

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 473**

51 Int. Cl.:

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/866 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006** **E 17208901 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 3320919**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas de PCV2 multivalentes y métodos para producir dichas composiciones**

30 Prioridad:

29.12.2005 US 755015 P

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

29.03.2021

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA
INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**ROOF, MICHAEL B.;
HAYES, PHILLIP WAYNE;
EICHMEYER, MARK;
NITZEL, GREG y
SCHAEFFER, MERRILL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 814 473 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

Composiciones inmunogénicas de PCV2 multivalentes y métodos para producir dichas composiciones

Lista de secuencias

Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato papel y en formato electrónico.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la Invención

Un aspecto de la presente descripción concierne a la recuperación de una proteína expresada por el marco de lectura abierto 2 (ORF2 - siglas en inglés) de circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Más particularmente, la proteína es una proteína recombinante expresada por un virus transfectado que contiene secuencias codificadoras recombinantes para el circovirus porcino tipo 2, marco de lectura abierto 2. Todavía más particularmente, se permite que el virus transfectado infecte células en medios de crecimiento, y la proteína expresada por el marco de lectura abierto 2 se recupera en el sobrenadante, más que desde el interior de las células. Incluso más particularmente, el método implica las etapas de amplificar el gen del marco de lectura abierto 2 procedente del circovirus porcino tipo 2, clonar esta porción amplificada en un primer vector, escindir la porción del marco de lectura abierto 2 procedente de este primer vector y clonarla en un vector de transferencia, cotransfectar el vector de transferencia con un vector viral en células en medios de crecimiento, determinando que las células se vuelvan infectadas por el vector viral y, con ello, expresar el marco de lectura abierto 2, y recuperar la proteína recombinante expresada por el marco de lectura abierto 2 en el sobrenadante.

En otro aspecto, la presente descripción concierne a una composición inmunogénica eficaz para inducir una respuesta inmune contra PCV2, y a métodos para producir esas composiciones inmunogénicas. Más particularmente, la presente descripción concierne a una composición inmunológica eficaz para proporcionar una respuesta inmune que protege a un animal que recibe la composición y reduce, o disminuye la gravedad de los síntomas clínicos asociados con la infección por PCV2. Todavía más particularmente, la presente descripción concierne a una composición inmunológica, basada en proteínas, que confiere una protección eficaz contra la infección por PCV2. Incluso más particularmente, la presente descripción concierne a una composición inmunológica que comprende el ORF2 de PCV2, en donde la administración del ORF2 de PCV2 da como resultado la protección frente a una infección por PCV2. Lo más particularmente, la presente descripción concierne a una composición inmunológica eficaz para conferir una inmunidad eficaz a un cerdo que recibe la composición inmunológica, y en donde la composición comprende la proteína expresada por el ORF2 de PCV2.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporcionan vacunas de combinación o vacunas multivalentes. Más particularmente, la presente descripción proporciona composiciones inmunogénicas eficaces por inducir una respuesta inmune frente a la infección por PCV2 y al menos otro organismo que provoca enfermedad para cerdos.

Descripción de la Técnica Anterior

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus de ADN pequeño (17 - 22 nm de diámetro), icosaédrico, sin cubierta, que contiene un genoma circular de cadena sencilla. PCV2 comparte una identidad de la secuencia de aproximadamente el 80% con el circovirus porcino tipo 1 (PCV1). Sin embargo, en contraposición con PCV1, que generalmente no es virulento, cerdos infectados con PCV2 exhiben un síndrome al que habitualmente se alude como síndrome de adelgazamiento multisistémico post-destete (PMWS - siglas en inglés). Clínicamente, el PMWS se caracteriza por un adelgazamiento, palidez de la piel, un desarrollo poco vigoroso, dificultad respiratoria, diarrea, icterus e ictericia. En algunos cerdos afectados, resultará evidente una combinación de todos los síntomas, mientras que otros cerdos solamente tendrán uno o dos de estos síntomas. Durante la necropsia, también aparecen lesiones microscópicas y macroscópicas en múltiples tejidos y órganos, siendo los órganos linfoides el sitio más común para las lesiones. Se ha observado una fuerte correlación entre la cantidad de ácidos nucleicos o antígenos de PCV2 y la gravedad de lesiones linfoides microscópicas. Las tasas de mortalidad para cerdos infectados con PCV2 pueden aproximarse al 80%. Además del PMWS, PCV2 ha sido asociado con otras varias infecciones, incluida pseudorrabia, síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS - siglas en inglés), enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis post-destete, hepatitis dietética y bronconeumonía supurativa.

La proteína expresada por el marco de lectura abierto 2 (ORF2) de PCV2, con un peso molecular aproximado de 30 kDa cuando se realiza sobre gel de SDS-PAGE, ha sido utilizada en el pasado como un componente antigénico en vacunas para PCV2. Métodos típicos de obtener ORF2 para uso en vacunas de este tipo consiste generalmente en amplificar el ADN del PCV2 que codifica ORF2, transfectar un vector viral con el ADN de ORF2, infectar las células con el vector viral que contiene el ADN de ORF2, permitir que el virus exprese la proteína de ORF2 dentro de la célula, y extraer la proteína de ORF2 de la célula vía lisis celular. Estos procesos duran generalmente hasta aproximadamente cuatro días después de la infección de las células por parte del vector viral. Sin embargo, estos procesos tienen una desventaja debido a que los procesos de extracción son tanto costosos como prolongados. Adicionalmente, la cantidad de ORF2 recuperada de las células no es muy alta; por consiguiente, un gran número de las células necesita ser infectado por un gran número de vectores virales con el fin de obtener cantidades suficientes

de la proteína recombinante expresada para uso en vacunas y similares.

Los actuales métodos para la inmunización frente a PCV2 incluyen vacunas basadas en ADN, tales como las descritas en la patente de EE.UU. nº 6.703.023. Sin embargo, vacunas de este tipo han sido ineficaces para conferir inmunidad protectora frente a una infección por PCV2 y los síntomas clínicos asociados con la misma.

5 El **Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino** (PRRS - siglas en inglés) está causado por un virus que fue aislado por primera vez y clasificado como un arterivirus en un año tan reciente como 1991. El síndrome de la enfermedad ha sido reconocido por vez primera en los EE.UU. a mediados de los años 1980 y se denominó "enfermedad porcina misteriosa". También se denomina enfermedad de la oreja azul. El nombre arterivirus porcino ha sido propuesto recientemente. El virus del PRRS tiene una particular afinidad por los macrófagos, particularmente los que se encuentran en los pulmones. Los macrófagos son parte de las defensas del cuerpo. Los que están presentes en los pulmones se denominan macrófagos alveolares. Éstos ingieren y eliminan bacterias y virus invasores, pero no en el caso del virus del PRRS. En su lugar, el virus se multiplica en el interior de ellos produciendo más virus y mata a los macrófagos. Una vez que ha penetrado en una piara, tiende a permanecer presente y activo indefinidamente. Hasta el 40% de los macrófagos se destruye, lo cual elimina una parte principal del mecanismo de la defensa de los cuerpos y permite que bacterias y otros virus proliferen y provoquen daño. Un ejemplo común de esto es el aumento perceptible de la gravedad de la neumonía enzoótica en unidades de engorde/acabado cuando son infectadas con el virus del PRRS. Puede pasar un año antes de que toda la camada, en particular en grandes piaras, se infecte por primera vez y, aunque parece que el virus se difunde rápidamente en una piara, pueden pasar aproximadamente 4 - 5 meses antes de que al menos el 90% de las cerdas se vuelvan sero-positivas. Algunas cerdas siguen siendo seronegativas. Además, no es inhabitual que piaras de cerdas contengan, 1-2 años después de la infección, menos del 20% de animales serológicos positivos. Sin embargo, esto no significa necesariamente que dichos animales no sigan siendo inmunes ni tampoco significa que hayan dejado de transferir la inmunidad a sus crías. Los animales adultos eliminan el virus durante periodos de tiempo mucho más cortos (14 días) en comparación con cerdos en desarrollo que los pueden excretar durante 1-2 meses. La imagen clínica puede variar tremendamente de una piara a otra. Como guía, por cada tres piaras expuestas al PRRS por vez primera, una no mostrará ninguna enfermedad reconocible, la segunda mostrará una enfermedad suave y la tercera una enfermedad de moderada a grave. Las razones de ello no se comprenden claramente. Sin embargo, cuanto mejor sea el estado de salud de la piara, tanto menos graves serán los efectos de la enfermedad. Puede ser que el virus mute a medida que se multiplica, dando como resultado algunas cepas que son muy virulentas y algunas que no lo son. El PRRS infecta a todos los tipos de piaras, incluidas unidades con un estado de salud bueno u ordinario, tanto en establos como al aire libre, independientemente del tamaño.

35 **Mycoplasma hyopneumoniae** (*M hyo*) es una bacteria pequeña (400-1200 nm) clasificada en la familia Mycoplasmataceae. *M hyo* está asociada con la Neumonía Enzoótica, una enfermedad respiratoria en cerdos que comúnmente se observa en cerdos en las fases de desarrollo y engorde. *M hyo* ataca los cilios de células epiteliales de la tráquea y los pulmones, determinando que los cilios cesen de batir (ciliostasis) y, finalmente, determinen que se aplasten zonas de los pulmones. Dependiendo del grado de la enfermedad, la ganancia de peso vivo diario de cerdos infectados se puede reducir en hasta un 17%. La Neumonía Enzoótica está ampliamente difundida en poblaciones de cerdos y está presente en casi cada una de las piaras. *M hyo* se considera un patógeno primario que facilita la penetración del PRRSV y otros patógenos respiratorios en los pulmones. En tres cepas separadas, 232, J y 7448, se han secuenciado sus genomas (Minion et al., J. Bacteriol. 186: 7123-33, 2004; Vasconcelos et al., J. Bacteriol. 187: 5568-77, 2005).

45 La **enteritis porcina proliferativa** es una enfermedad diarreica común de cerdos de desarrollo-engorde y de crianza jóvenes, caracterizada por hiperplasia e inflamación del íleon y colon. A menudo, es suave y auto-limitante, pero a veces provoca una diarrea persistente, enteritis necrótica grave, o enteritis hemorrágica con alta mortalidad. La etiología es la bacteria intracelular, recientemente clasificada, *Lawsonia intracellularis*. El organismo ha sido cultivado solamente en cultivos celulares, y han fracasado intentos de su propagación en medio exento de células. Los postulados de Koch se han cumplido mediante inoculación de cultivos puros de *L intracellularis* en cerdos de crianza convencional; se produjeron lesiones típicas de la enfermedad, y *L intracellularis* fue reaislado a partir de las lesiones. La forma no hemorrágica, más común, de la enfermedad afecta frecuentemente a cerdos de 18 a 36 kg y se caracteriza por una aparición repentina de la diarrea. Las heces son de acuosas a pastosas, parduzcas o tenuemente teñidas de sangre. Después de ~2 días, los cerdos pueden pasar por formaciones fibrinonecroticas amarillas que se han formado en el íleon. La mayoría de los cerdos afectados se recupera espontáneamente, pero un número significativo desarrolla enteritis necrótica crónica con emaciación progresiva. La forma hemorrágica se caracteriza por una palidez cutánea, debilidad y paso de heces alquitranadas, hemorrágicas o negras. Las cerdas jóvenes preñadas pueden abortar. Las lesiones pueden aparecer en cualquier lugar en la mitad inferior del intestino delgado, el intestino ciego o colon, pero son lo más frecuentes y obvios en el íleon. La pared del intestino se engrosa, y el mesenterio puede ser edematoso. Se amplían los nódulos linfáticos mesentéricos. La mucosa intestinal aparece engrosada y rugosa, puede estar cubierta de una membrana fibrinonecrotica parduzca o amarilla y, a veces, tiene hemorragias petequiales. Las formaciones necróticas amarillas se pueden encontrar en el íleon o atravesando el colon. Una necrosis de la mucosa difusa y completa en casos crónicos hace que el intestino se vuelva rígido, asemejándose a una manguera de jardín. Las lesiones de la mucosa proliferativas se encuentran a menudo en el colon, pero solamente se detectan mediante una inspección cuidadosa en la necropsia. En la forma profundamente hemorrágica existen heces alquitranadas rojas o negras en el colon y sangre coagulada en el íleon.

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD - siglas en inglés) y el de la enfermedad de la Frontera son dos virus, que se encuentran en el mismo grupo de pestivirus que el virus de la fiebre porcina (peste porcina), pero que principalmente infecta al ganado bovino y a las ovejas, respectivamente. Éstos pueden penetrar en piaras de crianza y provocar problemas reproductivos. La enfermedad no es una causa común de infertilidad en las cerdas y se consideraría baja en la lista de posibilidades desde un punto de vista diagnóstico.

La **leptospirosis** es una enfermedad contagiosa de los animales, incluyendo el hombre, causada por diversas serovariedades leptospirales inmunológicamente distintas, la mayoría de las cuales se consideran subgrupos de *Leptospira interrogans*. Existen cinco serovariedades y grupos que son importantes en cerdos: *pomona*, *australis*, *tarassovi*, *canicola*, *icterohaemorrhagicae* y *grippotyphosa*. Las infecciones pueden ser asintomáticas o provocar diversos síntomas, incluidos anorexia, pirexia, apatía, ictericia, abortos, partos muertos y otros problemas reproductivos vagos y muerte. Después de una infección aguda, leptospiras se localizan frecuentemente en los riñones u órganos reproductores que consisten en pequeños focos grises diseminados de una nefritis focal intersticial, y son vertidos en la orina, a veces en grandes números durante meses o años. Dado que los organismos sobreviven en aguas superficiales durante períodos extensos, la enfermedad es a menudo de transmisión hídrica. En los Estados Unidos, la enfermedad se debe principalmente a las serovariedades *Leptospira hardjo*, *Leptospira pomona* y *Leptospira grippotyphosa*. El diagnóstico puede ser difícil, debido a que los títulos de anticuerpos pueden ser transitorios, durando menos de un mes. Además, *Leptospira* también se puede encontrar en animales sanos. *L. australis* serovariedad bratislava está muy comúnmente asociada con problemas reproductores. Piaras crónicamente infectadas exhiben abortos, partos muertos y cochinitos débiles.

La brucelosis es causada por bacterias del género **Brucella** y se caracteriza por aborto, placenta retenida, infertilidad, orquitis en verracos y metritis grave en cerdas. En cochinitos, la enfermedad se caracteriza por parálisis posterior y cojera. La enfermedad en cerdos es provocada, casi exclusivamente, por *Brucella suis* biovariedades 1, 2 y 3. Un cierto número de otros mamíferos pueden portar y transmitir *Brucella suis* a cerdos. La infección se propaga rápidamente y causa muchos abortos en piaras no vacunadas. La transmisión ocurre principalmente mediante contacto con otro cerdo, aunque es posible una transmisión venérea. Un diagnóstico serológico puede ser difícil debido a un organismo relativamente común, *Yersinia enterocolitica* O:9 que comparte un antígeno común con *Brucella* y que, a menudo, determina resultados falsos positivos. Lesiones post-mortem incluyen habitualmente metritis y orquitis, y pueden incluir abscesos, a veces con focos de necrosis en el hígado.

Clostridium es una bacteria gram-positiva ubicua, de la familia Clostridiaceae, que se encuentra habitualmente en la tierra, pero que también aparece de forma natural en los intestinos de la mayoría de los animales. Las infecciones por *C. difficile* en cerdos se caracterizan por edema mesocolónico grave, diarrea y edema en otros tejidos, tal como el hidrotorax. Enteritis por *Clostridium* en cerdos es provocada por *C. perfringens*, y se caracteriza por enteritis crónica, que va acompañada de diarrea, pérdida de peso y fiebre. La infección con los tipos A, B y C de *C. perfringens* produce enteritis grave, disentería, toxemia y alta mortalidad en terneros jóvenes. Los tipos B y C producen ambos la toxina β altamente necrosante y letal que es responsable del extenso daño intestinal. Esta toxina es sensible a las enzimas proteolíticas, y la enfermedad está asociada con la inhibición de proteólisis en el intestino. Se ha sugerido que el calostro de las cerdas, que contiene un inhibidor de tripsina, es un factor en la susceptibilidad de los cerdos jóvenes. La enfermedad puede causar una muerte súbita en cochinitos de menos de una semana de edad y, lo más común, en el espacio de los 3 días del nacimiento. En cochinitos más viejos, *Clostridium* enteritis provoca un engrosamiento del intestino delgado, haciendo difícil la absorción de alimentos y nutrientes. Los cochinitos mueren habitualmente como resultado de una combinación de la infección y carencia de nutrientes. La muerte puede producirse en unas pocas horas, pero los casos menos graves sobreviven durante algunos días y es posible la recuperación en un período de varios días. La enteritis hemorrágica con ulceración de la mucosa es la lesión más importante en todas las especies. En términos generales, la parte afectada del intestino presenta un color azul profundo-púrpura y a simple vista parece ser un infarto asociado con torsión mesentérica. Se pueden analizar muestras de los contenidos intestinales para bacterias gram-positivas con forma de bastoncillos, y se pueden realizar filtrados para detectar toxinas y luego identificar por neutralización con antisuero específico.

Se sospecha, aunque no se ha confirmado todavía, que *Clostridium novyi* es una causa de muerte súbita en ganado bovino y cerdos alimentados con dietas con alto contenido de granos, y en los que no se podían detectar lesiones pre-existentes en el hígado. Las toxinas letales y necrosantes (principalmente toxina α) dañan el parénquima hepático, permitiendo de este modo que las bacterias se multipliquen y produzcan una cantidad letal de la toxina. Habitualmente, la muerte es súbita sin signos bien definidos. Los animales afectados tienden a quedar rezagados de la piara, asumen recumbencia esternal y mueren al cabo de unas pocas horas. La mayoría de los casos ocurre en verano y a principios del otoño, cuando la infección hepática provocada por trematodos está en su esplendor. La enfermedad es más prevalente en ovejas de 1 a 4 años de edad y se limita a animales infectados con trematodos hepáticos. La diferenciación de la fascioliasis aguda puede ser difícil, pero las muertes peragudas de los animales que muestran lesiones típicas en la necropsia deberían levantar sospechas de hepatitis necrótica infecciosa. Las lesiones más características son focos necróticos de color amarillo grisáceo en el hígado que a menudo siguen los rastros migratorios de los trematodos jóvenes. Otros hallazgos comunes consisten en el pericardio agrandado relleno con un fluido de color paja, y en el exceso de fluido en las cavidades peritoneal y torácica. Usualmente, se produce una ruptura extensa de los capilares en el tejido subcutáneo, que hace que la piel adyacente se torne negra (de allí el nombre común enfermedad negra).

Clostridium septicum se halla en el suelo y los contenidos intestinales de animales (incluyendo el hombre) de todo el mundo. La infección comúnmente se produce a través de la contaminación de heridas que contienen tejido devitalizado, suciedad o algún otro debilitante de los tejidos. Pueden infectarse las heridas causadas por accidente, castración, vacunación antihigiénica y parto. Los signos generales, tales como anorexia, intoxicación y fiebre alta, así como lesiones locales, se manifiestan al cabo de unas pocas horas o unos pocos días de la lesión predisponente. Las lesiones locales son prominencias blandas que se hunden al presionar y que se extienden rápidamente debido a la formación de grandes cantidades de exudado que infiltra el tejido conjuntivo subcutáneo e intramuscular de las áreas afectadas. Las acumulaciones de gas no son comunes. Edema maligno asociado con laceraciones se caracteriza por un edema acusado, toxemia grave y muerte en 24-48 h.

La toxemia tetánica es causada por una neurotoxina específica producida por el *Clostridium tetani* en el tejido necrótico. Casi todos los mamíferos, incluidos los cerdos, son susceptibles a esta enfermedad. Si bien el tétanos se distribuye por todo el mundo, hay algunas zonas, como la sección de Montañas Rocosas del Norte de los Estados Unidos, en donde el organismo es muy infrecuente en el suelo y en donde el tétanos prácticamente se desconoce. En general, la aparición de *C. tetani* en el suelo y la incidencia del tétanos en el hombre es mayor en zonas más cálidas de los distintos continentes. *Clostridium tetani*, un anaerobio con esporas esféricas terminales, se halla en el suelo y en los tractos intestinales. En la mayoría de los casos, se introduce en los tejidos a través de heridas, particularmente heridas por punción profunda, que proporcionan un entorno anaerobio adecuado.

La infección con *Salmonella spp* puede producir diarrea en animales de todas las edades, especialmente aquellos que están estresados, amontonados o expuestos a alimentación o suministro de agua densamente contaminado. La salmonelosis es causada por muchas especies de salmonelas y se caracteriza clínicamente por uno o más de tres síndromes principales: septicemia, enteritis aguda y enteritis crónica. La incidencia ha aumentado con la intensificación de la producción de todo tipo de ganado. A pesar de que diversos tipos de *Salmonella* pueden provocar infecciones en cerdos, las salmonelas clásicas encontradas en cerdos son *S. choleraesuis* y *S. typhimurium*. Sus patrones clínicos resultantes de la mayoría de salmonelas no son claros y las diferentes especies de salmonelas tienden a diferir en su epidemiología. El perfil plásmido y los patrones de resistencia a los fármacos a veces son marcadores útiles para estudios epidemiológicos. La salmonelosis septicémica está asociada, a menudo, con *S. choleraesuis*. Los cochinitos infectados demuestran una desgana a moverse, anorexia, una fiebre alta de 40,5°C – 41,6°C, y pueden tener tos superficial. Los cochinitos también pueden encontrarse muertos con extremidades cianóticas. *S. choleraesuis* es una de las raras enfermedades que pueden provocar tanto neumonía como diarrea y la mortalidad de cochinitos infectados es a menudo alta. La enterocolitis está generalmente asociada con la *S. typhimurium* más común. Las infecciones se caracterizan por diarrea amarilla o acuosa que puede contener sangre o mucus a medida que progresa la infección. La mortalidad es baja y, a menudo, está asociada con deshidratación y deficiencia en potasio procedente de la diarrea. Las heces de animales infectados pueden contaminar el alimento y el agua, las carnes procesadas y frescas de mataderos, los productos vegetales y animales utilizados como fertilizantes o los piensos, forrajes y pastizales, y muchos materiales inertes. *S. choleraesuis* raramente se encuentra en los alimentos. También se puede contagiar directamente a través de contacto con un animal infectado. *Salmonella* puede sobrevivir durante meses en zonas húmedas y calientes tales como establos de alimentación de cerdos o en cuevas de agua. Los roedores y las aves salvajes son también fuentes de infección. La prevalencia de la infección varía entre las especies y los países, y es mucho más alta que la incidencia de la enfermedad clínica, que comúnmente se precipita por situaciones estresantes tales como privación súbita del alimento, transporte, sequía, amontonamiento, parto y administración de algunos fármacos.

