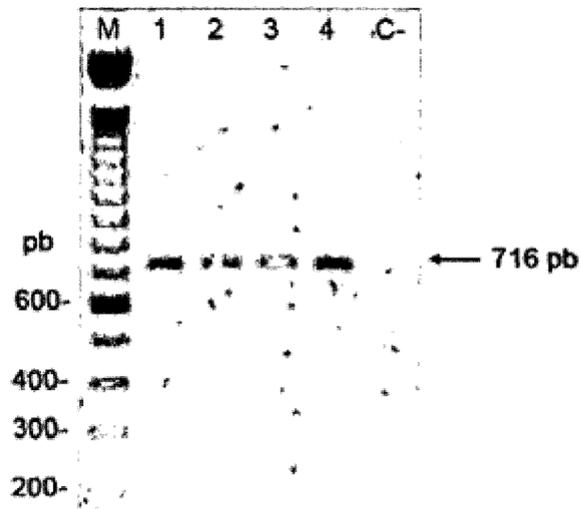


FIGURA 1

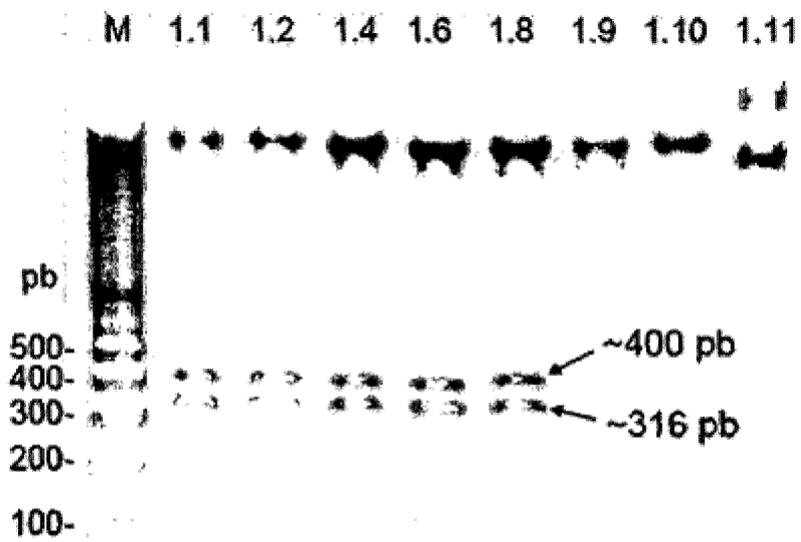


FIGURA 2

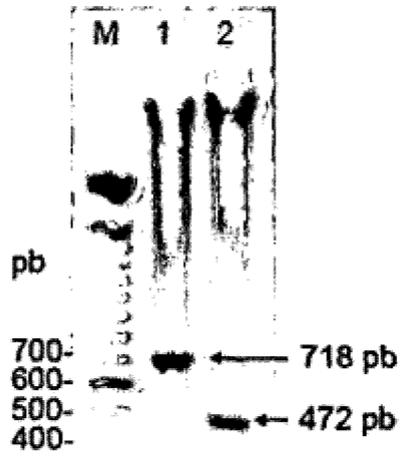


FIGURA 3

