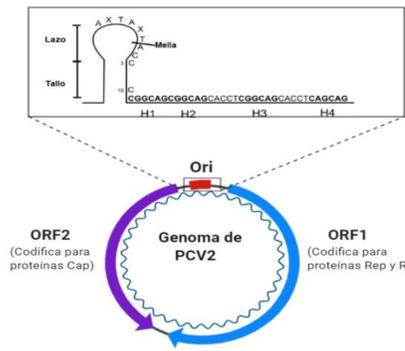
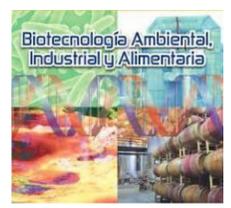


PRUEBAS IN VIVO DE INMUNOGENICIDAD Y SEGURIDAD DE NUEVAS VACUNAS CANDIDATAS FRENTE A PCV2, DISEÑADAS PARA UN MEJOR RENDIMIENTO QUE EL MOSTRADO POR LAS VACUNAS COMERCIALIZADAS ACTUALMENTE.

Rodríguez Barrios, Iván (1), Cid Boza, Raquel (2), Infante Viñolo, Juan José (1, 2)

(1) Máster Biotecnología Industrial, Ambiental y Alimentaria, Universidad Pablo de Olavide. Ctra. Utrera Km 1. 41013 Sevilla;
(2) ADL Bionatur Solutions, S.A. Av. Desarrollo Tecnológico 11. 11591 Jerez de la Frontera



PCV2 es un pequeño virus sin envoltura que pertenece al género *Circovirus*, de la familia *Circoviridae*. Posee un genoma de ADN circular monocatenario de aproximadamente 1,7 kb de tamaño

PCV2 ha evolucionado para evadir al sistema inmune exponiendo epítomos señuelo inmunodominantes, desviando y bloqueando estéricamente las respuestas de los anticuerpos, alejándolos de los epítomos neutralizantes y desencadenando una respuesta inmune retardada.

Las respuestas neutralizantes de anticuerpos de unión se correlacionan con la disminución de las cargas virales en infecciones experimentales.

Figura 1. Estructura y organización genómica de circovirus porcino tipo 2 (PCV2). El genoma de PCV2 se divide en 3 secciones. ORF1: situado en la cadena positiva, la cual contiene los genes Rep y Rep' necesarios para la síntesis de proteínas involucradas en la replicación e integración del virus. ORF2: situado en la cadena negativa, codifican la proteína estructural que forma la cápsida de PCV2 (la proteína de la cápsida de PCV2 es necesaria y suficiente para generar inmunidad protectora, por lo tanto es el componente esencial en todas las vacunas contra PCV2). Ori: origen de replicación situado en la zona intergénica entre los comienzos de ambos ORFs.

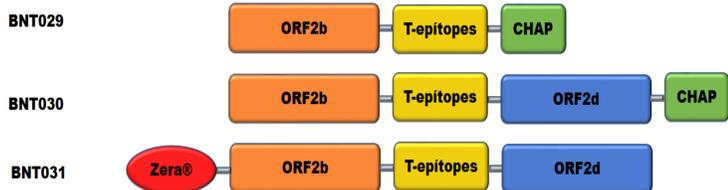


Figura 2. Estructura peptídica de tres candidatos a vacunas recombinantes de nueva generación contra PCV2, diseñadas en ADL Bionatur Solutions. Estos candidatos se generaron en insecto, usando el sistema de expresión baculovírico. Cada principio activo es una proteína de fusión con varios dominios, con una función determinada. Los dominios incluyen a la secuencia codificante para la proteína de la cápsida de PCV2 (ORF2) en el genotipo mayoritario actual PCV2b (naranja) y el emergente PCV2d (azul). La función del resto de dominios es potenciar la presentación antigénica de las proteínas, incrementando la respuesta mediada por linfocitos T (respuesta celular o Th1). Incluyen una chaperona para direccionamiento, internalización y presentación vía Th1 en células dendríticas (CHAP, información confidencial, en verde), epítomos T validados previamente como presentados vía Th1, de otras proteínas del virus PCV2 (en amarillo), y el dominio Zera® (en rojo). Zera® es una tecnología patentada por ADL Bionatur Solutions y desarrollada por su empresa subsidiaria Zip Solutions. Se basa en un sistema biológico de exportación proteico en maíz que permite a BNT031 formar cuerpos proteicos estables en las células de insecto, lo que facilita la purificación y una vez inoculados en el animal potencian la presentación antigénica y sesgan la respuesta hacia la componente Th1.