Escherichia coli es una bacteria de la familia Enterbacteriaceae y es uno de los tipos principales de bacterias que aparecen de forma natural en los intestinos delgados de todos los mamíferos. A pesar de que habitualmente son inofensivas, algunas cepas de *E. coli* pueden producir un cierto número de exotoxinas y endotoxinas que provocan infección y enfermedad. Exotoxinas térmicamente lábiles (LT – siglas en inglés) y térmicamente estables (ST – siglas en inglés) son producidas activamente por algunas cepas y son las responsables de provocar diarrea. La variante de tipo II de toxina similar a Shigela (SLT-IIe), Stx2e y la enfermedad de edema de verotoxina actúan sobre la pared de las arterias pequeñas, dando como resultado un edema. Endotoxinas, tal como lípido A, juegan un papel en la mastitis e infecciones del tracto urinario. La infección por *E. coli* se caracteriza por un cierto número de diferentes síntomas, dependiendo de la cepa particular implicada, incluida diarrea, ojos hundidos, desarrollo poco vigoroso, pérdida de peso visible, crecimiento atrofiado, depresión, edema del intestino, mastitis, cistitis, pielonefritis y muerte. *E. coli* se pueden clasificar y codificar por su pared celular (antígenos O) y fimbrias (antígenos F). Por ejemplo, la diarrea está a menudo asociada con *E. coli* Abbotstown: O147, F4, F5, mientras que el edema del intestino está asociado con fimbrias F18. Identificar correctamente el código es esencial para la selección de la vacuna correcta. Las infecciones por *E. coli* comprometen al sistema inmune del cerdo y las muertes son a menudo el resultado de infecciones secundarias y enfermedad.

La *viruela porcina* es una enfermedad que causa lesiones de la piel, llagas, pústulas y costras.

La *eperitrozoosis* es una enfermedad ictericial (hemotrófica) causada por *Eperythrozoon suis*, un organismo bacteriano extracelular que se adhiere a membranas de los eritrocitos de cerdos, induciendo su deformación y lesión. La enfermedad se caracteriza por anemia e ictericia (decoloración amarilla de membranas mucosas, esclera y oídos internos). Puede conducir a bajas tasas de concepción, otros problemas de reproducción indefinidos, e incluso la muerte.

- La peste porcina, también conocida como **Fiebre Porcina Clásica** (CSF - siglas en inglés) o Fiebre Porcina Africana (ASF - siglas en inglés) es una enfermedad causada por un virus Flaviviridae, que es un virus de ARN con cubierta o, en el caso de la ASF, un virus de ADN con cubierta que está relacionado con los virus varicela. Clínicamente, CSF y ASF son indistinguibles. Los primeros síntomas son una disminución de la actividad y somnolencia con algo de anorexia y los cerdos pueden aparecer desanimados. En el espacio de días, los cerdos presentan una fiebre acusada (41-42 grados Celsius), que a veces va acompañada de enrojecimiento de la piel. A continuación, los cerdos desarrollan una conjuntivitis y estreñimiento que conduce a diarrea amarillenta. En las piaras, los cerdos aparecerán desanimados y, a menudo, se agruparán. Unos pocos cerdos pueden sufrir convulsiones antes de morir. Los cerdos comienzan a morir con una coloración púrpura diseminante de la piel y la muerte se produce, a menudo, en el espacio de 10-20 días post-infección. Los cerdos supervivientes se verán bastantes veces afectados por un retardo serio de su desarrollo y por lomos arqueados. En piaras establecidas, los cochinitos infectados por su madre durante el embarazo pueden resultar en aborto, momificación, malformaciones, partos muertos y cochinitos nacidos débiles. Cochinitos nacidos de madres infectadas por CSF pueden seguir siendo sanos, pero continuamente difunden la enfermedad a lo largo de sus vidas.
- Pasteurelosis neumónica** y estreptococos son causados por *Pasteurella multocida* y diversas especies de estreptococos, típicamente *S. suis*. La infección por el agente causante representa generalmente la fase final del síndrome respiratorio post-destete. Los síntomas clínicos aparecen en tres formas; la forma aguda está asociada, lo más comúnmente, con animales *P. multocida* serotipo B. presentes con disпноea, respiración forzada, latidos violentos del corazón, fiebre alta (42,2 grados Celsius), abatimiento y, finalmente, muerte. En algunos casos, el abdomen se vuelve púrpura con decoloración. Una segunda forma es una forma sub-aguda, caracterizada por pleuritis, tos y dificultad de respirar. Los cerdos pueden perder cantidades importantes de peso y pueden tener un desarrollo deficiente o ninguno, con serias consecuencias en la abundancia de cerdos. La forma crónica se presenta con tos ocasional, latidos violentos del corazón y poca o nada de fiebre. Esta forma afecta generalmente a cerdos de 10-16 semanas de edad.
- La **meningitis estreptocócica** causa inflamación de las meninges que son las membranas que cubren el cerebro. En el cochinito lechal, habitualmente es provocada por *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* o, a veces, bacterias tales como *E. coli* y otros estreptococos. *S. suis* tiene muchos serotipos. En la mayoría de los países, *S. suis* tipo 1 es el principal en cochinitos lechales, pero esto puede no ser cierto en otros países. Por ejemplo, en Dinamarca es el tipo 7. *S. suis* también determina problemas colectivos, particularmente de los tipos 1 y 14. *S. suis* es portado durante largos periodos en las tonsilas y puede ser transmitido al cochinito lechal por la cerda o por otros cochinitos. La cerda proporciona también un nivel variable de inmunidad en el calostro. La meningitis estreptocócica en cochinitos lechales es esporádica en cochinitos individuales. La meningitis estreptocócica puede ser peor en cochinitos lechales cuando el organismo haya sido introducido en la piara por vez primera, o en los casos en los que es secundaria a la infección con PRRS.
- El virus de la **pseudorabia**, también conocido como virus de la rabia porcina, es un virus herpes porcino, en donde el agente causante es un virus herpes de ADN con cubierta. En piaras no expuestas previamente al virus, los cerdos neonatos presentan un intervalo de síntomas nerviosos centrales graves de coordinación desde ajustada a grave. La posterior parálisis puede dar como resultado cochinitos que se sientan de una manera que se asemeja a los perros. Adicionalmente, la mortalidad es elevada. En cerdos destetados, los síntomas nerviosos centrales se pueden reducir, pero pueden venir acompañados por un aumento de síntomas respiratorios. Bastantes veces, las enfermedades respiratorias están asociadas con infecciones secundarias. Cerdos destetados pueden adelgazar y padecer un desarrollo enfermizo y, a menudo, atrofiado. En cerdos en desarrollo, los síntomas nerviosos centrales continúan reduciéndose, al tiempo que los síntomas respiratorios aumentan. El grado de enfermedad respiratoria depende de la presencia y gravedad de infecciones secundarias. En adultos, predominan los síntomas reproductores. Las cerdas pueden abortar y es probable que animales estrechamente infectados parán cochinitos nacidos muertos o débiles. En piaras establecidas, puede haber pocos síntomas clínicos.
- El **Virus de la Gripe porcina** causa la gripe porcina y pertenece al grupo del virus de la influenza de Tipo A. En piaras no expuestas previamente al virus, los síntomas clínicos pueden estar presentes en brotes explosivos, enfermando la totalidad o muchos animales al mismo tiempo. Los animales pueden estar presentes con inactividad, depresión, apilamiento/inyección y anorexia. Los animales respiran a menudo por la boca y la respiración es laboriosa. Puede aparecer un acceso de tos tras el movimiento. Otros síntomas clínicos incluyen una descarga nasal y ojos hinchados con temperaturas rectales entre 40,5 – 41,5º Celsius. Las altas temperaturas en una cerda primípara puede resultar en abortos, infertilidad, producción de pequeñas camadas débiles y partos muertos incrementados. En piaras establecidas, aparece una reinfección anual.
- La colitis espiroquética es causada por la bacteria *Brachyspira pilosicoli*. Esta infección afecta generalmente a cerdos de engorde/acabado de 10-20 semanas de edad. Se caracteriza por diarrea de extenuación no fatal de cerdos en desarrollo que da como resultado un número incrementado de los días necesarios para acabar. La diarrea resulta también en la reducción de la eficacia de la alimentación y produce diarrea acuosa o heces sueltas. Aproximadamente la mitad de los cerdos muestra diarrea de verde a parduzca. de acuosa a mucoide, transitoria a persistente, sin sangre. Los síntomas clínicos son más comunes 10-14 días después de mezclar y cambiar la alimentación.

La **disenteria porcina** está causada por la bacteria *Brachyspira hyodysenteriae*. Actualmente existen doce serotipos conocidos. Síntomas clínicos en piaras establecidas incluyen diarrea, una pérdida rápida del estado en algunos cerdos, un aspecto peludo, deshidratación, abdomen doloroso y la muerte de uno o dos cerdos antes de que otros cerdos muestren cualesquiera síntomas. En un brote clave en piaras no expuestas previamente a la bacteria, todos los grupos de edad desde cochinitos lechales a cerdas adultas pueden verse afectados.

La gastroenteritis transmisible es una enfermedad de los intestinos causada por un coronavirus. Se encuentra en la misma familia que el coronavirus respiratorio porcino, virus de la diarrea epidémica y virus de encefalomiелitis hemoaglutinante. Síntomas clínicos iniciales son diarrea acuosa, vómitos y anorexia. Cochinitos menores a 21 días de edad generalmente mueren, los de destete se vuelven de desarrollo poco vigoroso, mientras que los de engorde, acabado y adultos se ven generalmente afectados ligeramente y sobrevivirán si se les proporciona agua adecuada.

La **parvovirus** es una enfermedad caracterizada por problemas de reproducción en cerdos. El agente causante es un virus de ADN pequeño, sin cubierta. Los fetos son el único grupo afectado y el efecto sobre el feto depende de la edad a la que son infectados. A los 10-30 días de edad, la infección da como resultado la muerte y reabsorción del feto. Entre 30-70 días de edad, la infección da como resultado la muerte y la momificación. Y de 70 días hasta la muerte, las infecciones resultan en el nacimiento de cochinitos débiles y momificación. La enfermedad es capaz de atravesar la placenta y luego desplazarse en cada feto a lo largo del útero. En las cerdas, los síntomas clínicos son partos muertos, cochinitos momificados, muertes de embriones, infertilidad y la producción de un número significativamente reducido de descendencia nacida viva. El aborto no es un rasgo característico de infección por parvovirus.

La **pleuroneumonía por Actinobacillus**, también conocida como APP y la pleuroneumonía por *Haemophilus*, es causada por la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Actualmente existen 15 serovirus descritos y la gravedad de los síntomas clínicos difiere entre los diferentes serovirus y la presencia de otros factores. Los serovirus 1, 5, 9, 10 y 11 se consideran los más virulentos. Adicionalmente, los serovirus 1, 9 y 11; 2, 6 y 8; y 4 y 7 pueden reaccionar cruzadamente. Son susceptibles cerdos de todas las edades. Los síntomas clínicos son una enfermedad repentina que da como resultado animales que se tumban mucho y que presentan una elevada temperatura rectal de 41,5° Celsius. Los animales son generalmente anoréxicos y no beben, sus extremidades se vuelven cianóticas y frías al tacto. La cianosis se puede difundir por todo el cuerpo y desarrollan graves dificultades respiratorias, a menudo con una respiración por la boca, antes de morir. Espuma manchada de sangre se puede observar en la boca y en las fosas nasales y la muerte se produce, generalmente, en el espacio de 24-48 horas. Síntomas clínicos agudos incluyen un elevado porcentaje de animales en un grupo con depresiones y que se tumban, altas temperaturas rectales de 40,5 – 41° Celsius, anorexia, falta de beber, dolor respiratorio agudo, tos, respiración por la boca, cianosis, vómitos y aborto. Síntomas clínicos sub-agudos incluyen tos intermitente en un grupo de cerdos, una pérdida general del apetito y una reducción en el desarrollo. Cyrovar tipo 3 se presenta con artritis, endocarditis y abscesos. En piaras crónicamente afectadas, puede no verse afectada la ganancia diaria de peso, pero puede oírse una tos intermitente.

La **Enfermedad de Glasser** es causada por la bacteria *Haemophilus parasuis* (Hps), de la que existen al menos quince tipos diferentes. Se encuentra por todo el mundo y los organismos están presentes incluso en piaras muy sanas. Si piaras de este tipo se organizan utilizando técnicas SPF o MEW y están exentas de Hps, puede ser devastador cuando se contaminan por vez primera, produciendo una enfermedad similar a antrax con una elevada mortalidad en cerdas. En la mayoría de las piaras en donde la bacteria es endémica, las cerdas producen una fuerte inmunidad materna que normalmente persiste en su descendencia hasta las 8 a 12 semanas de edad. Como resultado, los efectos de la infección en animales destetados es habitualmente nula o mínima. Sin embargo, la enfermedad puede observarse en cerdos lechales. Los cerdos se ven habitualmente infectados sub-clínicamente cuando siguen protegidos por el anticuerpo materno y después estimulan su propia respuesta inmunitaria. Sin embargo, si la inmunidad materna desaparece antes de verse infectados, pueden desarrollar una enfermedad grave. Esto se produce habitualmente en algún momento después del destete. También puede actuar como un patógeno secundario a otras enfermedades principales, en particular neumonía enzoótica (EP - siglas en inglés) (*Mycoplasma hyopneumoniae*). Los brotes de la enfermedad son experimentados a veces en cerdos lechales, en particular en piaras de cerdos jóvenes. Hps ataca las superficies lisas de las articulaciones, tegumentos de los intestinos, pulmones, corazón y cerebro provocando neumonía, infección del saco del corazón, peritonitis y pleurisia. Se difunde por la respiración. La enfermedad provocada por Hps es rara en cerdas, a menos que la cerda seca no haya estado previamente expuesta a la bacteria. Cojera o rigidez, ligeras hinchazones sobre las articulaciones y los tendones y, raramente, meningitis, se observan ocasionalmente en cerdas jóvenes. En cochinitos, la enfermedad aguda se presenta con cerdos rápidamente deprimidos con temperatura elevada, inapetencia y una reluctancia a crecer. Un rasgo característico es una tos corta de 2-3 episodios. No es inhabitual una muerte súbita en cochinitos lechales buenos. Se sabe también que Hps provoca casos individuales de artritis y cojera con fiebre e inapetencia. La enfermedad crónica se caracteriza por cerdos pálidos y de desarrollo deficiente. También puede producirse una muerte súbita. Para cerdos de destete y de engorde, los cerdos con la enfermedad de Glässer se convierten rápidamente con depresión o simplemente pueden encontrarse muertos. Otros síntomas incluyen una temperatura elevada, anorexia, una reluctancia a crecer, síntomas nerviosos tales como accesos y convulsiones incluida meningitis, y cerdos deficientes, que se extenuan y a menudo resulta la aparición de pelo. En cerdos en desarrollo jóvenes, los síntomas siguientes son los más comunes: fiebre, meningitis suave, artritis, cojera, neumonía, infección del saco del corazón, peritonitis y pleurisia. De nuevo, un rasgo característico es una tos corta de solamente 2-3

episodios.

La **epidermitis exudativa** es causada por la bacteria *Staphylococcus hyicus* que vive normalmente sobre la piel sin provocar enfermedad. No se sabe por qué algunas veces se expande y provoca una dermatitis la cual mana fluido grasiento. Produce toxinas que son absorbidas en el sistema y deteriora el hígado y los riñones. En el cochinito lechal la enfermedad se confina habitualmente a animales individuales, pero puede ser un gran problema en nuevas piaras de cerdos jóvenes y cerdos destetados. Durante los días que preceden inmediatamente al parto, la bacteria se multiplica pródigamente en la vagina de las cerdas, de modo que los cochinitos son infectados durante el proceso de nacimiento o poco después. Los síntomas en las cerdas incluyen lesiones no comunes, pero localizadas que se pueden observar particularmente detrás de la cara y los ojos. Cochinitos gravemente afectados morirán. En los cochinitos, los síntomas incluyen lesiones localizadas en los flancos y detrás de las orejas. Las lesiones comienzan habitualmente con pequeñas zonas de infección, oscuras y localizadas, en torno a la cara o sobre las patas. La piel a lo largo de los flancos de la panza y entre las patas torna a un color pardo, implicando gradualmente a la totalidad del cuerpo. La piel adquiere arrugas con formación de escamas de grandes zonas y tiene un tacto grasiento. En casos graves, la piel se vuelve negra debido a la necrosis y los cochinitos mueren. Se observa una imagen más localizada si la cerda ha transferido algo de inmunidad al cochinito, con pequeñas lesiones circunscritas de un diámetro de aproximadamente 5-10 mm de diámetro que no se difunden. Para cerdos destetados y de engorde, los síntomas comienzan habitualmente alrededor de 3 días después del destete, con zonas de infección pardas localizadas en torno a la cara o sobre las patas en donde la piel ha sido dañada. Puede ulcerarse. La piel a lo largo de los flancos de la panza y entre las patas torna a un color pardo, implicando gradualmente a la totalidad del cuerpo. La piel adquiere arrugas con formación de escamas en grandes zonas y progresa a una textura grasienta oscura y, en casos graves, se vuelve negra. Casos de este tipo mueren habitualmente debido a las toxinas producidas por los organismos de estafilococos. En criaderos puede verse implicado hasta el 15% de la población y la deshidratación es común.

La **erisipela porcina** es causada por una bacteria, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, que se encuentra en la mayoría, si no en todas las granjas de cerdos. Hasta el 50% de los animales puede portarla en sus amígdalas. Siempre está presente en el cerdo o en el entorno, ya que es excretada a través de la saliva, las heces o la orina. También se encuentra en muchas otras especies, incluidas aves y ovejas, y puede sobrevivir fuera del cerdo durante unas pocas semanas y durante más tiempo en suelos ligeros. Así, es imposible eliminarla de una pira. Las heces infectadas son probablemente la principal fuente de infección, particularmente en pocilgas de engorde y de acabado. La bacteria sola puede causar la enfermedad, pero las infecciones víricas concurrentes, tales como PRRS o influenza, pueden disparar los brotes. La enfermedad es relativamente no común en cerdos de menos de 8-12 semanas de edad, debido a la protección proporcionada por anticuerpos maternos procedentes de la cerda a través del calostro. Los animales más susceptibles son cerdos de engorde, cerdos jóvenes no vacunados y hasta cerdas de 4º parto. El organismo se multiplica en el cuerpo e invade el torrente sanguíneo para producir una septicemia. La rapidez de multiplicación y el nivel de inmunidad en el cerdo determina entonces los síntomas clínicos.

La **eperitrozoosis** (Epe) es una enfermedad causada por una bacteria denominada *Eperitrozoosis suis* la cual ataca la superficie de glóbulos rojos y, a veces, los destruye. El cerdo puede volverse entonces anémico y los productos que quedan después de la destrucción de las células puede provocar ictericia. La enfermedad clínica se observa, más comúnmente, en cerdos de engorde jóvenes. Sin embargo, también puede provocar problemas de reproducción en la pira de crianza. Una cerda puede portar Epe y seguir estando bastante sana, pero puede atravesar la placenta, resultando cerdos débilmente pálidos cuando nacen. Epe está presente en la mayoría, si no en todas las piaras, pero se desconocen los mecanismos que permiten que se vuelva patógeno y produzca enfermedad en algunas poblaciones y no en otras. La incidencia de la enfermedad es baja.

La **encefalomiocarditis**, o EMC, infecta y causa enfermedad en una amplia gama de animales vertebrados, pero los cerdos parecen ser las especies de animales de granja más susceptibles. El virus es de alcance mundial, pero difiere en la patogenicidad y virulencia en diferentes países y regiones. En la mayoría de los países de Europa, particularmente aquellos en la UE, tiende a ser relativamente ligera o no patógeno y raramente se diagnostica la enfermedad en cerdos. En Australia las cepas parecen ser mucho más virulentas para cerdos que las de Nueva Zelanda. Cepas virulentas en Florida, el Caribe y, probablemente, América Central, dañan el corazón y provocan la muerte, mientras que aquellas en el Medio Oeste de EE.UU. tienden a provocar problemas reproductores. La enfermedad clínica en cerdos tiende a producirse cuando aumenta el número de las ratas hasta niveles de plaga. Los cerdos pueden ser infectados por ratas o por los alimentos o el agua contaminados por ratas. No parece que se difunda muy fácilmente entre los cerdos. En piaras afectadas no existen habitualmente síntomas clínicos en cerdos destetados y de engorde.

La enfermedad de Aujeszky, o AD (siglas en inglés), es una enfermedad importante de los cerdos causada por un **virus herpes**. El virus puede permanecer oculto en los nervios del cerdo en un estado portador durante largos periodos de tiempo y luego puede ser reactivado. Una vez introducido en una pira, el virus permanece habitualmente allí y puede afectar de forma continua el comportamiento reproductor a niveles variables. El virus puede sobrevivir hasta durante tres semanas fuera del cerdo. Se producen brotes agudos de la enfermedad cuando cepas virulentas del virus infectan primero una pira susceptible, no vacunada. El virus cruza el útero y la placenta e infecta a los fetos. El cerdo es el huésped principal. Sin embargo, los perros y el ganado vacuno pueden también verse infectados, pueden mostrar síntomas nerviosos y morir.