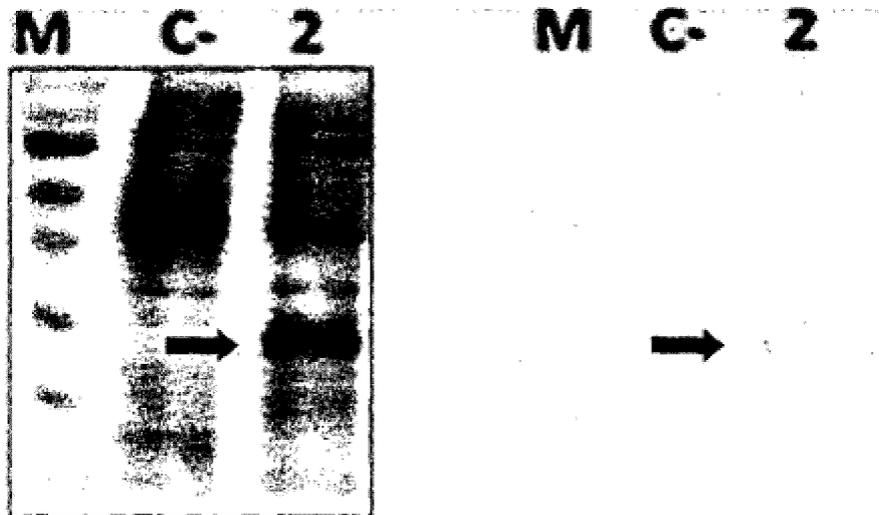


FIGURA 4

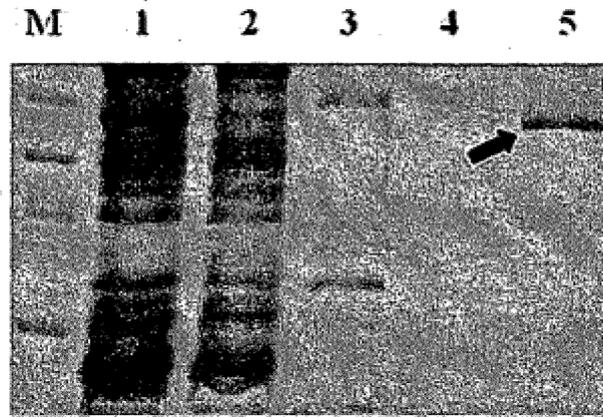


FIGURA 5

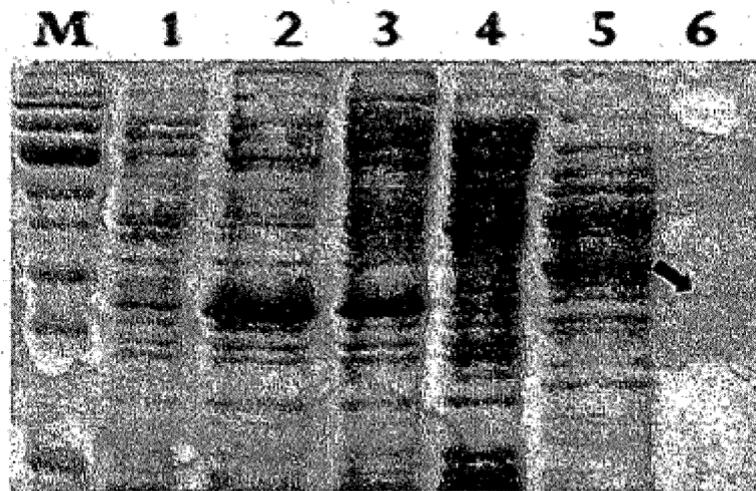


FIGURA 6