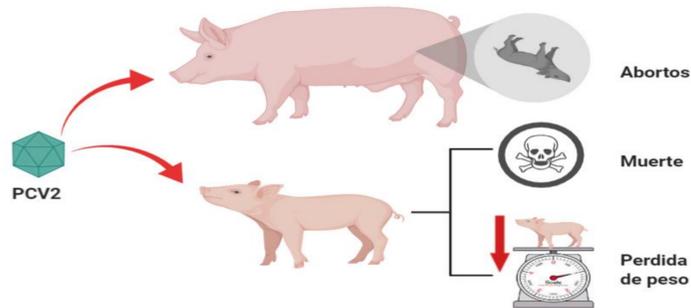


Figura 3. Consecuencias de infección por PCV2. PCV2 es un patógeno globalmente extendido que provoca importantes pérdidas económicas en la industria porcina. Este virus afecta a lechones destetados entre 7-14 semanas de edad, provocando el síndrome del desgaste multisistémico post-destete, también conocido como síndrome del desmedro. Los lechones afectados tienen un alto índice de mortalidad y los que logran sobrevivir ven reducida su tasa de engorde. PCV2 también puede afectar a hembras preñadas, induciendo abortos. Las vacunas comerciales contra PCV2 se introdujeron por primera vez en los EE. UU. En 2006. Estas vacunas estaban dirigidas hacia el genotipo PCV2a que era predominante en ese momento. Sin embargo, PCV2a ha sido sustituido por dos nuevos genotipos, PCV2b el mayoritario actual y PCV2d el nuevo genotipo emergente.