- La **infección por citomegalovirus porcino** (PCMV - siglas en inglés) es causada por un virus herpes que se encuentra en los tejidos por todo el cuerpo, incluida la nariz de cochinitos recién nacidos en donde provoca inflamación (rinitis). La PCMV está presente por todo el mundo y existe en la mayoría si no en todas las poblaciones de cerdos, pero la mayoría de las infecciones son enfermedades sub-clínicas y las enfermedades clínicas son raras.
- 5 La serología llevada a cabo en el Reino Unido, por ejemplo, indica que más del 90% de las piaras han sido expuestas a la infección. La rinitis producida por el virus no es común y se produce principalmente en cerdos recién nacidos y no tiene relación alguna con la rinitis atrófica provocada por la bacteria *Pasteurella multocida* productora de toxinas. Por lo tanto, en la mayoría de las piaras la infección no es significativa y, excepto en algunas ocasiones que provoca un suave estornudo, no tiene ningún efecto principal sobre la salud del cerdo.
- 10 La **enfermedad del ojo azul** es una enfermedad viral que causa síntomas nerviosos, fallo reproductor y opacidad o coloración de azul de la córnea. Se observa principalmente en México, pero también ha sido reseñada en otros países. No se observa en Europa. Síntomas incluyen falta de apetito, opacidad de la córnea – conjuntivitis, síntomas nerviosos tales como paroxismos y convulsiones, una tendencia a sentarse como los perros, fiebre, recaídas incrementadas, intervalos incrementados de destete a apareamiento, partos muertos, cochinitos momificados, alta mortalidad en cochinitos, testículos hinchados y pérdida de libido.
- 15 El **virus de la encefalitis B japonesa** (JE - siglas en inglés) es un virus transmitido por mosquitos y solamente es importante en países en los que prevalecen los insectos. La mayoría de los animales domésticos se ven afectados. Causa encefalitis en el ser humano. El cerdo es una fuente importante de infección. Síntomas incluyen cochinitos momificados o nacidos muertos, síntomas nerviosos en cochinitos tales como paroxismos y convulsiones, y fluido de edema en cochinitos. También puede provocar infertilidad y testículos hinchados en verracos.
- 20 La **diarrea epidémica porcina** (PED - siglas en inglés) es causada por un coronavirus algo similar al que provoca TGE. Este virus está muy diseminado en Europa. El virus daña las vellosidades del intestino, reduciendo así la superficie de absorción, con pérdida de fluido y deshidratación. Después de la introducción del virus en una piara de crianza susceptible, se desarrolla una fuerte inmunidad a lo largo de dos a tres semanas. La inmunidad del calostro protege entonces a los cochinitos. El virus desaparece habitualmente de forma espontánea de piaras de crianza, particularmente las pequeñas (< 300 cerdas). Los brotes agudos de diarrea se producen cuando el virus se introduce por primera vez en una población susceptible. En tales casos, hasta el 100% de las cerdas pueden verse afectadas, mostrando una diarrea de ligeras a muy acuosa. Se reconocen dos cuadros clínicos: la PED de tipo I solamente afecta a cerdas de engorde, mientras que la PED de tipo II afecta a todas las edades, incluidos cerdos lechales y cerdas maduras. El periodo de incubación es de aproximadamente 2 días y la diarrea dura de 7 a 14 días. En cerdos lechales, la enfermedad puede ser leve o grave con mortalidades de hasta el 40%. En grandes piaras de crianza, particularmente si se mantienen extensamente, no todas las hembras son infectadas por vez primera y puede existir una recidiva. Esto sólo se produce en cochinitos que maman de cerdas sin anticuerpos maternos y, por lo tanto, es esporádica.
- 25 La **infección por coronavirus respiratorio porcino** (PRCV - siglas en inglés) apareció por vez primera en cerdos en Europa hace unos diez años o más. Está relacionada, pero es distinta del virus de la TGE, que es otro coronavirus. Se piensa que se transmite entre granjas por el viento y, así, es extremadamente difícil de mantener a las piaras libres del mismo. La infección tiene a menudo lugar en el cerdo lechal a las 2 a 3 semanas de edad, pero carece de importancia. Puede tener un efecto sobre el tejido de los pulmones cuando están presentes otros agentes patógenos respiratorios en complejos de enfermedades respiratorias crónicas. Habitualmente, las cerdas no presentan síntomas, pero puede producirse un acceso de tos en presencia de otros agentes respiratorios. En cochinitos puede estar presente un acceso transitorio de tos. En cerdos de destete y de engorde, las piaras expuestas por vez primera tienen pocos síntomas de la enfermedad, si los tienen. El síntoma más común es un acceso transitorio de tos que dura sólo unas pocas horas.
- 30 La **infección por rotavirus** es una infección vírica que está muy extendida en poblaciones de cerdos. Está presente en la mayoría, si no en todas las piaras de cerdos con virtualmente un 100% de sero-conversión en la manada adulta. Un rasgo epidemiológico adicional es su persistencia fuera del cerdo en donde es resistente a los cambios medioambientales y a muchos desinfectantes. Los anticuerpos maternos persisten durante 3-6 semanas, después de lo cual los cerdos se vuelven susceptibles a la infección, pero la exposición no desemboca necesariamente en una enfermedad. Se estima que sólo el 10-15% de diarreas en los cerdos se inician por una infección por rotavirus primaria. En la piara madura, la enfermedad aparece después de que los cochinitos tengan 7 a 10 días de edad. Se convierte progresivamente en menos importante con la edad. Sin embargo, si están presentes cepas patógenas de *E. coli*, puede producirse una enfermedad grave con alta mortalidad.
- 35 La **rabia** es causada por un virus y se considera una enfermedad rara en cerdos. Es invariablemente fatal en todas las especies, incluido el ser humano - de ahí su importancia. La rabia está ausente del Reino Unido, pero está presente en muchos otros países por todo el mundo. La infección en cochinitos y cerdas es rara. En cerdas, cerdos de destete y cerdos de engorde el comienzo de la enfermedad es súbito, con síntomas que incluyen un tic nervioso de los músculos de la cara, paroxismos y convulsiones, masticación rápida, salivación, músculos que pueden espasmarse y puede producirse una parálisis posterior. La muerte tiene lugar habitualmente en el espacio de 3 días.
- 40 La **enfermedad vesicular porcina** (SVD - siglas en inglés) es causada por un virus diferente de los virus que
- 45
- 50
- 55
- 60

provocan la fiebre aftosa (FMD - siglas en inglés). Sin embargo, produce una enfermedad en cerdos que no se puede distinguir clínicamente de la FMD. Esta enfermedad debería ser siempre considerada si aparece una repentina difusión de cojera con vesículas o blisters en el hocico, lengua y partes superiores de las uñas.

5 La **tuberculosis** afecta a mamíferos, incluidas personas, aves y cerdos. El organismo causante, *Mycobacterium tuberculosis*, se sub-clasifica en tipos, humano, bovino y aviar. Al tipo aviar se le alude como *M. avium* o, más frecuentemente, como complejo *aviar/intracelular*, ya que no es una especie uniforme. *M. avium* infecta principalmente a aves, pero también se encuentra en el medio ambiente junto con *M. intracellulare* que es predominantemente saprofítico o de vida en libertad. Los cerdos son raramente infectados por los tipos humano o bovino, pero son infectados por el complejo aviar/intracelular. El complejo *aviar/intracelular* también provoca
10 infección sub-clínica no-progresiva en personas sanas. La preocupación principal es que podría provocar una enfermedad más grave en personas desprovistas del sistema inmune y en personas con SIDA. En la mayoría de los países, si se encuentran lesiones en el cuello en el matadero, se desecha la cabeza entera y si se encuentran en los nódulos linfáticos mesentéricos que drenan los intestinos se condenan las asaduras. Si estas lesiones están más difundidas por el cuerpo, lo cual es raro, puede condenarse o cocerse la carcasa entera. Si por parte del inspector
15 cárnico se pasan por alto pequeñas lesiones, una cocción normal en la cocina destruye el organismo. En todos los cerdos la infección provoca pequeños nódulos en los nódulos linfáticos del cuello y los que drenan el intestino delgado. En la gran mayoría de casos, las lesiones son no progresivas, no se extienden por el cuerpo, no hacen enfermar al cerdo y no se excretan. No existen síntomas clínicos y no existe diferencia en el comportamiento entre cerdos infectados y no infectados.

20 El **virus del exantema vesicular de cerdos** (VES - siglas en inglés) es diferente de los causantes de la fiebre aftosa (FMD) y la enfermedad vesicular en cerdos (SVD), pero produce una enfermedad en cerdos que no se puede distinguir clínicamente de FMD y SVD. A diferencia de FMD, solamente afecta a cerdos. Los síntomas incluyen una mortalidad baja, pero pueden existir algunas muertes en cochinitos lechales. Otros síntomas incluyen salivación, inapetencia y vesículas en torno a la boca, nariz, lengua y pies.

25 La **estomatitis vesicular** (VS - siglas en inglés) causa una enfermedad que ocurre principalmente en América del Sur y en Centroamérica, ocasionalmente en los EE.UU. y raramente en forma de epidemias tan al Norte como Canadá y tan al Sur como Argentina. El virus VS produce una enfermedad en cerdos que no se puede distinguir clínicamente de FMD, SVD y VES. Sin embargo, lo más frecuentemente la infección de los cerdos es subclínica. En todos los cerdos la infección se caracteriza por el babeo de saliva, lesiones en los pies y cojera, una reducción en la
30 tasa de desarrollo, un aumento de la temperatura corporal hasta 40-41°C, la aparición de vesículas (blisters) de hasta 30 mm de diámetro en la nariz, los labios, las tetas y en torno a las coronas de los cascos que pueden hacer parecer cojos a los cerdos. La mortalidad es habitualmente baja y la mayoría de los cerdos se recupera en una a dos semanas.

35 La **rinitis atrófica, es una enfermedad progresiva y no progresiva**, que causa inflamación de la nariz y puede ser causada por una diversidad de bacterias y sustancias irritantes. Durante el proceso de la infección, las estructuras delicadas o las conchas nasales en la nariz son dañadas y se atrofian o desaparecen. La rinitis atrófica progresiva describe una enfermedad específica en donde los tejidos de la nariz se atrofian permanentemente. Esta rinitis es provocada por cepas de *Pasteurella multocida* (PMt) productoras de una toxina específica. Existen dos tipos, A y D. En cerdos lechales, los primeros síntomas son el estornudo, resoplidos y una descarga nasal, pero en brotes agudos
40 en donde hay pocos anticuerpos maternos, la rinitis puede ser tan grave hasta el punto que se produce una hemorragia de la nariz. Hacia las tres a cuatro semanas de edad y desde el destete hacia delante existe evidencia de rasgón y una malformación de la nariz asociada con un retorcimiento y un acortamiento. Los cerdos gravemente afectados pueden tener problemas al comer. Existe una ganancia de peso diaria considerablemente reducida. En brotes graves, los cerdos no pueden desarrollarse hasta alcanzar el peso del mercado.

45 Los **virus de la encefalitis equina del Este** (EEEV - siglas en inglés) son miembros del género *Alphavirus*, familia Togaviridae. Los EEEV pueden ser transmitidos a animales equinos y seres humanos la picadura de un mosquito infectado. Además de caballos y seres humanos, los EEEV pueden producir una enfermedad grave en especies comunes de ganado tales como cerdos y ganado vacuno. Los EEEV, o anticuerpos específicos para el virus, han sido recuperados de aves tales como pavo, faisán, codorniz, avestruz y emú, entre otras.

50 La **artritis por Mycoplasma** es causada por una infección por *Mycoplasma hyosynoviae*. Esta artritis se caracteriza por la inflamación de una o más articulaciones y es común en todos los cerdos y cerdas lechales y de engorde. Sin embargo, es rara en cochinitos.

También causan infección en cerdos los **adenovirus** y el **virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante**.

55 Por consiguiente, lo que se necesita en la técnica es un método de obtener proteína ORF2 que no requiera de la extracción de la proteína ORF2 del interior de células infectadas. Lo que se necesita adicionalmente son métodos de obtención de la proteína ORF2 recombinante en cantidades suficientes para preparar eficazmente composiciones de vacunas. Lo que sigue necesitándose adicionalmente son métodos para obtener proteína ORF2 que no requieran los métodos complicados y laboriosos requeridos por los actuales protocolos de extracción de la proteína ORF2. Finalmente, con respecto a las composiciones, lo que se necesita en la técnica es una composición inmunogénica

que confiera inmunidad protectora frente a una infección por PCV2 y que reduzca la gravedad o evite los síntomas clínicos asociados a la misma.

La técnica anterior incluye Vaccine 21, 2003, 4565-4575, que describe un protocolo de sensibilización-refuerzo para la vacunación contra PCV2 basado en el uso de la proteína ORF2 de PCV2.

5 Sumario de la invención

La invención proporciona:

[1] Una vacuna combinada multivalente para uso en un método para

- (i) la prevención de una infección por PCV2, o de reinfección por PCV2 o
- (ii) la reducción o eliminación de los síntomas clínicos causados por PCV2

10 en un sujeto, donde debe administrarse una dosis de la vacuna por vía intramuscular al sujeto y donde

- (i) dicha prevención de una infección por PCV2, o de reinfección por PCV2 o
- (ii) dicha reducción o eliminación de los síntomas clínicos causados por PCV2, se obtiene mediante una única administración de la vacuna,

y donde la vacuna incluye

15 - una composición antigénica obtenible mediante un método que comprende:

- i) preparar y recuperar la proteína ORF2 de PCV2 recombinante, y
- ii) mezclarla con un coadyuvante adecuado

y

- al menos un componente activo inmunogénico contra otro organismo causante de enfermedades en el cerdo.

20 [2] La vacuna combinada multivalente según [1] para el uso de [1], en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 recombinante se puede obtener (i) permitiendo la infección de células susceptibles en cultivo con un vector viral de baculovirus recombinante que contiene secuencias de ADN que codifican la proteína ORF2 de PCV2, en donde la proteína ORF2 es expresada por el vector viral de baculovirus recombinante, y (ii) recuperando posteriormente dicha ORF2 en el sobrenadante.

25 [3] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [2] para el uso de uno cualquiera de [1] a [2], donde dicha vacuna comprende un vector viral de baculovirus inactivado y sobrenadante de cultivo celular, donde dicho vector viral se inactiva opcionalmente mediante la adición de BEI, y en donde además opcionalmente BEI se neutraliza con tiosulfato de sodio.

30 [4] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [3] para el uso de uno cualquiera de [1] a [3], en donde dicha vacuna comprende un coadyuvante.

[5] La vacuna combinada multivalente de [4] para el uso de [4], en donde dicho coadyuvante se selecciona del grupo que consiste en polímeros acrílicos y polímeros de ácido metacrílico.

[6] La vacuna combinada multivalente de [4] o [5] para el uso de [4] o [5], en donde dicho coadyuvante es un carbómero.

35 [7] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [6] para el uso de uno cualquiera de [1] a [6], en donde dicha vacuna comprende de 500 µg a 5 mg de coadyuvante por dosis.

[8] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [7] para el uso de uno cualquiera de [1] a [7], en donde dicha vacuna comprende de 4 µg a 400 µg de proteína ORF2 de PCV2 recombinante por dosis, o de 2 µg a 150 µg de proteína ORF2 de PCV2 recombinante por dosis.

40 [9] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [8] para el uso de uno cualquiera de [1] a [8], en donde dicho componente activo inmunogénico eficaz contra otro organismo causante de enfermedad en cerdos se selecciona del grupo que consiste en un antígeno de: *Actinobacillus pleuroneumoniae*; *Adenovirus*; *Alfavirus* tales como los virus de la encefalomiелitis equina del este; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., preferiblemente *B. hyodysenteriae*; *B. piosicoli*, *Brucella suis*, preferiblemente biovariedades 1, 2 y 3; Virus de la peste porcina clásica; *Clostridium* spp., preferiblemente *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* tipos A, B y C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; *Coronavirus*, preferiblemente coronavirus respiratorio porcino; *Eperitrozoonosis* porcina; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, preferiblemente subtipos 1, 7 y 14; Virus de la

- encefalomielitis hemaglutinante; Virus de la encefalitis japonesa; Lawsonia intracellularis; Leptospira spp., preferiblemente Leptospira australis; Leptospira canicola; Leptospira grippotyphosa; Leptospira icterohaemorrhagicae; y Leptospira interrogans; Leptospira pomona; Leptospira tarassovi; Mycobacterium spp., preferiblemente M. avium, M. intracellulare y M. bovis; Mycoplasma hyopneumoniae (M hyo); Pasteurella multocida; Citomegalovirus porcino; Parvovirus porcino; Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS); Virus de la pseudorrabia; Rotavirus; Salmonella spp., preferiblemente S. thyphimurium y S. choleraesuis; Staph. hyicus; Staphylococcus spp., Streptococcus spp., preferiblemente Strep. suis; Virus del herpes porcino; Virus de la gripe porcina; Virus de la viruela porcina; Virus de la estomatitis vesicular; y Virus del exantema vesicular del cerdo.
- 5
- 10 [10] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [9] para el uso de uno cualquiera de [1] a [9], en donde dicho componente activo inmunogénico adicional es un componente activo inmunológico de Mycoplasma hyopneumoniae y un componente activo del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
- 15 [11] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [9] para el uso de uno cualquiera de [1] a [9], en donde dicho componente activo inmunogénico adicional es un componente activo inmunológico del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
- [12] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [9] para el uso de uno cualquiera de [1] a [9], en donde dicho componente activo inmunogénico adicional es un componente activo inmunológico de Mycoplasma hyopneumoniae.
- 20 [13] La vacuna combinada multivalente de [10] u [11] para el uso de [10] u [11] para la profilaxis de infecciones causadas por PCV2 y PRRSV.
- [14] La vacuna combinada multivalente de [10] o [12] para el uso de [10] o [12] para la profilaxis de infecciones causadas por PCV2 y Mycoplasma hyopneumoniae.
- [15] La vacuna combinada multivalente de [10] para el uso de [10] para la profilaxis de infecciones causadas por PCV2, PRRSV y Mycoplasma hyopneumoniae.
- 25 [16] La vacuna combinada multivalente de uno cualquiera de [1] a [15] para el uso de uno cualquiera de [1] a [15], en donde el sujeto es un cerdo o un lechón.
- [17] Uso de una proteína ORF2 de PCV2 recombinante en la fabricación de una vacuna combinada para
- (i) la prevención de una infección por PCV2, o una reinfección por PCV2 o
- (ii) la reducción o eliminación de los síntomas clínicos causados por PCV2
- 30 en un sujeto por administración intramuscular de una dosis de dicha vacuna, donde
- (i) dicha prevención de una infección por PCV2, o reinfección por PCV2 o
- (ii) dicha reducción o eliminación de los síntomas clínicos provocados por PCV2, se obtiene mediante una única administración de la vacuna,
- incluyendo la vacuna
- 35 - una composición antigénica obtenible mediante un método que comprende:
- (i) preparar y recuperar la proteína ORF2 de PCV2 recombinante, y
- (ii) mezclarla con un coadyuvante adecuado
- y
- al menos un componente activo inmunogénico contra otro organismo causante de enfermedad en el cerdo.
- 40 La presente invención supera los problemas inherentes en la técnica anterior y proporciona un avance preciso en el estado de la técnica. Específicamente, un aspecto de la presente descripción proporciona métodos mejorados para producir y/o recuperar proteína ORF2 de PCV2 recombinante, **i)** permitiendo la infección de células susceptibles en cultivo con un vector viral recombinante que contenga secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2, en donde la proteína ORF2 es expresada por el vector viral recombinante, y **ii)** después de ello, recuperar la ORF2 en
- 45 el sobrenadante. Inesperadamente, se ha descubierto que ORF2 es liberada en el sobrenadante en grandes cantidades si se deja que la infección y subsiguiente incubación de las células infectadas progresen hasta más allá del típico proceso de recuperación de ORF2 de PCV2 anterior, que extrae la ORF2 de PCV2 del interior de células. Además, se ha encontrado, sorprendentemente, que la proteína ORF2 de PCV es robusta frente a la degradación prototípica fuera de las células de producción. Los dos hallazgos juntos permiten una recuperación en grandes
- 50 cantidades de proteína ORF2 de PCV2 a partir del sobrenadante de cultivos celulares infectados con vectores

- virales recombinantes que contienen un ADN de ORF2 de PCV2 y que expresan la proteína ORF2 de PCV2. Altas cantidades de proteína ORF2 de PCV2 significa más de aproximadamente 20 µg/mL de sobrenadante, de preferencia más de aproximadamente 25 µg/mL, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 30 µg/mL, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 40 µg/mL, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 50 µg/mL, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 60 µg/mL, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 80 µg/mL, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 100 µg/mL, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 150 µg/mL, lo más preferiblemente más de aproximadamente 190 µg/mL. Estas tasas de expresión también se pueden conseguir, por ejemplo, por los métodos según se describen en los Ejemplos 1 a 3.
- 5 Cultivos de células preferidos tienen un recuento de células entre aproximadamente $0,3 - 2,0 \times 10^6$ células/mL, más preferiblemente de aproximadamente $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, todavía más preferiblemente de aproximadamente $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, incluso más preferiblemente de aproximadamente $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL, y lo más preferiblemente de aproximadamente $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. Las células preferidas se pueden determinar por los expertos en la técnica. Células preferidas son aquellas susceptibles de infección con un vector viral recombinante apropiado que contiene un ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, las células son células de insectos y, más preferiblemente, incluyen las células de insectos vendidas bajo la marca registrada Sf+ insect cells (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT).

Los medios de crecimiento apropiados también podrán ser determinados por los expertos en la técnica, siendo un medio de crecimiento preferido medio de células de insecto exento de suero, tal como Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) y similares. Vectores virales preferidos incluyen baculovirus tal como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), en particular si las células de producción son células de insectos. A pesar de que se prefiere el sistema de expresión de baculovirus, se entiende por los expertos en la técnica que otros sistemas de expresión funcionarán para los fines de la presente invención, a saber la expresión de ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de un cultivo de células. Estos otros sistemas de expresión pueden requerir el uso de una secuencia señal con el fin de determinar la expresión de ORF2 en los medios. Sorprendentemente, se ha descubierto que cuando ORF2 es producida por un sistema de expresión de baculovirus, no requiere ninguna secuencia señal ni modificación ulterior para determinar la expresión de ORF2 en el medio. Se piensa que esta proteína puede formar, independientemente partículas similares a virus (Journal of General Virology Vol. 81, págs. 2281-2287 (2000) y puede ser secretada en el sobrenadante del cultivo. El vector viral recombinante que contiene las secuencias de ADN de ORF2 de PCV2 tiene una multiplicidad de infección (MOI - siglas en inglés) preferida de entre aproximadamente 0,03 - 1,5, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 - 1,3, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,09 - 1,1, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,1 - 1,0, cuando se utiliza para la infección de las células susceptibles. Preferiblemente, las MOIs arriba mencionadas se refieren a un mL de fluido del cultivo celular. Preferiblemente, el método descrito en esta memoria comprende la infección de $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, todavía más preferiblemente de aproximadamente $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, incluso más preferiblemente de aproximadamente $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL, y lo más preferiblemente de aproximadamente $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL con un vector viral recombinante que contiene un ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa la proteína ORF de PCV2 con una MOI (multiplicidad de infección) de entre aproximadamente 0,03 - 1,5, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 - 1,3, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,09 - 1,1, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,1 - 1,0.

Las células infectadas se incuban luego a lo largo de un periodo de hasta diez días, más preferiblemente de aproximadamente dos días a aproximadamente diez días, todavía más preferiblemente de aproximadamente cuatro días a aproximadamente nueve días, y lo más preferiblemente de aproximadamente cinco días a aproximadamente ocho días. Condiciones de incubación preferidas incluyen una temperatura entre aproximadamente 22 - 32°C, más preferiblemente de aproximadamente 24 - 30°C, todavía más preferiblemente de aproximadamente 25 - 29°C, incluso más preferiblemente de aproximadamente 26 - 28°C, y lo más preferiblemente de aproximadamente 27°C. Preferiblemente, las células Sf+ se observan después de la inoculación en cuanto a cambios característicos inducidos por baculovirus. Una observación de este tipo puede incluir la vigilancia de las tendencias de densidad celular y la disminución en la viabilidad durante el periodo post-infección. Se encontró que el título pico de virus es observado 3-5 días después de la infección y la liberación pico de ORF2 a partir de las células en el sobrenadante se obtiene entre los días 5 y 8, y/o cuando la viabilidad de las células desciende a menos de 10%.