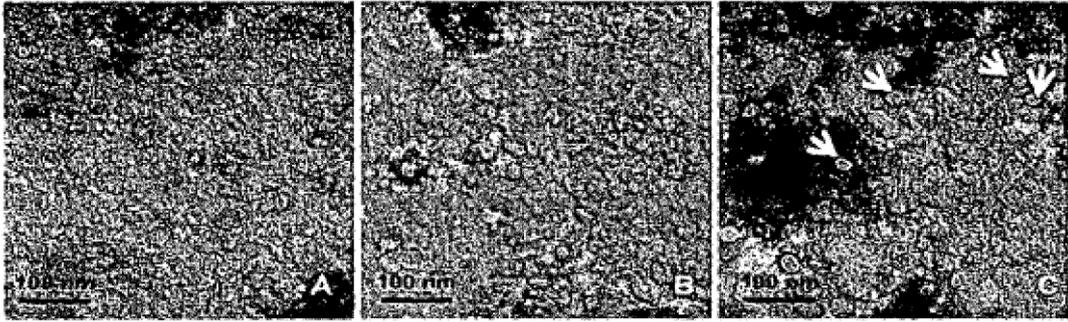


FIGURA 7

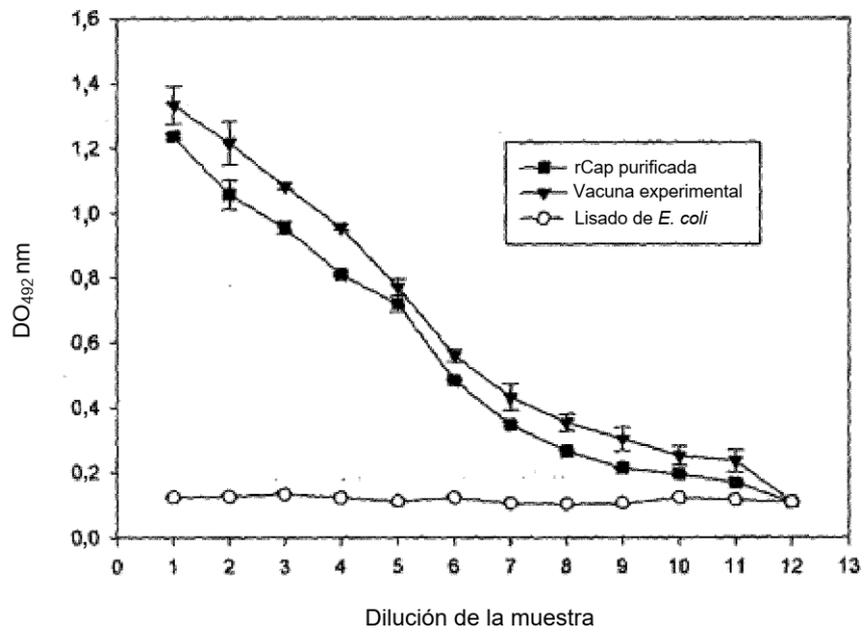


FIGURA 8

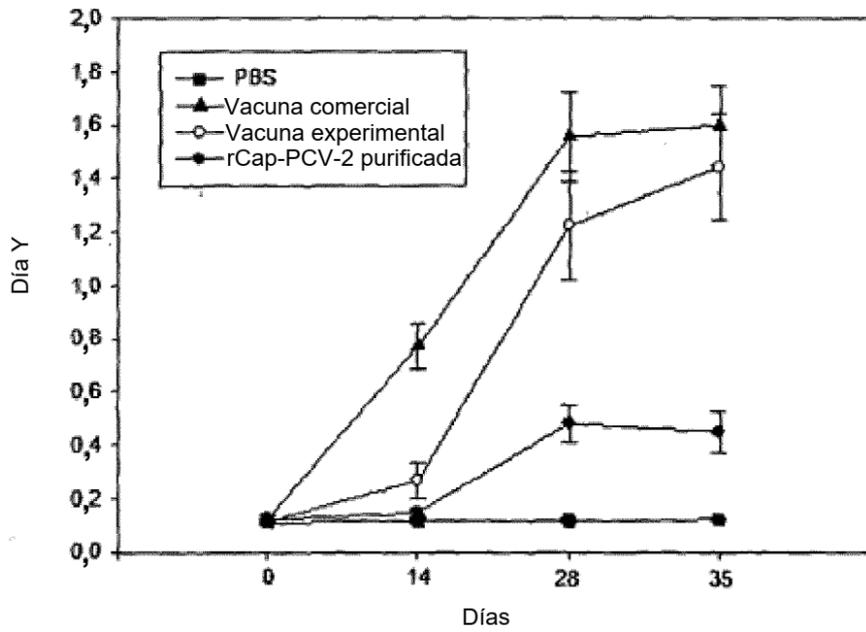


FIGURA 9