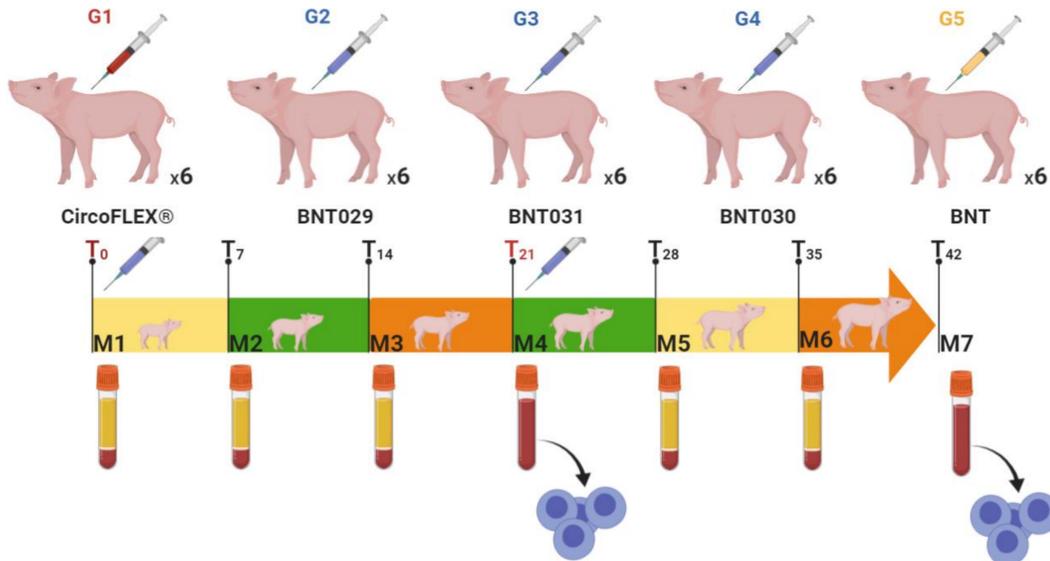


Figura 4. Diseño experimental de candidatos de nueva generación de vacunas ensayados en cerdos. Lechones de 3 semanas fueron inmunizados en una granja experimental de la Universidad de Murcia por vía subcutánea con los candidatos experimentales BNT029, 030 y 031, formulados con adyuvante, los días 1 (T₀=>M1) y 21 (T₂₁=>M2) del ensayo. Un grupo de cerdos recibió las inmunizaciones con solo adyuvante (BNT). Y otro grupo recibió la inmunización con la vacuna líder comercial Ingelvac CircoFLEX® de Boehringer Ingelheim Animal Health, cuyo principio activo son virus-like partículas (VLPs) fabricadas en células de insecto mediante expresión de la proteína de la cápsida ORF2 de una cepa del genotipo dominante en la década de 1990s y 2000s, PCV2a. Las dosis de los candidatos experimentales fueron idénticas en cantidades molares de proteína a la de la vacuna comercial. La extracción de muestras de suero fue realizada cada siete días (M1 a M7), además los días 21 (M4) y 42 (M7) fueron aisladas células mononucleares de sangre periféricas (PBMCs) de muestras completas de sangre.

CONCLUSIONES

A. La vacuna comercial solo crea una seroconversión significativa contra secuencias del genotipo PCV2a.

La inmunización con los candidatos experimentales no dio lugar a efectos adversos en los cerdos (datos no mostrados)

B. Los candidatos experimentales crean una seroconversión significativa contra secuencias de los genotipos dominantes antes de la década 2010s y de los actuales.

Los resultados apoyan las hipótesis de partida en el diseño de los candidatos de nueva generación, esto es: vacunas basadas en proteínas recombinantes con una capacidad inmunogénica superior y más amplia en cobertura, que la vacuna comercial de referencia.

En la actualidad se está analizando la capacidad de los sueros de los animales inmunizados de neutralizar la infección de células de cerdo con virus activos de los diferentes genotipos PCV2a, PCV2b y PCV2d, para confirmar que el mayor poder de seroconversión observado en los nuevos candidatos se traduce en mayor capacidad de neutralización universal de cepas de virus PCV2. De confirmarse esta hipótesis, lo que será discutido en el trabajo fin de máster, los nuevos candidatos vacunales tendrían un futuro comercial asegurado, dada la preocupación por la aparición de fenómenos de escape inmunológico de las vacunas actuales en granjas de cerdos de diferentes regiones del mundo.

RESULTADOS DE SEROCONVERSION TRANSCURRIDOS 28 DÍAS

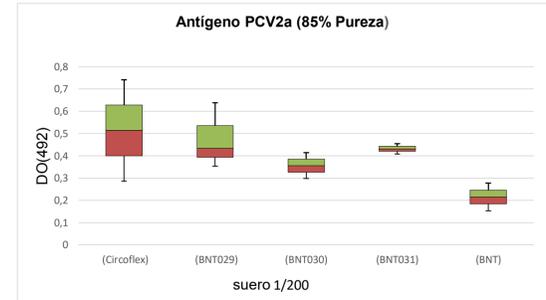


Figura 5. Seroconversión frente al genotipo PCV2a de cerdos inmunizados con los candidatos experimentales y una vacuna comercial de referencia. La gráfica representa la seroconversión al día 28 del ensayo, medida como señal de ELISA (Densidad Óptica a 492 nm) en el que el antisuero (dilución 1/200) se enfrentó a VLPs de PCV2a. La representación de la mediana y rangos intercuartílicos de cada grupo (N=8) muestra que los candidatos experimentales dieron lugar a una respuesta humoral contra PCV2a de la misma intensidad que la producida por la vacuna comercial.