Así, un aspecto de la presente descripción proporciona un método mejorado para producir y/o recuperar proteína ORF2 recombinante de PCV2, preferiblemente en cantidades descritas anteriormente, i) permitiendo la infección de un cierto número de células susceptibles (véase arriba) en cultivo con un vector viral recombinante con una MOI según se define arriba, ii) expresando la proteína ORF2 de PCV2 por parte del vector viral recombinante, y iii) después de ello, recuperando la ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o la viabilidad de las células desciende a menos de 10%. Preferiblemente, el vector viral recombinante es un baculovirus recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2 y las células son células Sf+. Adicionalmente, se prefiere que el cultivo sea examinado periódicamente en cuanto a la evidencia macroscópica y microscópica de contaminación o en cuanto a cambios atípicos en la morfología de la célula durante el periodo post-infección. Debería desecharse todo cultivo que exhiba cualquier contaminación. Preferiblemente, la proteína recombinante ORF2 expresada es secretada por las células en el medio de crecimiento que las rodea que mantiene la viabilidad celular. La ORF2 se recupera luego en el sobrenadante que rodea a las

células más que de las propias células.

El proceso de recuperación comienza preferiblemente con la separación de desecho de las células de la ORF2 expresada en el medio a través de una etapa de separación. Etapas de separación preferidas incluyen filtración, centrifugación a velocidades de hasta aproximadamente 20.000xg, centrifugación en flujo continuo, separación cromatográfica utilizando intercambio de iones o filtración en gel, y métodos de inmunofinidad convencionales. Esos métodos son conocidos por las personas expertas en la técnica, por ejemplo por (Harris y Angel (comps.), Protein purification methods – a practical approach, IRL press Oxford 1995). Los métodos de separación más preferidos incluyen centrifugación a velocidades de hasta aproximadamente 20.000xg y filtración. Métodos de filtración preferidos incluyen microfiltración de extremo muerto y filtración de flujo tangencial (o flujo cruzado), incluida filtración de fibras huecas-microfiltración de extremo muerto. De éstas, se prefiere la microfiltración de extremo muerto. Tamaños de poros preferidos para la microfiltración de extremo muerto se encuentran entre aproximadamente 0,30 - 1,35 µm, más preferiblemente entre aproximadamente 0,35 - 1,25 µm, todavía más preferiblemente entre aproximadamente 0,40 - 1,10 µm, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 0,45 - 1,0 µm. Se piensa que cualquier membrana de filtración convencional funcionará para los fines de la presente invención, y se prefieren membranas de polietersulfona. Cualesquiera especies de ácido nucleico de bajo peso son separadas durante la etapa de filtración.

Así, un aspecto adicional de la presente descripción proporciona un método mejorado para producir y/o recuperar proteína ORF2 recombinante de PCV2, preferiblemente en cantidades descritas anteriormente, **i)** permitiendo la infección de un cierto número de células susceptibles (véase arriba) en cultivo con un vector viral recombinante con una MOI según se define arriba, **ii)** expresando la proteína ORF2 de PCV por parte del vector viral recombinante, **iii)** recuperando la ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o la viabilidad de las células desciende a menos de 10%, y **iv)** separando el desecho de células de la ORF2 de PCV2 a través de una etapa de separación. Preferiblemente, el vector viral recombinante es un baculovirus que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 y las células son células Sf+. Etapas de separación preferidas son las descritas anteriormente. Lo más preferido es una microfiltración de extremo muerto utilizando una membrana con un tamaño de poros entre aproximadamente 0,30 - 1,35 µm, más preferiblemente entre aproximadamente 0,35 - 1,25 µm, todavía más preferiblemente entre aproximadamente 0,40 - 1,10 µm, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 0,45 - 1,0 µm.

Para la recuperación de ORF2 de PCV2 que se utilizará en una composición inmunogénica o inmunológica tal como una vacuna, se prefiere la inclusión de una etapa de inactivación con el fin de inactivar el vector viral. Una "composición inmunogénica o inmunológica" se refiere a una composición de materia que comprende al menos un antígeno que provoca una respuesta inmunológica en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas y/o células T yd, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped exhibirá una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de modo que esa resistencia a la nueva infección resultará reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad quedará reducida. Una protección de este tipo se demostrará por una reducción o carencia de síntomas exhibidos normalmente por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título vírico disminuido en el huésped infectado. Así, la presente descripción también se refiere a un método para producir y/o recuperar proteína ORF2 recombinante de PCV2, preferiblemente en cantidades descritas anteriormente, **i)** permitiendo la infección de un cierto número de células susceptibles (véase arriba) en cultivo con un vector viral recombinante con una MOI según se define arriba, **ii)** expresando la proteína ORF2 de PCV por parte del vector viral recombinante, **iii)** recuperando la ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o la viabilidad de las células desciende a menos de 10%, **iv)** separando el desecho de células de la ORF2 de PCV2 a través de una etapa de separación y **v)** inactivando el vector viral recombinante.

Preferiblemente, esta inactivación se hace justo antes o justo después de la etapa de filtración, siendo después de la etapa de filtración el tiempo preferido para la inactivación. Para los fines de la presente invención se puede utilizar cualquier método de inactivación convencional. Así, la inactivación se puede efectuar mediante tratamientos químicos y/o físicos. En formas preferidas, se determina el volumen de los fluidos recolectados y la temperatura es llevada a un intervalo entre aproximadamente 32 - 42°C, más preferiblemente entre aproximadamente 34 - 40°C, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 35 - 39°C. Métodos de inactivación preferidos incluyen la adición de etilenimina binaria ciclizada (BEI - siglas en inglés), preferiblemente en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, todavía más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, todavía más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5 mM. Por ejemplo, la inactivación incluye la adición de una solución de hidrobromuro de 2-bromoetilenamina, preferiblemente de aproximadamente 0,4 M, que se ha ciclizado a etilenimina binaria (BEI) 0,2 M en NaOH 0,3 N a los fluidos para dar una concentración final de aproximadamente 5 mM de BEI. Preferiblemente, los fluidos se agitan entonces continuamente durante 72 - 96 horas y los fluidos recolectados inactivados pueden ser almacenados congelados a -40°C o menos o entre aproximadamente 1 - 7°C. Después de haberse completado la inactivación, se añade una solución de tiosulfato de sodio, preferiblemente a 1,0 M para neutralizar toda BEI residual. Preferiblemente, el

tiosulfato de sodio se añade en una cantidad equivalente en comparación con la BEI añadida antes de la inactivación. Por ejemplo, en el caso de añadir BEI hasta una concentración final de 5 mM, se añade una solución de tiosulfato de sodio 1,0 M para dar una concentración mínima final de 5 mM para neutralizar toda BEI residual.

5 Así, un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un método para producir proteína ORF2 recombinante de PCV2, preferiblemente en cantidades descritas anteriormente, **i)** permitiendo la infección de un cierto número de células susceptibles (véase arriba) en cultivo con un vector viral recombinante con una MOI según se define arriba, **ii)** expresando la proteína ORF2 de PCV por parte del vector viral recombinante, **iii)** recuperando la ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o la viabilidad de las células desciende a menos de 10%, **iv)** separando el desecho de células de la ORF2 de PCV2 a través de una etapa de separación y **v)** inactivando el vector viral recombinante. Preferiblemente, el vector viral recombinante es un baculovirus que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 y las células son células Sf+. Etapas de separación preferidas son las arriba descritas, la más preferida es la etapa de filtración. Etapas de inactivación preferidas son las descritas anteriormente. Preferiblemente, la inactivación se efectúa entre aproximadamente 35 - 39°C y en presencia de BEI 2 a 8 mM, y todavía más preferiblemente en presencia de BEI aproximadamente 5 mM. Sorprendentemente, se ha encontrado que concentraciones superiores de BEI afectan negativamente a la proteína ORF2 de PCV2.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente descripción, el método arriba descrito incluye también una etapa de neutralización después de la etapa **v)**. Esta etapa **vi)** comprende añadir una cantidad equivalente de un agente que neutraliza al agente de inactivación en el interior de la solución. Preferiblemente, si el agente de inactivación es BEI, se prefiere la adición de tiosulfato de sodio a una cantidad equivalente. Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la etapa **vi)** comprende añadir una solución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 mM, preferiblemente de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 mM, todavía más preferiblemente de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM, todavía más preferiblemente de aproximadamente 3 hasta aproximadamente 7 mM, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI.

En formas preferidas y, especialmente, en formas que utilicen la proteína ORF2 recombinante de PCV2 en una composición inmunogénica tal como una vacuna, se someterá a ensayo cada lote de ORF2 recolectada para la inactivación mediante la pasada en las células Sf+ dependientes del anclaje, susceptibles a baculovirus. En una forma preferida de este ensayo, 150 cm² de monocapa de cultivo celular apropiado se inoculan con 1,0 mL de fluidos de PCV2 inactivados y se mantienen a 25 - 29°C durante 14 días con al menos dos pasadas. Al final del periodo de mantenimiento, las monocapas de células se examinan en cuanto al efecto citopatogénico (CPE - siglas en inglés) típico de baculovirus de ORF2 de PCV2. Preferiblemente, también se utilizan controles de virus positivos. Este tipo de controles pueden consistir en un cultivo de células Sf+ inoculadas con un baculovirus de ORF2 de PCV2 de referencia no inactivado y un matraz de células Sf+ que permanecen sin inocular. Después de la inoculación y de la pasada, la ausencia de células infectadas con virus en los fluidos virales tratados con BEI constituirían un ensayo de inactivación satisfactorio. Las células control inoculadas con el virus de referencia deberían exhibir un CPE típico de baculovirus de ORF2 de PCV2, y el matraz no inoculado no debería mostrar evidencia alguna de un CPE de baculovirus de ORF2 de PCV2. Alternativamente, al final del periodo de mantenimiento, las muestras de sobrenadante se podrían recoger e inocular en una placa de 96 pocillos con Sf+, que ha sido cargada con células Sf+, y luego se podrían mantener a 25 - 29°C durante 5 - 6 días. La placa se fija luego y se tiñe con anticuerpo de ORF2 anti-PCV2 conjugado a FITC. La ausencia del CPE y la expresión de ORF2, según se detecta por microscopía IFA, en los fluidos virales tratados con BEI constituye un ensayo de inactivación satisfactorio. Las células control inoculadas con el virus de referencia deberían exhibir un CPE y actividad de IFA y el matraz no inoculado no debería mostrar evidencia alguna de CPE de baculovirus de ORF2 de PCV2 ni contener actividad de IFA.

45 Así, un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un ensayo de inactivación para determinar la eficacia de la inactivación del vector viral de recombinación, que comprende las etapas de: **i)** poner en contacto al menos una parte del fluido del cultivo que contiene el vector viral recombinante con un agente inactivante, preferiblemente como se describe arriba, **ii)** añadir un agente de neutralización para neutralizar el agente de inactivación, preferiblemente según se describe arriba, y **iii)** determinar la infectividad residual mediante los ensayos según se describe arriba.

Un aspecto adicional de la descripción se refiere a un método para construir un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2 en cantidades elevadas cuando se infecta en células susceptibles. Sorprendentemente, se ha encontrado que el vector viral recombinante, según se proporciona con la presente, expresa cantidades elevadas, según se definen arriba, de ORF2 de PCV2 después de infectar células susceptibles. Por lo tanto, la presente descripción también se refiere a un método mejorado para producir y/o recuperar proteína ORF2 de PCV2, que comprende preferiblemente las etapas de: construir un vector viral recombinante que contenga ADN de ORF2 de PCV2 y que exprese proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, el vector viral es un baculovirus recombinante. En lo que sigue se describen detalles del método para construir vectores virales recombinantes que contengan ADN de ORF2 de PCV2 y que expresen proteína ORF2 de PCV2, según se proporciona con la presente: en formas preferidas, el vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2, utilizado para infectar las células se genera transfecando un vector de transferencia que ha tenido un gen ORF2 clonado en él en un vector viral. Preferiblemente, sólo la

porción del vector de transferencia que contiene el ADN de ORF2 es transfectada en el vector viral. La expresión "transfectada en un vector viral" significa, y se utiliza como sinónimo de "introducir" o "clonar" un ADN heterólogo en un vector viral tal como, por ejemplo, en un vector de baculovirus. El vector viral es preferible, pero no necesariamente un baculovirus.

5 Así, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el vector viral recombinante se genera por recombinación entre un vector de transferencia que contiene el ADN de ORF2 de PCV2 heterólogo y un vector viral, preferiblemente un baculovirus, incluso más preferiblemente un baculovirus linearizado, deficiente en la replicación (tal como ADN Baculo Gold). Un "vector de transferencia" significa una molécula de ADN, que incluye al menos un origen de replicación, el gen heterólogo, en el presente caso ORF2 de PCV2, y secuencias de ADN que
10 permiten la clonación de dicho gen heterólogo en el vector viral. Preferiblemente, las secuencias que permiten la clonación del gen heterólogo en el vector viral están flanqueando al gen heterólogo. Incluso más preferiblemente, las secuencias flanqueantes son al menos homólogas en partes con secuencias del vector viral. La homología de secuencias permite entonces la recombinación de las dos moléculas, el vector viral y el vector de transferencia para generar un vector viral recombinante que contiene el gen heterólogo. Un vector de transferencia preferido es el vector pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen), el cual está diseñado para la co-transfección con el ADN BaculoGold en la línea de células Sf+ preferida. Preferiblemente, dicho vector de transferencia comprende un ADN de ORF2 de PCV2. La construcción co-transfectada es de una longitud de aproximadamente 10.387 pares de bases.

En formas más preferidas, los métodos de la presente descripción comenzarán con el aislamiento de ADN de ORF2 de PCV2. Generalmente, éste puede ser de una cepa conocida o desconocida, ya que el ADN de ORF2 parece
20 estar muy conservado, con al menos una identidad de secuencia de aproximadamente el 95% entre los diferentes elementos aislados. Para los fines de la presente invención se puede utilizar cualquier gen de ORF2 de PCV2 conocido en la técnica, ya que cada uno sería expresado en el sobrenadante. El ADN de ORF2 de PCV se amplifica preferiblemente utilizando métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), incluso más preferiblemente junto con la introducción de una secuencia consenso de Kozak 5' flanqueante (CCGCCAUG) (SEQ ID NO 1) y/o un sitio EcoR1 3' flanqueante (GAATTC) (SEQ ID NO 2). Una introducción de este tipo de un consenso de Kozak 5' separa preferiblemente el codón de iniciación AUG de ORF2 de PCV2, que se produce en la naturaleza. El sitio 3' EcoR1 se introduce preferiblemente más abajo del codón de terminación del ORF2 de PCV2. Más preferiblemente, se introduce más abajo de una secuencia de terminación de la transcripción poli A, la cual, por sí misma, está situada más abajo del codón de terminación de ORF2 de PCV2. Se ha encontrado que el uso de una secuencia
30 consenso de Kozak, en particular según se describe arriba, aumenta el nivel de expresión de la siguiente proteína ORF2 de PCV2. El ADN de ORF2 de PCV2 amplificado con estas secuencias adicionales se clona en un vector. Un vector preferido para esta etapa de clonación inicial es el vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). El ADN de ORF2 de PCV2 que incluye algunas secuencias del vector pGEM (SEQ ID NO: 7) se escinde preferiblemente del vector en el sitio de restricción Not1. El ADN resultante se clona luego en el vector de transferencia.
35

Así, en un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para construir un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2. Este método comprende las etapas de: **i)** clonar una ORF2 de PCV2 recombinante en un vector de transferencia; y **ii)** transfectar la porción del vector de transferencia que contiene la ORF2 de PCV2 recombinante en un vector viral, para generar el vector viral recombinante. Preferiblemente, el vector
40 de transferencia es el arriba descrito o se construye según se describe arriba o como se muestra de forma ejemplar en la Figura 1. Así, de acuerdo con un aspecto adicional, el vector de transferencia, utilizado para la construcción del vector viral recombinante según se describe en esta memoria, contiene la secuencia de SEQ ID NO: 7.

De acuerdo con un aspecto adicional, este método comprende, además, antes de la etapa **i)**, la etapa siguiente: amplificar el ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde las secuencias flanqueantes del ADN de ORF2 de PCV2 se modifican según se describe arriba. Métodos *in vitro* para amplificar el ADN de ORF2 de PCV2 y modificar las
45 secuencias flanqueantes, clonar *in vitro* el ADN de ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia y vectores de transferencia adecuados se describen arriba, mostrados de forma ejemplar en la Figura 1, o conocidos por una persona experta en la técnica. Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para construir un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2, que comprende las etapas de: **i)** amplificar ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde se modifican las secuencias flanqueantes de dicho ADN de ORF2 de PCV2, **ii)** clonar el ADN de ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y **iii)** transfectar el vector de transferencia o una porción del mismo que contiene el ADN de ORF2 recombinante de PCV2 en un vector viral, para generar el vector viral recombinante. Preferiblemente, la modificación de las secuencias flanqueantes del ADN de ORF2 de PCV2 se efectúa como se describe arriba, p. ej. introduciendo una secuencia de Kozak 5' y/o un sitio EcoR1, preferiblemente como se describe arriba.
55

De acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona un método de producir y/o recuperar proteína recombinante expresada por el marco de lectura abierto 2 de PCV2. El método comprende generalmente las etapas de: **i)** clonar una ORF2 de PCV2 recombinante en un vector de transferencia; **ii)** transferir la parte del vector de transferencia que contiene la ORF2 de PCV2 recombinante en un virus; **iii)** infectar células en medios con el virus transfectado; **iv)** provocar que el virus transfectado exprese la proteína recombinante a partir de ORF2 de PCV2; **v)** separar células del sobrenadante; y **vi)** recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada a partir del sobrenadante.
60

Arriba se describen métodos de como clonar un ADN de ORF2 recombinante de PCV2 en un vector de transferencia. Preferiblemente, el vector de transferencia contiene la secuencia de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:7. Sin embargo, el vector de transferencia puede contener cualquier ADN de ORF2 de PCV2, no modificado o modificado, siempre que el ADN de ORF2 de PCV2, cuando se transfecta en un vector viral recombinante, sea expresado en el cultivo celular. Preferiblemente, el vector viral recombinante comprende la secuencia de SEQ ID NO:8. Además, arriba se describen en detalle métodos de como infectar células, preferiblemente como infectar células con un número definido de baculovirus recombinante que contienen ADN de ORF2 de PCV2 y que expresan proteína ORF2 de PCV2. Además de ello, también se describen en detalle etapas para separar células del sobrenadante, así como etapas para recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada. Cualesquiera de estas etapas específicas del procedimiento, según se describen en esta memoria, son parte del método de producir y/o recuperar proteína recombinante expresada por el marco de lectura abierto 2 de PCV2 según se describe arriba. Preferiblemente, las células son células SF+. Todavía más preferiblemente, cultivos de células preferidos tienen un recuento de células entre aproximadamente $0,3 - 2,0 \times 10^6$ células/mL, más preferiblemente de aproximadamente $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, todavía más preferiblemente de aproximadamente $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, incluso más preferiblemente de aproximadamente $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL, y lo más preferiblemente de aproximadamente $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. Preferiblemente, el vector viral recombinante que contiene el ADN de ORF2 de PCV2 tiene una multiplicidad de infección (MOI) preferida de entre aproximadamente 0,03 - 1,5, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 - 1,3, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,09 - 1,1, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,1 - 1,0, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,5 cuando se utiliza para la infección de las células susceptibles. Preferiblemente, la recuperación de la proteína ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o la viabilidad de las células disminuye hasta menos de 10%. Preferiblemente, para producir proteína ORF2 de PCV2, células se cultivan a 25 hasta 29°C. Preferiblemente, la etapa de separación es una etapa de centrifugación o una etapa de filtración.

Opcionalmente, este método puede incluir la etapa de amplificar el ADN de ORF2 de PCV2 procedente de una cepa de PCV2 antes de clonar el ADN de ORF2 de PCV2 en el vector de transferencia. En formas preferidas, una secuencia de Kozak 5', un sitio EcoR1 3' y combinaciones de los mismos también se pueden añadir a la secuencia amplificada, preferiblemente antes de o durante la amplificación. Una secuencia de Kozak 5' preferida comprende la SEQ ID NO: 1. Un sitio EcoR1 3' preferido comprende la SEQ ID NO: 2. ADN de ORF2 de PCV2 preferido comprende la secuencia de nucleótidos de Genbank nº de acceso AF086834 (SEQ ID NO: 3) y SEQ ID NO: 4. Proteína ORF2 de PCV2 recombinante preferida comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, que es la proteína codificada por la SEQ ID NO: 3 (Genbank nº de acceso AF086834) y SEQ ID NO: 6, que es la proteína codificada por la SEQ ID NO: 4. Medios preferidos comprenden medios de células de insectos exentos de suero, todavía más preferiblemente medio Excell 420. Cuando se efectúa la etapa opcional de amplificación, es preferible clonar primero el marco de lectura abierto 2 amplificado en un primer vector, escindir el marco de lectura abierto 2 del primer vector y utilizar el marco de lectura abierto escindido para la clonación en el vector de transferencia. Una línea de células preferida para la co-transfección es la línea de células SF+. Un virus preferido para la cotransfección es baculovirus. En formas preferidas de este método, la porción transfectada del vector de transferencia comprende la SEQ ID NO: 8. Finalmente, para este método se prefiere recuperar la proteína del marco de lectura abierto 2 (ORF2) de PCV2 en el sobrenadante del cultivo celular, al menos 5 días después de infectar las células con el virus.