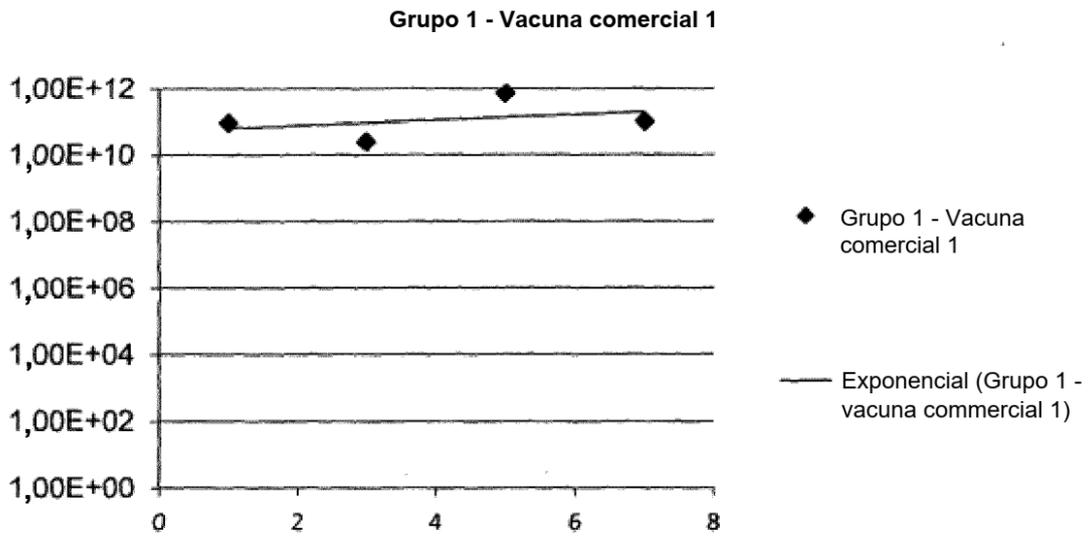


FIGURA 10

Grupo 2 - Vacuna comercial 2

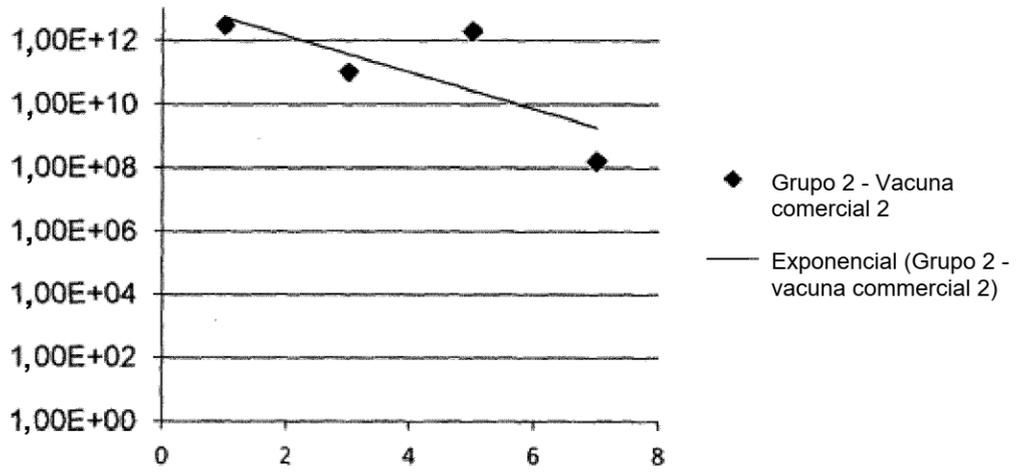


FIGURA 11

Grupo - 3 Vacuna comercial (1 dosis - 50 ug)