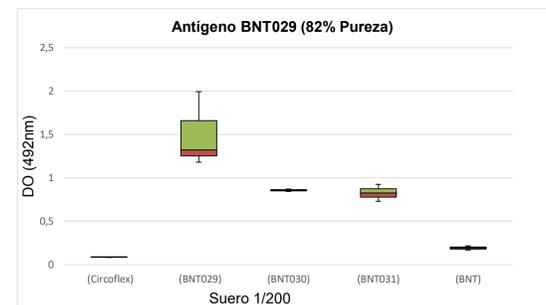


Figura 6. Seroconversión frente al genotipo PCV2b de cerdos inmunizados con los candidatos experimentales y una vacuna comercial de referencia. En este caso, la gráfica representa la seroconversión al día 28 del ensayo medida como señal de ELISA (Densidad Óptica a 492 nm) en el que el antisuero (dilución 1/200) se enfrentó al antígeno BNT029, que porta la secuencia de la cápsida del genotipo PCV2b. La representación de la mediana y rangos intercuartílicos de cada grupo (N=8) muestra que, en contraste de lo observado frente a PCV2a (Figura 3), la respuesta humoral de la vacuna comercial, basada en el genotipo PCV2a, frente a PCV2b no se diferencia del ruido de fondo inespecífico (BNT), mientras que los candidatos experimentales dieron lugar a una seroconversión humoral contra PCV2b significativamente mayor.

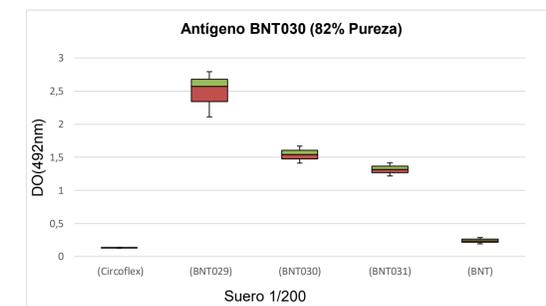


Figura 7. Seroconversión frente a los genotipos PCV2b y PCV2d de cerdos inmunizados con los candidatos experimentales y una vacuna comercial de referencia. En este caso, se representa la seroconversión al día 28 del ensayo medida como señal de ELISA (DO 492 nm) en el que el antisuero (dilución 1/200) se enfrentó al antígeno BNT030, que porta la secuencia de la cápsida de los genotipos PCV2b y PCV2d. La representación de la mediana y rangos intercuartílicos de cada grupo (N=8) muestra que la respuesta humoral inducida en los cerdos por los candidatos experimentales frente a las secuencias de la cápsida de PCV2b y PCV2d es significativamente mayor que la inducida por la vacuna comercial, que no da lugar a una seroconversión significativa.

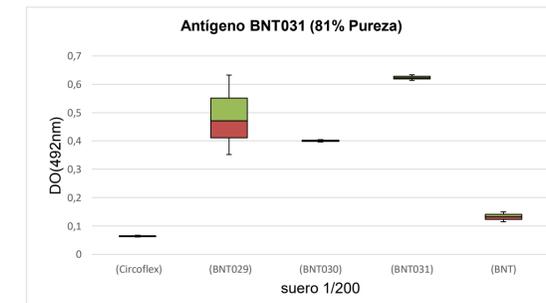


Figura 8. Análisis independiente de seroconversión frente a los genotipos PCV2b y PCV2d de cerdos inmunizados con los candidatos experimentales y una vacuna comercial de referencia. En este caso, la gráfica representa la seroconversión al día 28 del ensayo medida como señal de ELISA en el que el antisuero (dilución 1/200) se enfrentó al antígeno BNT031, un antígeno diferente a BNT030, pero que también porta la secuencia de la cápsida de los genotipos PCV2b y PCV2d. La representación de la mediana y rangos intercuartílicos de cada grupo (N=8) confirma lo observado en la figura 7, que la respuesta humoral inducida en los cerdos por los candidatos experimentales frente a las secuencias de la cápsida de PCV2b y PCV2d es significativamente mayor que la inducida por la vacuna comercial, que no da lugar a una seroconversión significativa.



La investigación para la generación de los candidatos vacunales BNT029, BNT030 y BNT031 ha sido financiada con el apoyo del programa RETOS-COLABORACIÓN de la Agencia Estatal de Investigación, convocatoria 2017, mediante financiación otorgada al proyecto VALORIZACIÓN DE NUEVAS VACUNAS CONTRA PATÓGENOS RESPIRATORIOS PARA LA REDUCCIÓN DEL USO DE ANTIBIÓTICOS EN PORCINO (ONE-HEALTH-RESPIRA), expediente RTC-2017-6601-2.