Así, un aspecto adicional de la descripción se refiere a un método para producir y/o recuperar el marco de lectura abierto 2 de PCV2, que comprende las etapas: **i)** amplificar el ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, preferiblemente añadiendo una secuencia de Kozak 5' y/o añadiendo un sitio de restricción EcoR1 3', **ii)** clonar la ORF2 amplificada de PCV2 en un vector de transferencia; **iii)** transfectar la porción del vector de transferencia que contiene la ORF2 de PCV2 recombinante en un virus; **iv)** infectar células en medios con el virus transfectado; **v)** provocar que el virus transfectado exprese la proteína recombinante a partir de ORF2 de PCV2; **vi)** separar células del sobrenadante; y **vii)** recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada a partir del sobrenadante.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un método para preparar una composición que comprende proteína ORF2 de PCV2 y vector viral inactivado. Este método comprende las etapas de: **i)** clonar la ORF2 amplificada de PCV2 en un vector de transferencia; **ii)** transferir la porción del vector de transferencia que contiene la ORF2 de PCV2 recombinante en un virus; **iii)** infectar células en medios con el vector viral transfectado; **iv)** provocar que el vector viral transfectado exprese la proteína recombinante a partir de ORF2 de PCV2; **v)** separar células del sobrenadante; **vi)** recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada a partir del sobrenadante; y **vii)** inactivar el vector viral recombinante. Preferiblemente, el vector viral recombinante es un baculovirus que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 y las células son células Sf+. Etapas de separación preferidas son las arriba descritas, la más preferida es la etapa de filtración. Etapas de inactivación preferidas son las descritas anteriormente. Preferiblemente, la inactivación se efectúa entre aproximadamente 35 - 39°C y en presencia de BEI 2 a 8 mM, todavía más preferiblemente en presencia de BEI aproximadamente 5 mM. Sorprendentemente, se ha encontrado que concentraciones mayores de BEI afectan negativamente a la proteína ORF2 de PCV2, y concentraciones menores no son eficaces para inactivar el vector viral en el espacio de 24 a 72 horas de la inactivación. Preferiblemente, la inactivación se efectúa durante al menos 24 horas, incluso más preferiblemente durante 24 a 72 horas.

De acuerdo con un aspecto adicional, el método para preparar una composición que comprende proteína ORF2 de

PCV2 y vector viral inactivado, según se describe arriba, también incluye una etapa de neutralización después de la etapa **vii**). Esta etapa **viii**) comprende añadir una cantidad equivalente de un agente que neutraliza al agente de inactivación en el interior de la solución. Preferiblemente, si el agente de inactivación es BEI, se prefiere la adición de tiosulfato de sodio a una cantidad equivalente. Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la etapa **viii**) comprende

- 5 añadir una solución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 mM, preferiblemente de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 mM, todavía más preferiblemente de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM, todavía más preferiblemente de aproximadamente 3 hasta aproximadamente 7 mM, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI.
- 10 De acuerdo con un aspecto adicional, el método para preparar una composición que comprende proteína ORF2 de PCV2 y vector viral inactivado, según se describe arriba, comprende, antes de la **i**) la etapa siguiente: amplificar el ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde las secuencias flanqueantes del ADN de ORF2 de PCV2 se modifican según se describe arriba. Métodos *in vitro* para amplificar el ADN de ORF2 de PCV2 y modificar las secuencias
- 15 flanqueantes, clonar *in vitro* el ADN de ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia y vectores de transferencia adecuados se describen arriba, mostrados de forma ejemplar en la Figura 1, o conocidos por una persona experta en la técnica. Así, de acuerdo con un aspecto adicional, este método comprende las etapas de:
- 20 **i**) amplificar ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde se modifican las secuencias flanqueantes de dicho ADN de ORF2 de PCV2, **ii**) clonar el ADN de ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y **iii**) transfectar el vector de transferencia o una porción del mismo que contiene el ADN de ORF2 recombinante de PCV2 en un vector viral para generar el vector viral recombinante, **iv**) infectar células en medios con el virus transfectado; **v**) provocar que el virus transfectado exprese la proteína recombinante a partir de ORF2 de PCV2; **vi**) separar células del sobrenadante; **vii**) recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada a partir del sobrenadante; **viii**) inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de BEI, lo más preferiblemente en presencia de aproximadamente 5 mM de BEI; y **ix**) añadir una cantidad equivalente de un agente que neutraliza el agente de inactivación dentro de la solución, preferiblemente añadiendo una solución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para preparar una composición, preferiblemente una composición antigénica tal como, por ejemplo, una vacuna, para crear una respuesta inmune contra PCV2. Generalmente, este método incluye las etapas de transfectar una construcción en un virus, en donde la construcción comprende **i**) ADN recombinante procedente de ORF2 de PCV2, **ii**) infectar células en medios de crecimiento con el virus transfectado, **iii**) provocar que el virus exprese la proteína recombinante a partir de ORF2 de PCV2, **iv**) recuperar la proteína ORF2 expresada a partir del sobrenadante, **v**) y preparar la composición al combinar la proteína recuperada con un coadyuvante adecuado y/u otros soporte farmacéuticamente aceptable.

- 35 "Adyuvantes", tal como se utilizan en esta memoria, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, p. ej. Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión se puede basar, en particular, en aceite de parafina líquido ligero (tipo de la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide tal como aceite escualano o escualeno que resulta de la teoligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri-(caprilayo/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferiblemente
- 40 tensoactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitan, de manida (p. ej. oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isosteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados, y copolímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, en especial L121. Véase Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997).

- 50 Por ejemplo, es posible utilizar la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editada por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de este mismo libro.

- Un ejemplo adicional de un coadyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Compuestos coadyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialquenoil-éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, nº 2, junio 1996). Personas expertas en la técnica también pueden aludir a la patente de EE.UU. nº 2.909.462 que describe polímeros acrílicos de este tipo reticulados con un compuesto polihidroxiado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos reemplazados por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que
- 60 contienen de 2 a 4 átomos de carbono, p. ej. vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener por sí mismos otros sustituyentes tal como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alil-

sacarosa o con alil-pentaeritritol. Entre ellos, se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Cabopol 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno, están los copolímeros EMA (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que será neutralizada, preferiblemente hasta un pH fisiológico, con el fin de dar la solución coadyuvante en donde se incorporará la propia composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna.

Adyuvantes adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan al sistema coadyuvante RIBI (Ribi Inc.), co-polímero de bloques (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil-lípido A, coadyuvante de lípido-amina Avridina, enterotoxina térmicamente lábil procedente de *E. coli* (recombinante o de otro modo), toxina cólera, IMS 1314 o dipéptido muramilo, entre muchos otros.

Preferiblemente, el coadyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el coadyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el coadyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el coadyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis. Lo más preferiblemente, el coadyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

Así, de acuerdo con un aspecto adicional, el método para preparar una composición antigénica tal como, por ejemplo, una vacuna, para crear una respuesta inmune contra PCV2 comprende **i)** preparar y recuperar proteína ORF2 de PCV2, y **ii)** mezclar esto con un coadyuvante adecuado. Preferiblemente, el coadyuvante es Carbopol 971P. Incluso más preferiblemente, Carbopol 971P se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferiblemente, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis. Preferiblemente, la etapa **i)** del procedimiento incluye las etapas del procedimiento según se describen para la preparación y recuperación de ORF2 de PCV2. Por ejemplo, en formas preferidas de este método, la construcción que comprende ADN de ORF2 de PCV2 se obtiene en un vector de transferencia. Vectores de transferencia adecuados y métodos para prepararlos se describen arriba. Opcionalmente, el método puede incluir la etapa de amplificar la ORF2 a partir de una cepa de PCV2 a través de PCR antes de clonar la ORF2 en el vector de transferencia. Secuencias del marco de lectura abierto, secuencias de Kozak, secuencias del sitio EcoR1 3', secuencias de proteínas recombinantes, secuencias de construcciones transfectadas, medios, células y virus preferidos se describen en los métodos previos. Otra etapa opcional para este método incluye clonar el ADN de ORF2 de PCV2 amplificado en un primer vector, escindir el ADN de ORF2 de este primer vector y utilizar este ADN de ORF2 de PCV2 escindido para su clonación en el vector de transferencia. Al igual que con los otros métodos, se prefiere esperar al menos 5 días después de la infección de las células por parte del baculovirus transfectado antes de recuperar la proteína ORF2 recombinante del sobrenadante. Preferiblemente, la etapa de recuperación de este método incluye también la etapa de separar los medios de las células y el desecho de células. Esto se puede hacer de una diversidad de maneras, pero por comodidad y conveniencia, se prefiere filtrar las células, el desecho de células y los medios de crecimiento a través de un filtro con poros que oscilan en tamaño de aproximadamente 0,45 µm hasta aproximadamente 1,0 µm. Finalmente, para este método se prefiere incluir una etapa de inactivación del virus antes de combinar la proteína ORF2 de PCV2 recombinante recuperada en una composición. Esto se puede hacer de una diversidad de maneras, pero en la práctica de la presente invención se prefiere utilizar BEI.

Así, de acuerdo con un aspecto adicional, este método comprende las etapas de: **i)** amplificar ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde se modifican las secuencias flanqueantes de dicho ADN de ORF2 de PCV2, **ii)** clonar el ADN de ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y **iii)** transfectar el vector de transferencia o una porción del mismo que contiene el ADN de ORF2 recombinante de PCV2 en un vector viral para generar el vector viral recombinante, **iv)** infectar células en medios con el virus transfectado; **v)** provocar que el virus transfectado exprese la proteína recombinante a partir de ORF2 de PCV2; **vi)** separar células del sobrenadante; **vii)** recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada a partir del sobrenadante; **viii)** inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de BEI, lo más preferiblemente en presencia de aproximadamente 5 mM de BEI; **ix)** añadir una cantidad equivalente de un agente que neutraliza al agente de inactivación en la solución, preferiblemente añadiendo una solución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI, y **x)** añadir una cantidad adecuada de un coadyuvante, preferiblemente añadiendo Carbopol, más preferiblemente Carbopol 971P, incluso más preferiblemente en cantidades según se describen arriba (p. ej. de aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferiblemente, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis).

Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. Tal como se emplea en esta memoria, "un soporte farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la adsorción y similares. Lo más preferiblemente, la composición proporcionada con la presente contiene proteína ORF2 de PCV2 recuperada del sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, en donde dichas células fueron infectadas con un vector viral recombinante que contiene

ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2, y en donde dicho cultivo de células se trató con aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM de BEI, preferiblemente con aproximadamente 5 mM de BEI para inactivar el vector viral, y una concentración equivalente de un agente de neutralización, preferiblemente solución de tiosulfato de sodio, hasta una concentración final de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM, Carbopol, más preferiblemente Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades de aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferiblemente, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis, y solución salina fisiológica, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 90% (v/v), más preferiblemente de aproximadamente 60 to 80% (v/v), todavía más preferiblemente de aproximadamente 70% (v/v).

Así, un aspecto adicional se refiere a un método para preparar una composición antigénica tal como, por ejemplo, una vacuna, para crear una respuesta inmune contra PCV2, que comprende las etapas de: **i)** amplificar ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde se modifican las secuencias flanqueantes de dicho ADN de ORF2 de PCV2, **ii)** clonar el ADN de ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y **iii)** transfectar el vector de transferencia o una parte del mismo que contiene el ADN de ORF2 recombinante de PCV2 en un vector viral para generar el vector viral recombinante, **iv)** infectar células en medios con el virus transfectado; **v)** provocar que el virus transfectado exprese la proteína recombinante a partir de ORF2 de PCV2; **vi)** separar células del sobrenadante; **vii)** recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada a partir del sobrenadante; **viii)** inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente en presencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 mM de BEI, lo más preferiblemente en presencia de aproximadamente 5 mM de BEI; **ix)** añadir una cantidad equivalente de un agente que neutraliza al agente de inactivación en la solución, preferiblemente añadiendo una solución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 20 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI, **x)** añadir una cantidad adecuada de un coadyuvante, preferiblemente añadiendo Carbopol, más preferiblemente Carbopol 971P, todavía más preferiblemente en cantidades según se describen antes (p. ej. de aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferiblemente, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis); y **xi)** añadir solución salina fisiológica, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 90% (v/v), más preferiblemente de aproximadamente 60 a 80% (v/v), todavía más preferiblemente de aproximadamente 70% (v/v). Opcionalmente, este método también puede incluir la adición de un agente protector. Un agente protector, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un agente anti-microbiológicamente activo tal como, por ejemplo, gentamicina, mertiolato y similares. En particular, la adición de un agente protector es lo más preferido para la preparación de una composición multi-dosis. Esos agentes anti-microbiológicamente activos se añaden en concentraciones eficaces para prevenir cualquier contaminación microbiológica de la composición de interés o para la inhibición de cualquier crecimiento microbiológico en la composición de interés.

Además, este método también puede comprender la adición de cualquier agente estabilizante tal como, por ejemplo, sacáridos, trehalosa, manitol, sacarosa y similares, para aumentar y/o mantener la duración de conservación del producto. Sin embargo, sorprendentemente se ha encontrado que la formulación resultante es inmunológicamente eficaz a lo largo de un periodo de al menos 24 meses, sin añadir ningún agente estabilizante adicional.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a los productos que resultan de los métodos según se describe arriba. En particular, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende proteína ORF2 de PCV2 recombinantemente expresada. Además, la presente descripción también se refiere a una composición de materia que comprende proteína ORF2 de PCV2 recombinantemente expresada, recuperada del sobrenadante de un cultivo de células de insectos. Además, la presente invención también se refiere a una composición de materia que comprende proteína ORF2 de PCV2 recombinantemente expresada, recuperada del sobrenadante de un cultivo de células de insectos. Preferiblemente, esta composición de materia también comprende un agente adecuado para la inactivación de vectores virales. Preferiblemente, dicho agente de inactivación es BEI. Además, la presente invención también se refiere a una composición de materia que comprende proteína ORF2 de PCV2 recombinantemente expresada, recuperada del sobrenadante de un cultivo de células de insectos, y comprende un agente adecuado para la inactivación de vectores virales, preferiblemente BEI y un agente de neutralización para la neutralización del agente de inactivación. Preferiblemente, ese agente de neutralización es tiosulfato de sodio cuando BEI se utiliza como un agente de inactivación.

Todavía en otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune y, más preferiblemente, confiere inmunidad protectora contra los síntomas clínicos de una infección por PCV2. La composición comprende generalmente el polipéptido, o un fragmento del mismo, expresado por el Marco de Lectura Abierto 2 (ORF2) de PCV2, en calidad del componente antigénico de la composición.

ADN de ORF2 de PCV2 y proteína, tal como se utilizan en esta memoria para la preparación de las composiciones y también tal como se utilizan en los procedimientos proporcionados en esta memoria, es un dominio muy conservado dentro de aislados de PCV2 y, con ello, cualquier ORF2 de PCV2 sería eficaz como la fuente del ADN de ORF2 de PCV y/o polipéptido tal como se utiliza en esta memoria. Una proteína ORF2 de PCV2 preferida es la de SEQ ID NO. 11. Un polipéptido ORF2 de PCV preferido se proporciona en esta memoria como SEQ ID NO. 5, pero se entiende por los expertos en la técnica que esta secuencia podría variar tanto como 6-10% en la homología de la

secuencia y aún conservar las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. Las características antigénicas de una composición inmunológica se puede, por ejemplo, estimar por el experimento de evaluación según se proporciona por el Ejemplo 4. Además, todavía se conserva la característica antigénica de un antígeno modificado, cuando el antígeno modificado confiere al menos un 70%, preferiblemente un 80%, más preferiblemente un 90% de la inmunidad protectora según se compara con la proteína ORF2 de PCV2, codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4. Una "composición inmunogénica", tal como se utiliza en esta memoria, significa una proteína ORF2 de PCV2 que provoca una "respuesta inmunológica" en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, esta composición inmunogénica es capaz de conferir inmunidad protectora contra una infección por PCV2 y los síntomas clínicos asociados con la misma. En algunas formas, se utilizan porciones inmunogénicas de proteína ORF2 de PCV2 en calidad del componente antigénico en la composición. La expresión "porción inmunogénica", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a formas truncadas y/o sustituidas, o a fragmentos de proteína ORF2 de PCV2 y/o a polinucleótido, respectivamente. Preferiblemente, tales formas truncadas y/o sustituidas, o fragmentos comprenderán al menos 6 aminoácidos contiguos procedentes del polipéptido de ORF2 de longitud completa. Más preferiblemente, las formas truncadas o sustituidas, o fragmentos tendrán al menos 10, más preferiblemente al menos 15, y aún más preferiblemente al menos 19 aminoácidos contiguos procedentes del polipéptido de ORF2 de longitud completa. Dos secuencias preferidas a este respecto se proporcionan en esta memoria como SEQ ID NOs. 9 y 10. Se entiende, además, que este tipo de secuencias pueden ser parte de fragmentos o formas truncadas mayores. Un polipéptido de ORF2 de PCV2 preferido, proporcionado en esta memoria, es codificado por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Pero se entiende por los expertos en la técnica que esta secuencia podría variar tanto como 6-20% en la homología de la secuencia y aún conservar las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. En algunas formas, como componente antigénico en la composición se utiliza una forma truncada o sustituida, o fragmento de ORF2. Preferiblemente, formas truncadas o sustituidas de este tipo, o fragmentos comprenderán al menos 18 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos de ORF2 de longitud completa, p. ej. de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, las formas truncadas o sustituidas, o fragmentos tendrán al menos 30, más preferiblemente al menos 45, y aún más preferiblemente al menos 57 nucleótidos contiguos procedentes del nucleótido de ORF2 de longitud completa, p. ej. de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 4.

"Identidad de la secuencia", tal como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, a saber una secuencia de referencia y una secuencia dada a comparar con la secuencia de referencia. La identidad de la secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de haber alineado óptimamente las secuencias para producir el grado más alto de similitud de secuencia, según se determina por el apareamiento entre las hebras de secuencias de este tipo. Tras el alineamiento, la identidad de la secuencia se constata sobre una base de posición-por-posición, p. ej. las secuencias son "idénticas" en una posición particular si en esa posición los residuos de nucleótidos o aminoácidos son idénticos. El número total de identidades de posición de este tipo se divide luego por el número total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para dar el % de identidad de la secuencia. La identidad de la secuencia se puede calcular fácilmente por métodos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., comp., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., comp., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M. y Griffin, H. G., comps., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., comps., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Métodos preferidos para determinar la identidad de la secuencia se diseñan para dar el apareamiento mayor entre las secuencias sometidas a ensayo. Métodos para determinar la identidad de la secuencia son codificados en programas de ordenador públicamente disponibles que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Ejemplos de este tipo de programas incluyen, pero no se limitan al paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible de NCBI y de otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). De forma óptima, estos programas alinean secuencias utilizando pesos de huecos por defecto con el fin de producir el nivel más alto de la identidad de secuencia entre las secuencias dada y de referencia. Como ilustración, por un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que tenga al menos, por ejemplo, un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de "identidad de secuencia" con una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende dar a entender que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polinucleótidos dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, incluso más preferiblemente hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos que tenga al menos un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 15%, preferiblemente el 10%, incluso más preferiblemente el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede estar suprimido o sustituido con otro nucleótido, o un cierto número de nucleótidos de hasta el 15%, preferiblemente el 10%, incluso más preferiblemente el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones terminales 5' ó 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones

terminales, entremezcladas individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, por un polipéptido con una secuencia de aminoácidos dada que tenga al menos, por ejemplo, un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido dado sea idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polipéptidos dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, incluso más preferiblemente hasta 5 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptidos dada que tenga al menos un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 15%, preferiblemente hasta el 10%, incluso más preferiblemente hasta el 5% de los residuos aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar suprimido o sustituido con otro aminoácido, o un cierto número de aminoácidos de hasta el 15%, preferiblemente hasta el 10%, incluso más preferiblemente hasta el 5% del número total de residuos aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren por la sustituciones conservadoras de aminoácidos. Sin embargo, las sustituciones conservadoras no están incluidas como un apareamiento cuando se determina la identidad de secuencia.

"Homología de la secuencia", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un método para determinar el grado de relación de dos secuencias. Para determinar la homología de la secuencia, dos o más secuencias se alinean óptimamente alineadas y, si es necesario, se introducen huecos. Sin embargo, en contraposición con la "identidad de la secuencia", sustituciones conservadoras de aminoácidos se cuentan como un apareamiento cuando se determina la homología de la secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido con un 95% de homología de la secuencia con una secuencia de referencia, el 85%, preferiblemente el 90%, incluso más preferiblemente el 95% de los residuos aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de referencia debe aparearse o comprender una sustitución conservadora con otro aminoácido o nucleótido, o un cierto número de aminoácidos o nucleótidos hasta el 15%, preferiblemente hasta el 10%, incluso más preferiblemente hasta el 5% de los residuos totales de aminoácidos o nucleótidos, que no incluyen sustituciones conservadoras, en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Preferiblemente, la secuencia homóloga comprende al menos un tramo de 50, incluso más preferiblemente 100, incluso más preferiblemente 250, incluso más preferiblemente 500 nucleótidos.

Una "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución de un resto de aminoácido o nucleótido con otro resto de aminoácido o nucleótido con características o propiedades similares, incluido el tamaño, la hidrofobia, etc., de modo que la funcionalidad global no cambia significativamente.

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" desde su estado natural, es decir si se produce en la naturaleza, ha sido cambiado o separado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que se presenta de forma natural en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", según se emplea el término en esta memoria.

Así, un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una composición inmunogénica, eficaz para reducir la gravedad de síntomas clínicos asociados con la infección por PCV2 que comprende proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, la proteína ORF2 de PCV2 es una cualquiera de las arriba descritas. Preferiblemente, dicha proteína ORF2 de PCV2 es

i) un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11,

ii) cualquier polipéptido que es al menos un 80% homólogo con el polipéptido de i),

iii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos de i) y/o ii),

iv) la porción inmunogénica de iii), que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos incluidos en las secuencias de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11,

v) un polipéptido que es codificado por un ADN que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

vi) cualquier polipéptido que es codificado por un polinucleótido que es al menos un 80% homólogo con el polinucleótido de v),

vii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos codificados por el polinucleótido de v) y/o vi),

viii) la porción inmunogénica de vii), en donde el polinucleótido que codifica dicha porción inmunogénica comprende al menos 30 nucleótidos contiguos incluidos en las secuencias de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Preferiblemente cualquiera de esas porciones inmunogénicas tendrán las características inmunogénicas de la proteína ORF2 de PCV2 que es codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con un aspecto adicional, la proteína ORF2 de PCV2 se proporciona en la composición inmunológica a un nivel de inclusión de antígenos eficaz para inducir la respuesta inmune deseada, a saber reducir la incidencia de o disminuir la gravedad de síntomas clínicos que resultan de la infección por PCV2. Preferiblemente, el nivel de inclusión de la proteína ORF2 de PCV2 es al menos 0,2 µg de antígeno / ml de la composición inmunogénica final (µg/ml), más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 µg /ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 µg/ml, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1,6 µg/ml.

De acuerdo con un aspecto adicional, el nivel de inclusión del antígeno ORF2 es al menos 0,2 µg de proteína ORF2 de PCV2, según se describe antes, por dosis de la composición antigénica final (µg/dosis), más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 µg /dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 µg/dosis, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1,6 µg/dosis.