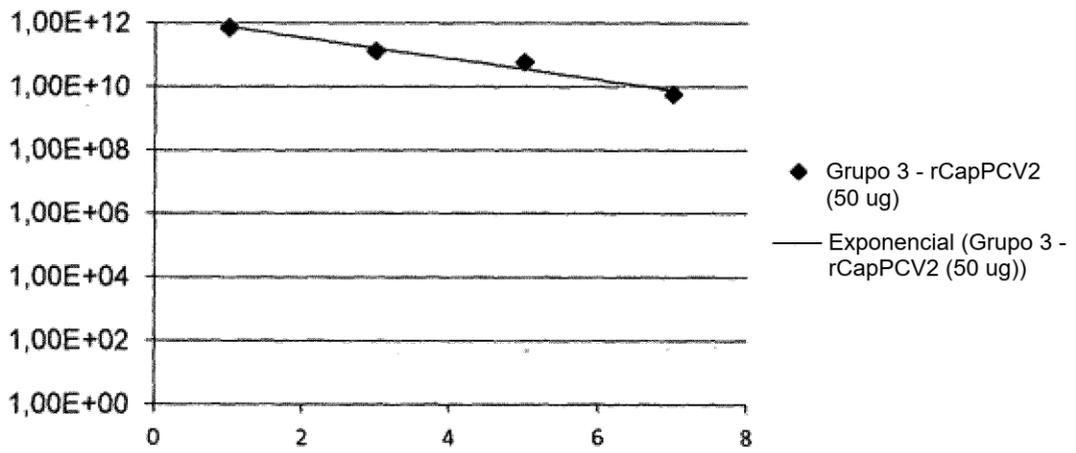


FIGURA 12

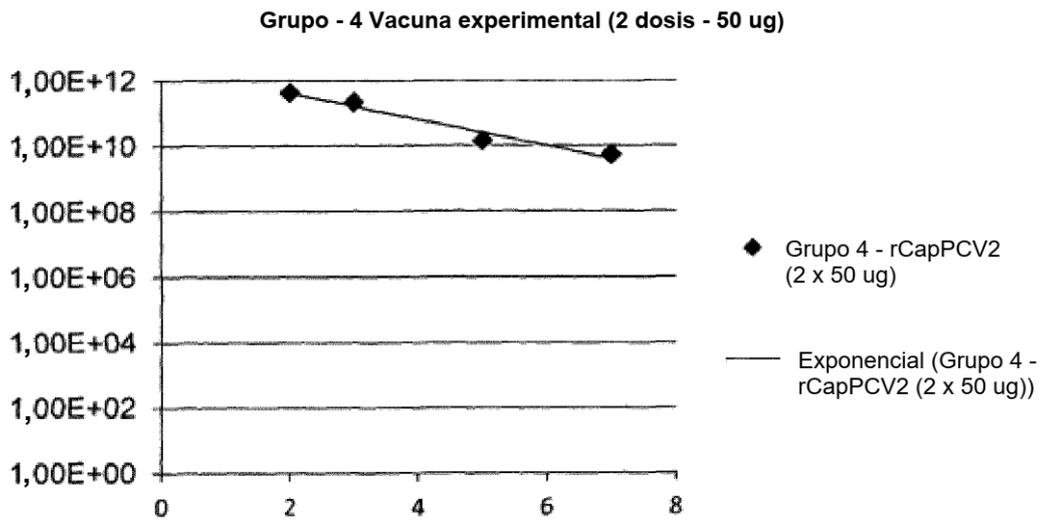


FIGURA 13

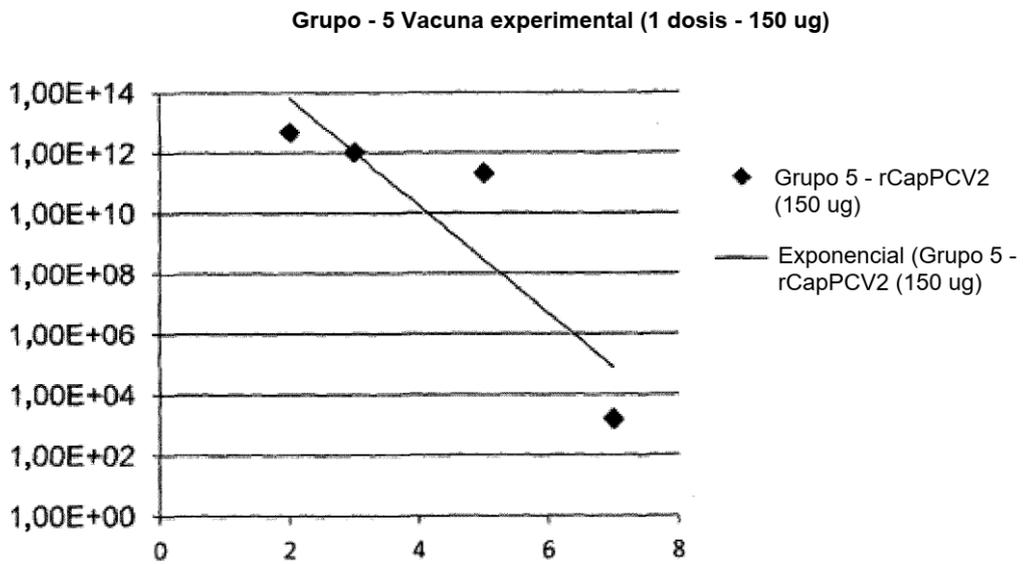