El polipéptido ORF2 de PCV2 utilizado en una composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención se puede derivar de cualquier modo, incluido aislamiento y purificación de ORF2 de PCV2, síntesis estándar de proteínas, y metodología recombinante. Métodos preferidos para obtener polipéptido ORF2 de PCV2 se describen arriba en esta memoria y también se proporcionan en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 11/034.797. En síntesis, células susceptible son infectadas con un vector viral recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2, el polipéptido ORF2 de PCV2 es expresado por el virus recombinante, y el polipéptido ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración y se inactiva por cualquier método convencional, preferiblemente utilizando etilenimina binaria, que luego se neutraliza para detener el proceso de inactivación.

Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en concentraciones descritas arriba, y **ii)** al menos una parte del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante. Además, de acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una parte del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, y **iii)** una parte del sobrenadante del cultivo de células.

De acuerdo con una realización específica del procedimiento de producción y recuperación de la proteína ORF2 de PCV2, el sobrenadante del cultivo de células se filtra a través de una membrana con un tamaño de poros preferiblemente entre aproximadamente 0,45 y 1 µm. Así, un aspecto adicional se refiere a una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, y **iii)** una porción del sobrenadante del cultivo de células. en donde aproximadamente el 90% de los componentes tienen un tamaño menor que 1 µm.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, **iii)** una porción del cultivo de células, **iv)** y agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm. Preferiblemente, BEI está presente en concentraciones eficaces para inactivar el baculovirus. Concentraciones eficaces se describen arriba.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, **iii)** una porción del cultivo de células, **iv)** un agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, y **v)**

un agente neutralizante para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm. Preferiblemente, si el agente inactivante es BEI, dicha composición comprende tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI.

5 El polipéptido se incorpora en una composición que puede ser administrada a un animal susceptible a infección por PCV2. En formas preferidas, la composición puede incluir también componentes adicionales conocidos por los expertos en la técnica (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18ª ed. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes aceptables en veterinaria. Tal como se emplea en esta memoria, "un soporte aceptable desde el punto de vista veterinario" incluye uno y cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, coadyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la adsorción y similares.

En una realización preferida, la composición inmunogénica comprende proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, preferiblemente en concentraciones descritas arriba en forma de un componente antigénico, el cual se mezcla con un coadyuvante, preferiblemente Carbopol, y solución salina fisiológica.

15 Los expertos en la técnica entenderán que la composición en esta memoria puede incorporar soluciones estériles inyectables, fisiológicamente aceptables, conocidas. Para preparar una disolución lista para el uso para inyección parenteral o infusión, están fácilmente disponibles soluciones isotónicas acuosas, tales como, p. ej., solución salina o correspondientes soluciones de proteínas en el plasma. Además, las composiciones inmunogénicas y de vacuna de la presente invención pueden incluir diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o coadyuvantes. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetraacético, entre otros. Coadyuvantes adecuados son los arriba descritos. Lo más preferido es el uso de Carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades según se describen arriba (p. ej. de aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y lo más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis).

Así, la presente descripción se refiere también a una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una parte del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, **iii)** una porción del cultivo de células, **iv)** un agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, y **v)** un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, preferiblemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; y **vi)** un coadyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971, en las cantidades descritas arriba; en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm. De acuerdo con un aspecto adicional, esta composición inmunogénica comprende, además, una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una sal fosfato en concentraciones fisiológicamente aceptables. Preferiblemente, el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a un pH fisiológico, lo que significa entre aproximadamente 6,5 y 7,5.

Así, la presente descripción también se refiere a una composición inmunogénica que comprende, por un ml, **i)** al menos 1,6 µg de proteína ORF2 de PCV2 descrita arriba, **ii)** al menos una porción de baculovirus que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, **iii)** una porción del cultivo de células, **iv)** aproximadamente 2 a 8 mM de BEI, **v)** tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; y **vi)** aproximadamente 1 mg de Carbopol 971, y **vii)** sal fosfato en una concentración fisiológicamente aceptable; en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm y el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a aproximadamente 6,5 a 7,5.

Las composiciones inmunogénicas pueden además incluir uno o más de otros agentes inmunomoduladores tales como p. ej., interleucinas, interferones u otras citocinas. Las composiciones inmunogénicas pueden también incluir Gentamicina y Mertiolato. Si bien las cantidades y concentraciones de los coadyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 2000 µg de coadyuvante y preferiblemente aproximadamente 250 µg/ml de dosis de la composición de vacuna. En otra realización preferida, la presente invención contempla composiciones de vacuna que comprenden entre aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibióticos.

Así, la presente descripción se refiere también a una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, **iii)** una porción del cultivo de células, **iv)** un agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, y **v)** un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, preferiblemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; **vi)** un coadyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971, en cantidades descritas arriba; **vii)** una concentración farmacéutica aceptable de un tampón salino, preferiblemente de una sal fosfato, y **viii)** un agente anti-microbiológico activo; en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la composición inmunogénica proporcionada con la presente era muy estable a lo largo de un periodo de 24 meses. Se ha encontrado también que las composiciones inmunogénicas proporcionadas con la presente, que comprenden proteína ORF2 de PCV2 recombinante, que expresa baculovirus según se proporcionan con la presente, son muy eficaces para reducir los síntomas clínicos asociados con las infecciones por PCV2. Sorprendentemente, se ha encontrado que las composiciones inmunogénicas que comprenden la proteína ORF2 de PCV2 recombinante, que expresa baculovirus según se proporcionan con la presente, son más eficaces que una composición inmunogénica que comprende el virus PCV2 completo en una forma inactivada, o un antígeno ORF2 de PCV2 viral aislado. En particular, sorprendentemente se ha encontrado que la proteína ORF2 de PCV2 recombinante expresada en baculovirus es eficaz en concentraciones muy bajas, lo que significa en concentraciones de hasta 0,25 µg/dosis. Este elevado potencial inmunogénico inesperado de la proteína ORF2 de PCV2 se podría incrementar adicionalmente mediante la adición de Carbopol.

Un aspecto adicional se refiere a un recipiente que comprende al menos una dosis de la composición inmunogénica de proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, en donde una dosis comprende al menos 2 µg de proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente 2 a 16 µg de proteína ORF2 de PCV2. Dicho recipiente puede comprender de 1 a 250 dosis de la composición inmunogénica, contiene preferiblemente 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ó 250 dosis de la composición inmunogénica de proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, cada uno de los recipientes que comprende más de una dosis de la composición inmunogénica de proteína ORF2 de PCV2 comprende, además, un agente anti-microbiológico activo. Esos agentes son, por ejemplo, antibióticos, incluidos Gentamicina y Mertiolato y similares. Así, un aspecto de la presente descripción se refiere a un recipiente que comprende de 1 a 250 dosis de la composición inmunogénica de proteína ORF2 de PCV2, en donde una dosis comprende al menos 2 µg de proteína ORF2 de PCV2, y Gentamicina y/o Mertiolato, preferiblemente de aproximadamente 1 µg/ml hasta aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml.

Un aspecto adicional se refiere a un kit que comprende cualquiera de los recipientes descritos arriba, y un manual de instrucciones, incluida la información para la aplicación intramuscular de al menos una dosis de la composición inmunogénica de proteína ORF2 de PCV2 a cochinitos para disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con la infección por PCV2. Además de ello, de acuerdo con un aspecto adicional, dicho manual de instrucciones comprende la información de una segunda administración o de administraciones adicionales de al menos una dosis de la composición inmunogénica de proteína ORF2 de PCV2, en donde la segunda administración o cualquier administración adicional es al menos 14 días más tarde de la administración inicial o cualquier administración anterior. Preferiblemente, dicho manual de instrucciones incluye también la información para administrar un estimulante inmune. Preferiblemente, dicho estimulante inmune deberá ser dado al menos dos veces. Preferiblemente, al menos 3, más preferiblemente al menos 5, e incluso más preferiblemente al menos 7 días se encuentran entre la primera y la segunda o cualquier administración adicional del estimulante inmune. Preferiblemente, el estimulante inmune se da al menos 10 días, preferiblemente 15, incluso más preferiblemente 20, y aún más preferiblemente al menos 22 días más tarde de la administración inicial de la composición inmunogénica de proteína ORF2 de PCV2. Un estimulante inmune preferido es, por ejemplo, hemocianina de lapa bocallave (KLH - siglas en inglés), preferiblemente emulsionada con coadyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA - siglas en inglés). Sin embargo, se entiende con la presente que también se puede usar cualquier otro estimulante inmune conocido por una persona experta en la técnica. "Estimulante inmune", tal como se utiliza en esta memoria, significa cualquier agente o composición que puede disparar una respuesta inmune general, preferiblemente sin iniciar ni incrementar una respuesta inmune específica, por ejemplo la respuesta inmune contra un agente patógeno específico. Se instruye, además, administrar el estimulante inmune en una dosis adecuada. Además de ello, el kit también puede comprender un recipiente, que incluye al menos una dosis del estimulante inmune, preferiblemente una dosis de KLH, o KLH/ICFA.

Además de ello, sorprendentemente también se ha encontrado que el potencial inmunogénico de las composiciones inmunogénicas que comprenden proteína ORF2 de PCV2 recombinante, que expresa baculovirus, preferiblemente en combinación con Carbopol, se pueden reforzar adicionalmente mediante la administración de la vacuna IngelVac PRRS MLV (véase el Ejemplo 5). Los síntomas clínicos de PCV2 y las manifestaciones de la enfermedad se magnifican grandemente cuando está presente una infección por PRRS. Sin embargo, las composiciones inmunogénicas y las estrategias de vacunación, tal como se proporcionan con la presente, redujeron este efecto grandemente, y en mayor medida de lo esperado. En otras palabras, se observó un efecto sinérgico inesperado cuando los animales, preferiblemente cerdos, son tratados con cualquiera de las composiciones inmunogénicas de proteína ORF2 de PCV2, según se proporcionan con la presente, y la vacuna Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

Así, un aspecto adicional de la presente descripción se refiere al kit según se describe arriba, que comprende la composición inmunogénica de ORF2 de PCV2, según se proporciona con la presente y el manual de instrucciones, en donde el manual de instrucciones incluye, adicionalmente, la información de administrar la composición inmunogénica de ORF2 de PCV2 junto con, o aproximadamente al mismo tiempo que con una composición inmunogénica que comprende antígeno PRRS, preferiblemente antígeno PRRS con coadyuvante. Preferiblemente, el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

Un aspecto adicional de la presente descripción también se refiere a un kit que comprende i) un recipiente que contiene al menos una dosis de una composición inmunogénica de ORF2 de PCV2, según se proporciona con la

5 presente, y **ii**) un recipiente que contiene una composición inmunogénica que comprende antígeno PRRS, preferiblemente antígeno PRRS con coadyuvante. Preferiblemente, el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Más preferiblemente, el kit comprende, además, un manual de instrucciones que incluye la información de administrar las dos composiciones farmacéuticas. Preferiblemente, contiene la información de que la composición que contiene ORF2 de PCV2 se administra temporalmente antes de la composición que contiene PRRS.

10 Un aspecto adicional se refiere al uso de cualquiera de las composiciones proporcionadas con la presente en calidad de un medicamento, preferiblemente en calidad de un medicamento veterinario, incluso más preferiblemente en calidad de una vacuna. Además de ello, la presente invención también se refiere al uso de cualquiera de las composiciones descritas en esta memoria, para la preparación de un medicamento para disminuir la gravedad de síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2. Preferiblemente, el medicamento es para la prevención de una infección por PCV2, incluso más preferiblemente en cochinitos.

15 Un aspecto adicional se refiere a un método para **(i)** la prevención de una infección, o re-infección con PCV2 o **(ii)** la reducción o eliminación de síntomas clínicos provocados por PCV2 en un sujeto, que comprende administrar cualquiera de las composiciones inmunogénicas proporcionadas con la presente a un sujeto que lo necesita. Preferiblemente, el sujeto es un cerdo. Preferiblemente, la composición inmunogénica se administra por vía intramuscular. Preferiblemente, se administra/n una dosis o dos dosis de la composición inmunogénica, en donde una dosis comprende preferiblemente al menos aproximadamente 2 µg de proteína ORF2 de PCV2, incluso más de preferencia aproximadamente 2 hasta aproximadamente 16 µg, y al menos aproximadamente 0,1 hasta 20 aproximadamente 5 mg de Carbopol, de preferencia aproximadamente 1 mg de Carbopol. Un aspecto adicional se refiere al método de tratamiento según se describe arriba, en donde se administra una segunda aplicación de la composición inmunogénica. Preferiblemente, la segunda administración se realiza con la misma composición inmunogénica, preferiblemente con la misma cantidad de proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, la segunda administración se da también por vía intramuscular. Preferiblemente, la segunda administración se da al menos 14 días más tarde de la administración inicial, incluso más preferiblemente al menos 4 semanas más tarde de la administración inicial.

30 De acuerdo con un aspecto adicional, el método de tratamiento comprende también la administración de un estimulante inmune. Preferiblemente, dicho estimulante inmune se administra al menos dos veces. Preferiblemente, al menos 3, más preferiblemente al menos 5 días, incluso más preferiblemente al menos 7 días transcurren entre la primera y la segunda administración del estimulante inmune. Preferiblemente, el estimulante inmune se administra al menos 10 días, preferiblemente 15, incluso más preferiblemente 20, aún más preferiblemente al menos 22 días más tarde de la administración inicial de la composición inmunogénica de proteína ORF2 de PCV2. Un estimulante inmune preferido es, por ejemplo, hemocianina de lapa bocallave (KLH), aún preferiblemente emulsionada con coadyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA). Sin embargo, se entiende con la presente que también se puede usar cualquier otro estimulante inmune conocido por una persona experta en la técnica. Está dentro del conocimiento general de una persona experta en la técnica para administrar el estimulante inmune en una dosis adecuada.

40 De acuerdo con un aspecto adicional, el método de tratamiento descrito arriba comprende también la administración de un antígeno PRRS. Preferiblemente, el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Preferiblemente, dicho antígeno PRRS se administra temporalmente después de la administración de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 de PCV2.

45 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona una vacuna combinada multivalente como se define en las reivindicaciones, que incluye un agente inmunológico eficaz para reducir la incidencia de o disminuir la gravedad de una infección por PCV2, y al menos un componente inmunogénico activo contra otro organismo provocador de la enfermedad en cerdos.

En particular, el agente inmunológico, eficaz para reducir la incidencia de o disminuir la gravedad de una infección por PCV2 es un antígeno de PCV2. Preferiblemente, dicho antígeno de PCV2 es una proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, o cualquier composición inmunogénica según se describe arriba, que comprende proteína ORF2 de PCV2.

50 Sin embargo, se entiende con la presente que un antígeno de PCV2 se refiere también a cualquier composición de materia que comprende al menos un antígeno que puede inducir, estimular o reforzar la respuesta inmune contra una infección por PCV2 cuando se administra a un cerdo. Preferiblemente, dicho antígeno de PCV2 es el virus PCV2 completo, preferiblemente en una forma inactivada, un virus PCV2 vivo modificado o atenuado, un virus quimérico que comprende al menos una secuencia de aminoácidos inmunogénica de PCV2, cualquier otro polipéptido o componente que comprende al menos una secuencia de aminoácidos inmunogénica de PCV2. Las expresiones "proteína inmunogénica", "polipéptido inmunogénico" o "secuencia de aminoácidos inmunogénica", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos que provoca una respuesta inmune en un huésped contra un agente patógeno que comprende dicha proteína inmunogénica, polipéptido inmunogénico o secuencia de aminoácidos inmunogénica. Una "proteína inmunogénica", "polipéptido inmunogénico" o "secuencia de aminoácidos inmunogénica", tal como se utiliza en esta memoria, incluye la secuencia de longitud

completa de cualesquiera proteínas, sus análogos, o sus fragmentos inmunogénicos. Por "fragmento inmunogénico" se quiere dar a entender un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítomos y, así, provoca la respuesta inmunológica contra el agente patógeno relevante. Fragmentos de este tipo se pueden identificar utilizando cualquier número de técnicas de representación en mapa de epítomos, bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, epítomos lineales se pueden determinar, p. ej., sintetizando concurrentemente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos, a la vez que los péptidos siguen estando fijados a los soportes. Técnicas de este tipo son conocidas en la técnica y se describen, p. ej., en la patente de EE.UU. nº 4.708.871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De manera similar, epítomos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tales como, p. ej., cristalografía por rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols, supra. También se incluyen dentro de la definición antígenos sintéticos, por ejemplo poliepítomos, epítomos flanqueantes y otros antígenos recombinantes o derivados de forma sintética. Véase, p. ej., Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; Gardner et al., (1998) 12ª Conferencia Mundial del SIDA, Ginebra, Suiza, 28 de junio - 3 de julio de 1998.

De acuerdo con una realización adicional, dicho antígeno de PCV-2 es CircoFLEX®, (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, MO, EE.UU.), CircoVac® (Merial SAS, Lyon, Francia), CircoVent (Intervet Inc., Millsboro, DE, EE.UU.), o Suvaxyn PCV-2 One Dose® (Fort Dodge Animal Health, Kansas City, KA, EE.UU).

Una "respuesta inmunológica o inmune" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmune" incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas y/o células T yd, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped exhibirá una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de modo que esa resistencia a la nueva infección resultará reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad quedará reducida. Una protección de este tipo quedará demostrada por una reducción o carencia de los síntomas asociados con infecciones del huésped según se describe arriba.

Preferiblemente, el otro organismo en cerdos provocador de la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: Actinobacillus pleuropneumonia (1); Adenovirus (2); Alfavirus tal como virus de la encefalomiélitis equina del Este (3); Bordetella bronchiseptica (4); Brachyspira spp. (5), preferiblemente B. hyodentheriae (6); B. piosicoli (7); Brucella suis, preferiblemente biovars 1, 2 y 3 (8); virus de la fiebre porcina clásica (9); Clostridium spp. (10), preferiblemente Cl. difficile (11), Cl. perfringens tipos A, B y C (12), Cl. novyi (13), Cl.septicum (14), Cl. tetani (15); Coronavirus (16), preferiblemente Coronavirus respiratorio porcino (17); Eperitrozoosis suis (18); Erysipelothrix rhusiopathiae (19) Escherichia coli (20); Haemophilus parasuis, preferiblemente subtipos 1, 7 y 14 (21); virus de la encefalomiélitis hemoaglutinante (22); virus de la encefalitis japonesa (23); Lawsonia intracellularis (24); Leptospira spp. (25), preferiblemente Leptospira australis (26); Leptospira canicola (27); Leptospira grippotyphosa (28); Leptospira icterohaemorrhagicae (29); y Leptospira interrogans (30); Leptospira pomona (31); Leptospira tarassovi (32); Mycobacterium spp. (33) preferiblemente M. avium (34), M. intracellulare (35) y M.bovis (36); Mycoplasma hyopneumoniae (M hyo) (37); Pasteurella multocida (38); citomegalovirus porcino (39); parvovirus porcino (40); virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS) (41); virus pseudorrabia (42); rotavirus (43); Salmonella spp. (44), preferiblemente S. thyphimurium (45) y S. choleraesuis (46); Staph. hyicus (47); Staphylococcus spp. (48) preferiblemente Streptococcus spp. (49), preferiblemente Strep. suis (50); virus herpes porcino (51); virus de la gripe porcina (52); virus varicela porcina (53); virus varicela porcina (54); virus de la estomatitis vesicular (55); virus de exantema vesicular de cerdos (56); Leptospira Hardjo (57); y/o Mycoplasma hyosynoviae (58).

Cualquier referencia hecha en relación con un agente patógeno porcino en lo que sigue se puede hacer nombrando el agente patógeno, por ejemplo M.hyo, o haciendo referencia al número entre () a continuación del agente patógeno, que se encuentra arriba. Por ejemplo, la referencia a M. hyo se puede hacer por M. hyo o por (37).

Así, la presente invención se refiere a una vacuna combinada como se define en las reivindicaciones para el tratamiento y/o la profilaxis de cerdos, que incluye un agente inmunológico eficaz para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de una infección por PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 y, además, un componente inmunológico activo eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por cualquiera de los agentes patógenos porcinos (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35), (36), (37), (38), (39), (40), (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48), (49), (50), (51), (52), (53), (54), (55), (56), (57) y/o (58), o es un componente inmunológico activo de dicho o dichos agentes patógenos porcinos. **[combo 1]**.

Un "componente activo inmunológico", tal como se usa en esta memoria, significa un componente que induce o estimula la respuesta inmunitaria en un animal al que se le administra dicho componente. De acuerdo con una realización preferida, dicha respuesta inmunitaria se dirige a dicho componente o a un microorganismo que comprende dicho componente. De acuerdo con una realización preferida adicional, el componente activo

inmunológico es un microorganismo atenuado, incluido un virus vivo modificado (VVM), un microorganismo inactivado o por lo menos una parte activa inmunológica de un microorganismo.

5 “Parte activa inmunológica de un microorganismo”, tal como se usa en esta memoria, significa una fracción que contiene una proteína, azúcar y/o glicoproteína que contiene una fracción de un microorganismo que comprende por lo menos un antígeno que induce o estimula la respuesta inmune en un animal al que se le administra dicho componente. De acuerdo con una realización preferida, dicha respuesta inmune se dirige a dicha parte activa inmunológica de un microorganismo o a un microorganismo que comprende dicha parte activa inmunológica.

10 Preferiblemente, el componente inmunológico activo de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (41) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (41).

De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (37) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (37).

15 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (1) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (1).

De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (7) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (7).

20 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (24) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (24).

25 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (38) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (38).

De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (21) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (21).

30 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (40) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (40).

De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (2) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (2).

35 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (44) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (44).

40 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (50) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (50).

De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (19), preferiblemente (20) y/ó (21) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (19), preferiblemente (20) y/ó (21).

45 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por el agente patógeno porcino (22) o es un componente inmunológico activo del agente patógeno porcino (22).

De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por los agentes patógenos porcinos (41) y (37) o es un componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (41) y (37).

50 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por los agentes patógenos porcinos (1) y (41) o es un componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (1) y (41).

componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (38), (4) y (19).

De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por los agentes patógenos porcinos (38), (4), (21) y (19) o es un componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (38), (4), (21) y (19).

- 5 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por los agentes patógenos porcinos (20), preferiblemente (20) (31) y (38) o es un componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (20), (31) y (38).

- 10 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por los agentes patógenos porcinos (5), preferiblemente (5) y (24) o es un componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (5) y (24).

De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por los agentes patógenos porcinos (1), preferiblemente (1) y (5) o es un componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (1) y (5).

- 15 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por los agentes patógenos porcinos (41), preferiblemente (40), (27), (28), (29), (31), (19) y (59) o es un componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (41), (40), (27), (28), (29), (31), (19) y (57).

- 20 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de **[combo 1]** es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones provocadas por los agentes patógenos porcinos (6), preferiblemente (6), (19) y (58) o es un componente inmunológico activo de los agentes patógenos porcinos (1) y (5).