FIGURA 14

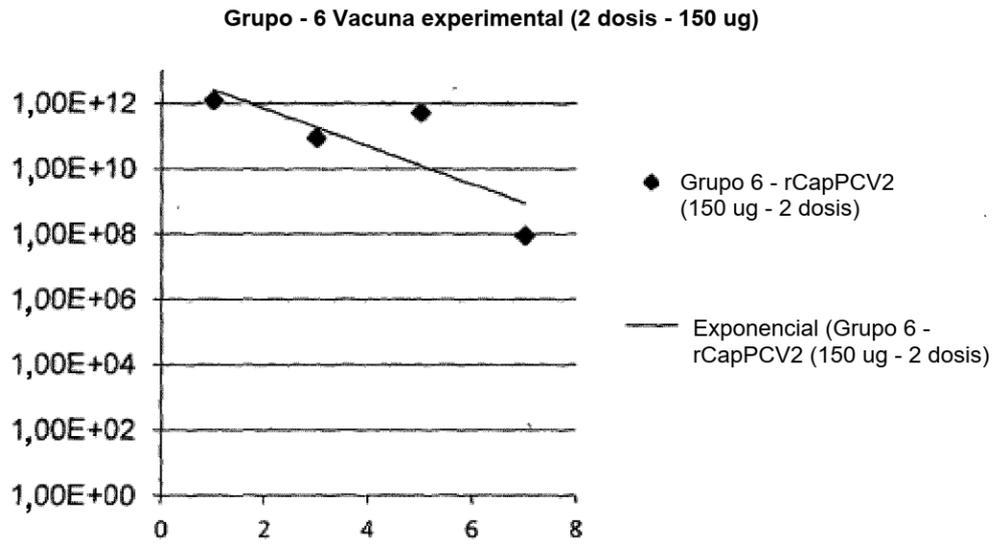


FIGURA 15

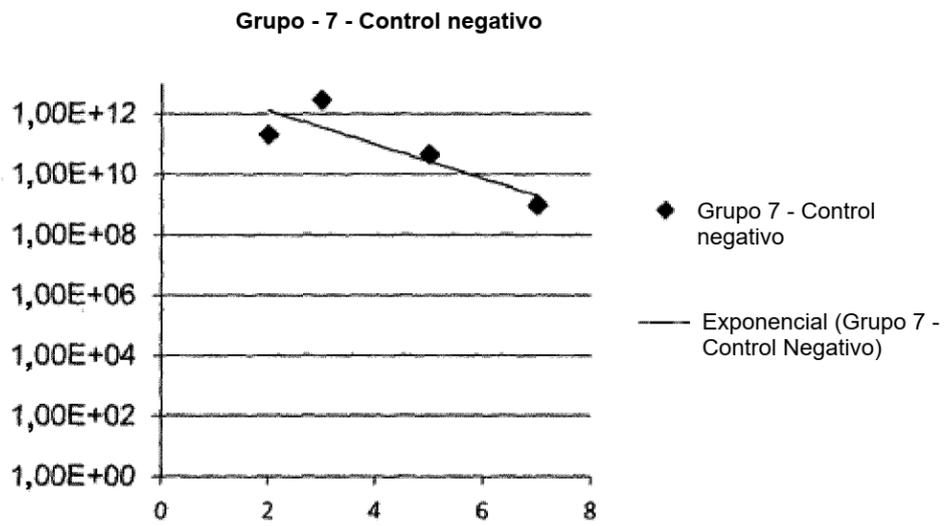


FIGURA 16