- 25 De acuerdo con otro aspecto, el componente inmunológico activo adicional de la vacuna combinada se selecciona del grupo que consiste en Enterisol® Ileitit, Enterisol® Ileitit FF, Enterisol® SC-54, Enterisol® SC-54 FF, Enterisol® ERY-ALC, Ingelvac® APP ALC, Ingelvac® AR4, Ingelvac® HP-1, Ingelvac® HPE-1, Ingelvac® M. hyo, Ingelvac® PRRS MLV, Ingelvac® PRRS ATP, Ingelvac® PRV-G1, Reprocyc® PRRS PLE, Reprocyc® PLE, Tetguard™, Toxivac® AD+E, Toxivac® Plus Parsius, (todos de **Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO, EE.UU.**); Circovet, Porcilis Coli, Porcilis ERY + PARVO, Porcilis Ery, Porcilis Glasser, Porcilis Parvo, Porcilis Porcoli DF, Porcilis APP, Porcilis AR-T, Porcilis AR-T DF, Porcilis Porcoli, Porcilis Porcoli Diluvac forte, Porcilis PRRS, Porcilis Porcol 5, Porcilis Aujeszky, Porcilis Begonia Diluvac, Porcilis Begonia I.D.A.L., Porcilis Begonia Unisole, Porcilis M. hyo, Porcilis Atrinord, Myco Silencer® BPM, Myco Silencer® BPME, Myco Silencer® ME, Myco Silencer® M, Myco Silencer® Once, Myco Silencer® MEH, Rhinogen® BPE, Rhinogen® CTE 5000, Rhinogen® CTSE, Score, Sow Bac® E II, Sow Bac® CE II, Sow Bac® TREC, ProSystem® CE, ProSystem® RCE, ProSystem® TREC, ProSystem® Pillmune, ProSystem® Rotamune® con Imugan® II, ProSystem® Rota, ProSystem® Rotamune KV, ProSystem® TG-Emune® Rota con Imugan® II, ProSystem® TGE/Rota, ProSystem® TG-Emune® con Imugen®, ProSystem® TGE, MaGESTIC 7, MaGESTIC 8, MaGESTic™ con Spur®, MaGESTic™ 7 con Spur®, MaGESTic™ 8 con Spur®, End-FLUence® con Imugen® II, End-FLUence® 2, PRRomiSE®, PRV-Begonia con Diluvac Forte®, Argus® SC/ST, Strep Bac, Strep Bac® con Imugen® II, Colisorb, Heptavac, Lambivac, Porcovac plus, Erysof Parvo, (todos de **Intervet Inc., Millsboro, DE, EE.UU.**); Hyoresp, Circovac, Neocolipor, Parvoruvac, Parvosuín, Progressis, Virafllu, Akipor 6.3, Jespur gl-, Jesflu gl- (todos de **Merial LTD, Duluth, GA**); ER BAC® PLUS, ER BAC®, ER BAC® PLUS/LEPTOFERM-5®, ER BAC® Leptoferm-5®, Farrowsure®, Farrowsure® B, FARROWSURE® PLUS B, FARROWSURE® PLUS, FARROWSURE® PRV, FARROWSURE B-PRV, FLUSURE™, FLUSURE™ RTU, FLUSURE™/ER BAC® PLUS, FLUSURE™/ER BAC Plus®, FLUSURE™/RESPISURE®, FLUSURE™/RESPISURE® RTU, FLUSURE™/RESPISURE-ONE®/ER BAC® PLUS, FLUSURE™/RespiSure 1 ONE®/ER BAC Plus®, FLUSURE™/RESPISURE ONE®, FLUSURE™/RESPISURE 1 ONE®, FLUSURE/Farrowsure Plus, FLUSURE/Farrowsure Plus B, LITTERGUARD® LT-C, LITTERGUARD® LT, PleuroGuard® 4, Pneumosuis III, 30 Stellamune One, Stellamune Uno, Stellamune Once, Stellamune Mono, Stellamune Mycoplasma, Respisure One, Respisure®, Respisure 1 ONE®, Respisure 1 One®/ER Bac Plus®, Enduracell T, Zylexis (antiguamente conocido como Baypamune), Atrobac® 3, BratiVac®, BratiVac®-B, Leptoferm-5™™ Parvo-Vac®/Leptoferm-5®, PR-Vac®-Killed, PR-Vac®, PR-Vac Plus™™ (todos de **Pfizer Inc., New York, NY, EE.UU.**); Suvaxyn MH One, Suvaxyn RespiFend® MH, Suvaxyn Mycoplasma, Suvaxyn Aujeszky Bartha + Diluyente, Suvaxyn Aujeszky Bartha + a/a, Suvaxyn Aujeszky-Flu, Suvaxyn Aujeszky 783 + a/a, Suvaxyn Ery, Suvaxyn Flu, Suvaxyn M.hyo, Suvaxyn MH-One, Suvaxyn Parvo ST, Suvaxyn Parvo/E, Suvaxyn RespiFend® APP, Suvaxyn RespiFend® HPS, Suvaxyn RespiFend® MH/HPS, Suvaxyn RespiFend® MH, Suvaxyn® AR/T/E, Suvaxyn® EC-4, Suvaxyn® E, Suvaxyn®-E, Suvaxyn® E-oral, Suvaxyn® PLE, Suvaxyn® PLE/PrV gpl-, Suvaxyn® LE+B, Suvaxyn® PLE + B, Suvaxyn® PLE+B/PrV gpl-, Suvaxyn® SIV, Suvaxyn® SIV/Mh-one, Suvaxyn® P, Suvaxyn® PrV gpl-, Suvaxyn® PCV-2 One Shot (todos de **Fort Dodge Animal Health, Overland Park, KS, EE.UU. (Wyeth)**); SCOURMUNE®, SCOURMUNE®-C, SCOURMUNE®-CR, AR-PAC®-PD+ER, AR-PARAPAC®+ER, M+ Rhusigen®, M+PAC®, MaxiVac Excell®3, MaxiVac® H1N1, MaxiVac® H3N2, MaxiVac®-FLU, MaxiVac®-M+, MaxiVac Excell®, MaxiVac Excell 3, PARAPAC®, PNEU PAC®, PNEU PAC®-ER, PNEU PAC®+ER, PRV/Marker Gold®, PRV/Marker Gold®, PRV/Marker Gold®-MaxiVac® FLU, Rhusigen™, Gletvax 6, Covexin 8, M + PAC, Gletvax plus, M-Parapac®SS PAC® (todos de **Schering-Plough Animal Health Corporation, Kenilworth, NJ, EE.UU.**); AMERVAC-PRRS,

AUSKIPRA-BK, AUSKIPRA-GN, COLISUIN-CL, COLISUIN-TP, ERYSHIPRAC, GRIPORK, HIPRASUIS-GLÄSSER, MYPRAC SUIS, NEUMOSUIN, PARVOSUIN, PARVOSUIN-MR, PARVOSUIN-MR/AD, RINIPRAC-DT, SUIPRAC-PRRS, SUIPRAC-RC, TOXIPRA PLUS (todos de **Laboratorios Hipra S.A., Amer, Girona, España**); Clostricol, Coliporc Plus, Haepovac, Per-C-Porc, Porcipovac, RESPIPORC ART + EP, RESPIPORC FLU, Respiporc M. HYO 1 SHOT, Rhusiovac, Rotlauf-Lebendimpfstoff, Salmoporc, Suisaloral, AK-vac MK35 (todos de **IDT Impfstoffwerk DessaTornau, Tornau, Alemania**); Myprvac Suis, (**Albrecht GmbH, Alemania**); Haemo Shield® P, Parapleuro Shield® P, Parapleuro Shield® P+BE, Rhinocell® FD, Rhini Shield® TX4, Prefarrow Shield® 9, Prefarrow Strep Shield®, Clostratox® BCD, Clostratox® C, Clostratox® Ultra C 1300, Porcine Ecolizer® 3 + C, Porcine Pili Shield™ □+C, Porcine Pili Shield™ □□□ Porcine Ecolizer® 3, Ery Serum™ □□ Ery Shield™ □□ Ery Vac Oral, Ery Shield™ +L5, PanSTAR™ Ery, Erycell□□□ Parvo Shield® E, Parvo Shield® L5E, Parvo Shield® L5, Parvo Shield®, Para Shield®, PneumoSTAR SIV, PneumoSTAR™ Myco, Lepto Shield™ 5, Myco Shield™ □□ Salmo Shield® 2, Salmo Shield® Live, Amitox Tet™ □□ C. Perflingens Type A Toxoid (todos de **Novartis Animal Health, Basel, Suiza**); Nitro-Sal (**Akro**); o cualquier antígeno que esté incluido en las composiciones antes descritas. Alternativamente, cuando el antígeno PCV2 ya está presente en cualquiera de esas vacunas, (i) antígeno PCV2, según se describe en esta memoria, se añade a cualquiera de esas composiciones/antígenos, o (ii) el antígeno PCV2 presente en cualquiera de esas vacunas es reemplazado por el antígeno PCV2, según se describe en esta memoria.

Formulaciones

Un aspecto importante de la presente descripción es la preparación de la vacuna o vacunas de combinación. La persona experta conoce componentes adicionales que pueden estar contenidos en dicha composición (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18ª ed. Mack Publ., Easton). El experto puede utilizar soluciones estériles inyectables, fisiológicamente aceptables conocidas. Para preparar una solución lista para el uso para inyección parenteral o infusión, están fácilmente disponibles soluciones isotónicas acuosas, tales como, p. ej., solución salina o correspondientes soluciones de proteínas en el plasma. Las composiciones farmacéuticas pueden estar presentes en forma de liofilizados o preparaciones secas, las cuales se pueden reconstituir con una solución inyectable conocida, directamente antes del uso bajo condiciones estériles, p. ej. en forma de un kit de partes.

Además, las composiciones inmunogénicas y de vacuna de la presente invención pueden incluir uno o más soportes aceptables desde el punto de vista veterinario. Tal como se usa en esta memoria, "un soporte aceptable desde el punto de vista veterinario" incluye todos y cada uno de disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, coadyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la adsorción y similares.

Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetraacético, entre otros.

Adyuvantes preferidos son los descritos anteriormente. Las composiciones inmunogénicas pueden además incluir uno o más de otros agentes inmunomoduladores tales como p. ej., interleucinas, interferones u otras citocinas. Las composiciones inmunogénicas pueden también incluir Gentamicina y Mertiolato. Si bien las cantidades y concentraciones de los coadyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 2000 µg de coadyuvante y de preferencia aproximadamente 250 µg/ml de dosis de la composición de vacuna. En otra realización preferida, la presente invención contempla composiciones de vacuna que comprenden de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibióticos.

Según una realización adicional, la vacuna combinada definida en las reivindicaciones primero se deshidrata. Si la composición se liofiliza o deshidrata primero por otros métodos, entonces, antes de la vacunación, dicha composición se rehidrata en soluciones acuosas (p. ej. solución salina, STP (solución salina tamponada con fosfato)) o no acuosas (p. ej. emulsión en aceite (aceite mineral, o basado en aceite vegetal/metabolizable/basado en emulsión sencilla o doble), basado en aluminio, coadyuvante basado en carbómero).

Dosificación y administración

De acuerdo con la presente invención, una cantidad eficaz de una vacuna combinada, administrada a cerdos, proporciona una inmunidad eficaz contra infecciones microbiológicas provocadas por PCV2 y al menos un agente patógeno adicional según se lista arriba. Combinaciones preferidas de antígenos para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades biológicas en cerdos se listan arriba.

De acuerdo con una realización adicional, la vacuna combinada es administrada a cerdos en una o dos dosis con un intervalo de aproximadamente 2 a 4 semanas. Por ejemplo, la primera administración se realiza cuando el animal tiene aproximadamente 2 a 3 semanas hasta aproximadamente 8 semanas de edad. La segunda administración se realiza aproximadamente 1 a aproximadamente 4 semanas de la primera administración de la primera vacunación. De acuerdo con una realización adicional, la revacunación se realiza en un intervalo de 3 a 12 meses después de la

administración de la segunda dosis. La administración de las dosis subsiguientes de la vacuna preferiblemente se realiza según una base semestral o anual. En otra realización preferida, debería volverse a vacunar animales vacunados de la edad de aproximadamente 2 a 3 semanas. La administración de las dosis subsiguientes de la vacuna preferiblemente se realiza según una base anual.

5 La cantidad de la vacuna combinada que es eficaz depende de los ingredientes de la vacuna y del catálogo de administración. Típicamente, cuando se utilice una preparación con un virus inactivado o un virus vivo modificado en la vacuna combinada, se utilizará una cantidad de la vacuna que contenga aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^9 DICT₅₀ por dosis, de preferencia aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^8 DICT₅₀ por dosis, más preferiblemente, aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^8 DICT₅₀ por dosis. En general, el antígeno inactivado normalmente se utiliza en cantidades mayores que el virus modificado vivo. Típicamente, cuando se utiliza el antígeno bacteriano en la vacuna combinada, conteniendo la vacuna una cantidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis, preferiblemente, aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^8 (UFC) por dosis, más preferiblemente aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 (UFC) por dosis. Vacunas sub-unidad son administradas normalmente con un nivel de inclusión de antígenos de al menos 0,2 µg de antígeno por dosis, preferiblemente con aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 400 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 200 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,35 hasta aproximadamente 100 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 50 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 0,45 hasta aproximadamente 30 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 0,6 hasta aproximadamente 15 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,75 hasta aproximadamente 8 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 1,0 hasta aproximadamente 6 µg/dosis, y aún más preferiblemente con aproximadamente 1,3 hasta aproximadamente 3,0 µg/dosis. Por ejemplo, el nivel de inclusión de antígenos del antígeno ORF2 de PCV, preferiblemente de la proteína ORF2 de PCV2, según se proporciona con la presente, contiene aproximadamente 2 µg hasta aproximadamente 150 µg, de preferencia aproximadamente 2 µg hasta aproximadamente 60 µg, incluso con más preferencia aproximadamente 2 µg hasta aproximadamente 50 µg, incluso con más preferencia aproximadamente 2 µg hasta aproximadamente 40 µg, incluso con más preferencia aproximadamente 2 µg hasta aproximadamente 30 µg, incluso con más preferencia aproximadamente 2 µg hasta aproximadamente 25 µg, incluso con más preferencia aproximadamente 2 µg hasta aproximadamente 20 µg, incluso con más preferencia aproximadamente 4 µg hasta aproximadamente 20 µg, e incluso con más preferencia aproximadamente 4 µg hasta aproximadamente 16 µg. En el caso de vacunas de combinación que incluyen (37), se prefiere utilizar al menos 1 a 10 logs, más preferiblemente 5-10 logs y, lo más preferiblemente, 6-8 logs. En el caso de vacunas de combinación que incluyen (41), se prefiere utilizar al menos 1 a 10 logs, más preferiblemente 3-10 logs y, lo más preferiblemente, 5-6 logs.

La composición de acuerdo con la invención se puede aplicar por vía intradérmica, intratraqueal o intravaginal. Preferiblemente, la composición se puede aplicar por vía intramuscular o intranasal. En un cuerpo animal, se puede manifestar ventajoso aplicar las composiciones farmacéuticas, según se describe antes, a tejidos diana a través de una inyección intravenosa o por inyección directa. Para la aplicación sistémica, se prefieren las vías intravenosa, intravascular, intramuscular, intranasal, intraarterial, intraperitoneal, oral o intratecal. Se puede efectuar una aplicación más local por vía subcutánea, intradérmica, intracutánea, intracardial, intralobal, intramedular, intrapulmonar, o directamente en o cerca del tejido a tratar (tejido conjuntivo, óseo, muscular, nervioso, epitelial). Dependiendo de la duración y eficacia de tratamiento deseados, las composiciones de acuerdo con la descripción se pueden administrar una o varias veces, también de forma intermitente, por ejemplo sobre una base diaria durante varios días, semanas o meses y en diferentes dosificaciones.

Métodos para tratamiento

45 Incluso otra realización importante de la descripción consiste en un método para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades provocadas por PCV2, y uno o más microorganismos patógenos de cerdos, en donde el antígeno de PCV2, preferiblemente una proteína ORF2 de PCV2, según se proporciona con la presente, y componentes activos inmunológicos adicionales, eficaces para el tratamiento y/o la profilaxis de la infección provocada por dicho otro microorganismo patógeno de cerdos se administran a un animal que lo necesita en una dosis adecuada. De acuerdo con un aspecto adicional, dicha proteína ORF2 de PCV2 es parte de una composición antigénica, según se describe arriba. Así, todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a una vacuna combinada que comprende una cualquiera de las composiciones proporcionadas con la presente y que comprende proteína ORF2 de PCV2, y otro componente inmunológico activo eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de una infección provocada por dicho otro microorganismo patógeno de cerdos.

55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo esquemático de una construcción preferida de baculovirus recombinante de ORF2 de PCV2; y

Las Figs. 2a y 2b son, cada una, un diagrama de flujo esquemático de cómo producir una composición de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los siguientes ejemplos recogen materiales preferidos y procedimientos de acuerdo con la presente invención. Ha de entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente, y nada en ellos debe considerarse una limitación tras el alcance global de la invención.

5 Ejemplo 1

Este ejemplo compara los rendimientos relativos de ORF2 utilizando métodos de la presente invención con métodos que son conocidos en la técnica anterior. Cuatro matraces de centrifugación de 1000 mL se sembraron cada uno con aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células Sf+/ml en 300 mL de medios exentos de suero de insectos, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). El cultivo celular patrón se identifica como SF+ (*Spodoptera frugiperda*) Master Cell Stock, pase 19, Lote nº N112-095W. Las células utilizadas para generar el SF+ Master Cell Stock se obtuvieron de Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. La línea de células SF+ para este ejemplo fue confinada entre los pases 19 y 59. Otros pases funcionarán para los fines de la presente invención, pero con el fin de aumentar la escala del procedimiento para una producción a gran escala, serán necesarios, probablemente, al menos 19 pases, y pases más allá de 59 pueden tener un efecto sobre la expresión, aunque esto no se investigó. Con mayor detalle, los cultivos iniciales de células SF+ procedentes de almacenamiento en nitrógeno líquido se hicieron crecer en medio Excell 420 en suspensión en matraces de centrifugación estériles con constante agitación. Los cultivos se hicieron crecer en matraces de centrifugación de 100 mL a 250 mL con 25 a 150 mL de medio exento de suero Excell 420. Cuando las células se habían multiplicado hasta una densidad de células de $1,0 - 8,0 \times 10^6$ células/mL, éstas se dividieron en nuevos recipientes con una densidad de siembra de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. Los cultivos por expansión subsiguientes se hicieron crecer en matraces de centrifugación de hasta 36 litros de capacidad o en biorreactores de acero inoxidable de hasta 300 litros durante un periodo de 2-7 días a 25 - 29°C.

Después de la siembra los matraces se incubaron a 27°C durante cuatro horas. Subsiguientemente, cada uno de los matraces se sembró con un baculovirus recombinante que contenía el gen ORF2 de PCV2 (SEQ ID NO: 4). El baculovirus recombinante que contenía el gen ORF2 de PCV2 se generó como sigue: el gen ORF2 de PCV2 procedente de una cepa de Norte América de PCV2 se amplificó por PCR para que contuviera una secuencia 5' Kozak (SEQ ID NO: 1) y un sitio 3' EcoR1 (SEQ ID NO: 2), clonado en el vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Luego se escindió subsiguientemente y se subclonó en el vector de transferencia pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). La porción subclonada se representa en esta memoria como SEQ ID NO: 7. El plásmido pVL1392 que contenía el gen ORF2 de PCV2 se designó N47-064Y y luego se co-transfectó con ADN de baculovirus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) en células de insecto Sf+ (Protein Sciences, Meriden, CT) para generar el baculovirus recombinante que contenía el gen ORF2 de PCV2. La nueva construcción se proporciona en esta memoria como SEQ ID NO: 8. El baculovirus recombinante que contenía el gen ORF2 de PCV2 se purificó en placa y el virus de la Cepa Madre (Master Seed Virus - MSV) se propagó en la línea de células SF+, se tomaron partes alícuotas y se almacenó a -70°C. El MSV se identificó positivamente como baculovirus ORF2 de PCV2 mediante PCR-RFLP utilizando cebadores específicos de baculovirus. Las células de insectos se infectaron con baculovirus ORF2 de PCV2 para generar MSV o virus de la Cepa de Trabajo (Working Seed Virus) expresan antígeno ORF2 de PCV2, según se detecta por suero policlonal o anticuerpos monoclonales en un ensayo de anticuerpos fluorescentes indirecto. Adicionalmente, la identidad del baculovirus ORF2 de PCV2 fue confirmada por la secuenciación de aminoácidos N-terminal. El baculovirus ORF2 de PCV2 MSV también se sometió a ensayo en cuanto a la pureza de acuerdo con 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28 y 113.55. Cada baculovirus recombinante sembrado en los matraces de centrifugación tenía multiplicidades de infección (MOIs) variables. El matraz 1 fue sembrado con 7,52 mL de siembra 0,088 MOI; el matraz 2 fue sembrado con 3,01 mL de siembra 0,36 MOI; el matraz 3 fue sembrado con 1,5 mL de siembra 0,18 MOI; y el matraz 4 fue sembrado con 0,75 mL de siembra 0,09 MOI. Un diagrama de flujo esquemático que ilustra las etapas básicas utilizadas para construir un baculovirus recombinante ORF2 de PCV2 se proporciona en esta memoria como Figura 1.

Después de ser sembrados con el baculovirus, los matraces se incubaron luego a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días y se agitaron también a 100 rpm durante ese tiempo. Los matraces utilizaban tapones ventilados para permitir el flujo de aire. De cada uno de los matraces se tomaron muestras cada 24 horas durante los siguientes 7 días. Después de la extracción, cada una de las muestras se centrifugó y tanto el sedimento como el sobrenadante se separaron y luego se microfiltraron a través de una membrana con un tamaño de poros de 0,45-1,0 μm .

Las muestras resultantes tenían la cantidad de ORF2 presente en ellas, cuantificada a través de un ensayo ELISA. El ensayo ELISA se efectuó con anticuerpo de captura Pab IgG Prot. G anti-PCV2 porcino purificado (diluido a razón de 1:250 en PBS), diluido a razón de 1:6000 en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6). 100 μL del anticuerpo se dispusieron luego en los pocillos de la placa de microtitulación, se sellaron e incubaron durante una noche a 37°C. La placa se lavó después tres veces con una solución de lavado que comprendía 0,5 mL de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100 mL de 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) y 899,5 mL de agua destilada. Subsiguientemente, se añadieron a cada uno de los pocillos 250 μL de una solución de bloqueo (5 g de leche en polvo no grasa Carnation (Nestle, Glendale, CA) en 10 mL de D-PBS QS hasta 100 mL con agua destilada). La etapa siguiente era lavar la placa de ensayo y luego añadir antígeno pre-diluido. El antígeno pre-diluido se produjo añadiendo 200 μL de solución diluyente (0,5 mL de Tween 20 en 999,5 mL de D-PBS) a cada uno de los pocillos en una placa de dilución. La muestra se diluyó luego a una relación de 1:240 y a una relación de 1:480, y 100 μL de

5 cada una de estas muestra diluidas se añadieron después a uno de los pocillos superiores en la placa de dilución (es decir, un pocillo superior recibió 100 µL de la dilución de 1:240 y el otro recibió 100 µL de la dilución de 1:480). Después se hicieron diluciones en serie para el resto de la placa separando 100 µL de cada uno de los pocillos sucesivos y transfiriéndolos al pocillo siguiente de la placa. Cada pocillo se mezcló antes de realizar la siguiente transferencia. El lavado de la placa de ensayo incluía el lavado de la placa durante tres veces con el tampón de lavado. La placa se selló después y se incubó durante una hora a 37°C antes de lavarla tres veces más con el tampón de lavado. El anticuerpo de detección utilizado era anticuerpo monoclonal contra ORF2 de PCV. Se diluyó a razón de 1:300 en solución diluyente y después se añadieron a los pocillos 100 µL del anticuerpo de detección diluido. La placa se selló después y se incubó durante una hora a 37°C antes de lavarla tres veces con el tampón de lavado. Luego se preparó diluyente conjugado añadiendo suero normal de conejo (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) a la solución diluyente hasta una concentración del 1%. Anticuerpo conjugado anti-ratón de cabra (H+I)-HRP (Jackson Immunoresearch) se diluyó en el diluyente de conjugado hasta 1:10.000. 100 µL del anticuerpo conjugado diluido se añadieron entonces a cada uno de los pocillos. La placa se selló después y se incubó durante 45 minutos a 37°C antes de lavarla tres veces con el tampón de lavado. 100 µL de sustrato (Sustrato TMB Peroxidasa, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), mezclados con un volumen igual de Sustrato Peroxidasa B (KPL) se añadieron a cada uno de los pocillos. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. 100 µL de solución de HCl 1 N se añadieron luego a todos los pocillos para detener la reacción. La placa se hizo pasar luego a través de un lector ELISA. Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Tabla 1 que figura a continuación:

20

Tabla 1

Día	Matraz	ORF2 en el sedimento (µg)	ORF2 en el sobrenadante (µg)
3	1	47,53	12
3	2	57,46	22
3	3	53,44	14
3	4	58,64	12
4	1	43,01	44
4	2	65,61	62
4	3	70,56	32
4	4	64,97	24
5	1	31,74	100
5	2	34,93	142
5	3	47,84	90
5	4	55,14	86
6	1	14,7	158
6	2	18,13	182
6	3	34,78	140
6	4	36,88	146
7	1	6,54	176
7	2	12,09	190
7	3	15,84	158
7	4	15,19	152

25

Estos resultados indican que cuando se prolonga el tiempo de incubación, la expresión de ORF2 en el sobrenadante de las células centrifugadas y los medios es mayor que la expresión en el sedimento de las células centrifugadas y los medios. Por consiguiente, al permitir que la expresión de ORF2 prosiga durante al menos 5 días y que se recupere en el sobrenadante más que permitir que la expresión prosiga durante menos de 5 días y recuperar ORF2 de las células, proporciona un gran aumento en los rendimientos de ORF2 y una mejora significativa frente a los métodos anteriores.

Ejemplo 2

30

Este ejemplo proporciona datos en cuanto a la eficacia de la invención definida en las reivindicaciones. Un matraz de centrifugación de 1000 mL se sembró con aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células Sf+/mL en 300 mL de medio Excell 420. El matraz se incubó luego a 27°C y se agitó a 100 rpm. Subsiguientemente, el matraz se sembró con 10 mL de

siembra de virus ORF2 de PCV2/Bac p+6 (el baculovirus recombinante que contiene el gen ORF2 de ORF2 DE PCV2 pasó 6 veces adicionales en las células de insectos Sf9) con 0,1 MOI después de 24 horas de incubación.

5 El matraz se incubó después a 27°C durante un total de 6 días. Después de la incubación, el matraz se centrifugó después y se recogieron e inactivaron tres muestras del sobrenadante resultante. El sobrenadante se inactivó
10 haciendo que su temperatura alcanzara $37 \pm 2^\circ\text{C}$. A la primera muestra, una solución 0,4 M de hidrobromuro de 2-bromoetilenamina que había sido ciclada a etilenimina binaria (EBI) 0,2 M en NaOH 0,3 N se añade al sobrenadante para dar una concentración final de BEI de 5 mM. A la segunda muestra, 10 mM de BEI se añadieron al sobrenadante. A la tercera muestra no se añadió BEI al sobrenadante. Las muestras se agitaron luego continuamente durante 48 h. Se añadió una solución de tiosulfato de sodio 1,0 M para dar una concentración mínima final de 5 mM para neutralizar toda BEI residual. La cantidad de ORF2 en cada muestra se cuantificó después utilizando el mismo proceso de ensayo ELISA que el descrito en el Ejemplo 1. Los resultados de este ensayo se pueden ver en la Tabla 2 que figura a continuación:

Tabla 2

Muestra	ORF2 en el sobrenadante (μg)
1	78,71
2	68,75
3	83,33

15 Este ejemplo demuestra que la neutralización con BEI no separa ni degrada cantidades importantes del producto proteína ORF2 de PCV2 recombinante. Esto se evidencia por el hecho de que no hay una gran pérdida de ORF2 en el sobrenadante procedente de la BEI o temperaturas elevadas. Los expertos en la técnica reconocerán que el ORF2 recuperado es un producto proteínico estable.

Ejemplo 3

20 Este ejemplo demuestra que la presente invención puede ser realizada a escala desde una producción a pequeña escala de ORF2 de PCV2 recombinante a una producción a gran escala de ORF2 de PCV2 recombinante. $5,0 \times 10^5$ células/ml de células SF+ /ml en 7000 mL de medio ExCell 420 se sembraron en un Biorreactor Applikon de 20000 mL. Los medios y las células se incubaron luego a 27°C y se agitaron a 100 RPM durante las siguientes 68 horas. A la 68ª hora, 41,3 mL de Baculovirus MSV+3 ORF2 de PCV2 se añadieron a 7000 mL de medio ExCell 420. La
25 mezcla resultante se añadió luego al biorreactor. Durante los siguientes siete días, la mezcla se incubó a 27°C y se agitó a 100 RPM. Muestras procedentes del biorreactor se extrajeron cada 24 horas, comenzando el día 4, post-infección, y cada muestra se centrifugó. Los sobrenadantes de las muestras se conservaron y la cantidad de ORF2 se cuantificó luego utilizando una densitometría por SDS-PAGE. Los resultados de esto se pueden ver en la Tabla 3 que figura a continuación:

30 **Tabla 3**

Día después de la infección:	ORF2 en el sobrenadante ($\mu\text{g/mL}$)
4	29,33
5	41,33
6	31,33
7	60,67

Ejemplo 4

35 Este ejemplo somete a ensayo la eficacia de siete vacunas candidatas de PCV2 y define, además, parámetros de eficacia después de la exposición a una cepa virulenta de PCV2. Ciento ocho (108) cochinillos desprovistos de calostro derivado de la cesárea (CDCD - siglas en inglés), de 9-14 días de edad, se dividieron al azar en 9 grupos de igual tamaño. La Tabla 4 recoge el Diseño de Estudio General para este Ejemplo.

Tabla 4. Diseño de Estudio General

Grupo	Nº de Cerdos	Tratamiento	Día de Tratamiento	KLH/ICFA el Día 21 y el Día 27	Enfrentados con PCV2 Virulento el Día 24	Necropsia el Día 49
1	12	Vacuna de PCV2 nº 1 - (vORF2 16 µg)	0	+	+	+
2	12	Vacuna de PCV2 nº 2 - (vORF2 8 µg)	0	+	+	+
3	12	Vacuna de PCV2 nº 3 - (vORF2 4 µg)	0	+	+	+
4	12	Vacuna de PCV2 nº 4 - (rORF2 16 µg)	0	+	+	+
5	12	Vacuna de PCV2 nº 5 - (rORF2 8 µg)	0	+	+	+
6	12	Vacuna de PCV2 nº 6 - (rORF2 4 µg)	0	+	+	+
7	12	Vacuna de PCV2 Nº 7 - (virus muertos de células completas)	0	+	+	+
8	12	Ninguno - Controles de exposición	N/A	+	+	+
9	12	Ninguno - Grupo Control Negativo Estricto	N/A	+	-	+

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

5 Siete de los grupos (Grupos 1 - 7) recibieron dosis de polipéptido ORF2 de PCV2, uno de los grupos actuó como control de exposición y no recibió ORF2 de PCV2 y otro grupo actuó como el grupo control negativo estricto y tampoco recibió ORF2 de PCV2. El Día 0, los Grupos 1 a 7 fueron tratados con vacunas asignadas. A los cochinitos del Grupo 7 se les dio un tratamiento de refuerzo el Día 14. Los cochinitos fueron observados en cuanto a sucesos adversos y las reacciones del sitio de inyección después de la vacunación, y el Día 19, los cochinitos se trasladaron al segundo sitio de estudio. En el segundo sitio de estudio, los Grupos 1-8 fueron alojados en grupo en un edificio, mientras que el Grupo 9 fue alojado en un edificio separado. Todos los cerdos recibieron hemocianina de lapa bocallave (KLH)/adyuvante incompleto de Freund (ICFA - siglas en inglés) los Días 21 y 27 y el Día 24, a los Grupos 10 1-8 se les enfrentó con un PCV2 virulento.

15 Antes y después de la exposición se tomaron muestras de sangre para la serología del PCV2. Después de la exposición se recogieron datos del peso corporal para la determinación de la ganancia de peso media diaria (ADWG - siglas en inglés), y los síntomas clínicos, así como muestras de torunda nasal para determinar la secreción nasal de PCV2. El Día 49, se practicó necropsia a todos los cerdos supervivientes, se anotaron los pulmones en cuanto a lesiones, y los tejidos seleccionados se conservaron en formalina para el ensayo de Inmunohistoquímica (IHC - siglas en inglés) para una fecha posterior.

Materiales y Métodos

20 Este era un estudio de viabilidad de vacunación-exposición parcialmente ciego realizado en cerdos CDCD, de 9 a 14 días de edad el Día 0. Para ser incluidos en el estudio, los títulos IFA de PCV2 de cerdas eran = 1:1000. Adicionalmente, el estado serológico de cerdas procedía de una piara PRRS-negativa conocida. Se sometió a ensayo a ventiocho (28) cerdas en cuanto al estado serológico de PCV2. Catorce (14) cerdas tenían un título de PCV2 de = 1000 y fueron transferidas al primer sitio de estudio. Ciento diez (110) cochinitos fueron proporcionados mediante cirugía por sección cesárea y estaban disponibles para este estudio el Día -4. El Día -3 se pesaron 108 cerdos CDCD en el primer sitio de estudio, se identificaron con etiquetas de oreja, se bloquearon por el peso y se asignaron al azar a 1 de 9 grupos, según se recoge antes en la tabla 4. Si cualquier animal de ensayo que cumplía los criterios de inclusión fue enrolado en el estudio y posteriormente fue excluido por cualquier motivo, el Investigador y Monitor consultó con el fin de determinar el uso de datos recogidos del animal en el análisis final. Se documentó la fecha en donde se excluyó a los cerdos enrolados y el motivo de la exclusión. Inicialmente no se excluyó a ninguna cerda. Un total de 108 de 110 cerdos disponibles fue asignado a uno de 9 grupos el Día -3. Los dos cerdos más pequeños (nºs 17 y 19) no fueron asignados a un grupo y estaban disponibles como extras, en caso necesario. Durante el transcurso del estudio, se retiró a varios animales. Cada uno de Cerdo nº 82 (Grupo 9) el Día -

1, Cerdo nº 56 (Grupo 6) el Día 3, Cerdo nº 53 (Grupo 9) el Día 4, Cerdo nº 28 (Grupo 8) el Día 8, Cerdo nº 69 (Grupo 8) el Día 7 y Cerdo nº 93 (Grupo 4) el Día 9, fue encontrado muerto antes de la exposición. Estos seis cerdos no fueron incluidos en los resultados del estudio final. El cerdo nº 17 (uno de los cerdos extra) fue asignado al Grupo 9. El restante cerdo nº 19 extra fue excluido del estudio.

5 Las formulaciones dadas a cada uno de los grupos eran como sigue: el Grupo 1 fue diseñado para administrar 1 ml de ORF2 viral (vORF2) que contenía 16 µg de ORF2/ml. Esto se hizo mezclando 10,24 ml de ORF2 viral (256 µg/25 µg/ml = 10,24 ml de vORF2) con 3,2 ml de Carbopol al 0,5% y 2,56 ml de solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7,4. Esto produjo 16 ml de formulación para el grupo 1. El Grupo 2 fue diseñado para administrar 1 ml de vORF2 que contenía 8 µg de vORF2/ml. Esto se hizo mezclando 5,12 ml de vORF2 (128 µg/25 µg/ml = 5,12 ml de vORF2) con 3,2 ml de Carbopol al 0,5% y 7,68 ml de solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7,4. Esto produjo 16 ml de formulación para el grupo 2. El Grupo 3 fue diseñado para administrar 1 ml de vORF2 que contenía 4 µg de vORF2/ml. Esto se hizo mezclando 2,56 ml de vORF2 (64 µg/25 µg/ml = 2,56 ml de vORF2) con 3,2 ml de Carbopol al 0,5% y 10,24 ml de solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7,4. Esto produjo 16 ml de formulación para el grupo 3. El Grupo 4 fue diseñado para administrar 1 ml de ORF2 recombinante (rORF2) que contenía 16 µg de rORF2/ml. Esto se hizo mezclando 2,23 ml de rORF2 (512 µg/230 µg/ml = 2,23 ml de rORF2) con 6,4 ml de Carbopol al 0,5% y 23,37 ml de solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7,4. Esto produjo 32 ml de formulación para el grupo 4. El Grupo 5 fue diseñado para administrar 1 ml de rORF2 que contenía 8 µg de rORF2/ml. Esto se hizo mezclando 1,11 ml de rORF2 (256 µg/230 µg/ml = 1,11 ml de rORF2) con 6,4 ml de Carbopol al 0,5% y 24,49 ml de solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7,4. Esto produjo 32 ml de formulación para el grupo 5. El Grupo 6 fue diseñado para administrar 1 ml de rORF2 que contenía 8 µg de rORF2/ml. Esto se hizo mezclando 0,56 ml de rORF2 (128 µg/230 µg/ml = 0,56 ml de rORF2) con 6,4 ml de Carbopol al 0,5% y 25,04 ml de solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7,4. Esto produjo 32 ml de formulación para el grupo 6. El Grupo 7 fue diseñado para administrar 2 ml de vacuna de células enteras muertas contra PCV2 (PCV2 KV - siglas en inglés) que contenían la MAX PCV2 KV. Esto se hizo mezclando 56 ml de PCV2 KV con 14 ml de Carbopol al 0,5%. Esto produjo 70 ml de formulación para el grupo 7. Finalmente, el grupo 8 fue diseñado para administrar KLH a razón de 0,5 µg/ml ó 1,0 µg/ml por cada 2 ml de dosis. Esto se hizo mezclando 40,71 ml de KLH (7,0 µg de proteína/ml a 0,5 µg/ml = 570 ml (7,0 µg/ml)(x) = (0,5)(570 ml)), 244,29 ml de solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7,4, y 285 ml de coadyuvante de Freund. La Tabla 5 describe los intervalos de tiempo para las actividades clave de este Ejemplo.

30

Tabla 5. Actividades de Estudio

Día de Estudio	Actividad de Estudio
-4, 0 a 49	Observaciones generales para la salud global y síntomas clínicos
-3	Pesado; distribuidos al azar en grupos; muestras de sangre tomadas de todos los cerdos
0	Examen de salud; administrados IVP N°s 1-7 a los Grupos 1-7, respectivamente
0-7	Cerdos observados en cuanto a reacciones en los sitios de inyección
14	Grupo 7 reforzado con Vacuna nº 7 contra PCV2; muestras de sangre de todos los cerdos
14-21	Grupo 7 observado en cuanto a reacciones en los sitios de inyección
16-19	Tratados todos los cerdos con antibióticos (falta de datos)
19	Cerdos transportados desde el primer sitio de ensayo a un segundo sitio de ensayo
21	Grupos 1-9 tratados con KLH/ICFA
24	Muestras de sangre y de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos; pesados todos los cerdos; Grupos 1-8 expuestos al material de exposición de PCV2
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47	Muestras de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos
27	Grupos 1-9 tratados con KLH/ICFA
31	Muestras de sangre tomadas de todos los cerdos
49	Muestras de sangre y de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos; pesados todos los cerdos; necropsia de todos los cerdos; lesiones macroscópicas señaladas con énfasis localizadas en ictericia y úlceras gástricas; pulmones evaluados en cuanto a lesiones; guardadas muestras de tejido recientes y fijadas con formalina; completada la fase viva del estudio

Después de completarse la fase en vivo del estudio, tejidos fijados con formalina fueron examinados por inmunohistoquímica (IHC) para la detección de antígeno de PCV2 por parte de un patólogo, las muestras de sangre se evaluaron en cuanto a la serología de PCV2, las muestras de torunda nasal fueron evaluadas en cuanto a la

secreción de PCV2, y la ganancia de peso media diaria (ADWG) fue determinada desde el Día 24 al Día 49.

Los animales fueron alojados en el primer sitio de estudio en jaulas individuales en cinco recintos desde el nacimiento hasta aproximadamente 11 días de edad (aproximadamente el Día 0 del estudio). Cada recinto era idéntico en su distribución y consistía en jaulas de acero inoxidable individuales apiladas, siendo suministrado aire calentado y filtrado por separado a cada una de las unidades de aislamiento. Cada recinto disponía de calor y ventilación separados, proporcionando con ello una contaminación cruzada de aire entre los recintos. Los animales fueron alojados en dos edificios diferentes en el segundo sitio de estudio. El Grupo 9 (el grupo control estricto negativo) fue alojado por separado en un edificio de acabado convertido y los Grupos 1-8 fueron alojados en un edificio de crianza convertido. Cada grupo fue alojado en un redil separado (11-12 cerdos por redil) y cada redil proporcionaba aproximadamente 1 metro cuadrado por cerdo. Cada redil se encontraba sobre una cubierta elevada con pisos de lamas de plástico. Un foso debajo de los rediles servía como depósito de excrementos y desechos. Cada edificio tenía sus sistemas calefactores y de ventilación separados, con escasa probabilidad de contaminación cruzada de aire entre los edificios.

En el primer sitio de estudio, los cochinitos fueron alimentados con una ración de leche especialmente formulada desde el nacimiento hasta aproximadamente 3 semanas de edad. Todos los cochinitos consumían una ración sólida, especial mezclada el Día 19 (aproximadamente 4 ½ semanas de edad). En el segundo sitio de estudio, se alimentó a todos los cerdos con una ración mixta comercial habitual, no medicada, en cuanto a su edad y peso, *ad libitum*. También se disponía *ad libitum* de agua en los dos sitios de estudio.

Todos los cerdos de ensayo fueron tratados con vitamina E el Día -2, con inyecciones de hierro el Día -1 y con NAXCEL® (1,0 mL, IM, en jamones alternantes) los Días 16, 17, 18 y 19. Además, el Cerdo n° 52 (Grupo 9) fue tratado con una inyección de hierro el Día 3, el Cerdo 45 (Grupo 6) fue tratado con una inyección de hierro el Día 11, el Cerdo n° 69 (Grupo 8) fue tratado con NAXCEL® el Día 6, el Cerdo n° 74 (Grupo 3) fue tratado con dexametazona y penicilina el Día 14, y el Cerdo n° 51 (Grupo 1) fue tratado con dexametazona y penicilina el Día 13 y con NAXCEL® el Día 14 por diversos motivos de salud.

Mientras se encontraban en los dos sitios de estudio, los cerdos se encontraban bajo cuidado veterinario. Exámenes de la salud de los animales se realizaron el Día 0 y se registraron en el Formulario de Registro del Examen de Salud. Todos los animales gozaba de buen estado de salud y nutricional antes de la vacunación, según se determina por observación el Día 0. Se observó que todos los animales de ensayo gozaba de buen estado de salud y nutricional antes de la exposición. Las carcasas y los tejidos fueron desechados mediante vertido. La disposición final de los animales de estudio fue registrada en el Registro de Disposición Animal (Animal Disposition Record).

El Día 0, los cerdos asignados a los Grupos 1-6, recibieron 1,0 mL de vacunas 1-6 contra PCV2, respectivamente, IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x ½". Los cerdos asignados al Grupo 7 recibieron 2,0 mL de vacuna n° 7 de PCV2, IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x ½". El Día 14, los cerdos asignados al Grupo 7 recibieron 2,0 mL de vacuna n° 7 de PCV2, IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x ½".

El Día 21 todos los cerdos de ensayo recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA IM en la zona del jamón derecho utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x1". El Día 27 todos los cerdos de ensayo recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA IM en la zona del jamón izquierdo utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x1".

El Día 24, los cerdos asignados a los Grupos 1-8 recibieron 1,0 mL de material de exposición ISUVDL de PCV2 (5,11 log₁₀ TCID₅₀/mL), IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x 1". Se administró 1,0 mL adicional del mismo material, IN a cada cerdo (0,5 mL por fosa nasal) utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una cánula nasal.

Los cerdos de ensayo fueron observados diariamente en cuanto a la salud general y sucesos adversos el Día -4 y desde el Día 0 al Día 19. Las observaciones se registraron en el Registro de Observación Clínica. Todos los cerdos de ensayo fueron observados desde el Día 0 hasta el Día 7, y el Grupo 7 fue observado adicionalmente desde el Día 14 hasta el 21, en cuanto a las reacciones del sitio de inyección. La ganancia de peso media diaria se determinó pesando a cada cerdo sobre una escala calibrada los Días -3, 24 y 49, o el día en que se encontró muerto a un cerdo después de la exposición. Los pesos corporales se registraron en el Formulario de Peso Corporal. Los pesos corporales del Día -3 se utilizaron para bloquear a los cerdos antes del reparto aleatorio. Los datos de peso del Día 24 y del Día 49 se utilizaron para determinar la ganancia de peso media diaria (ADWG) para cada cerdo durante estos momentos. Para los cerdos que murieron después de la exposición y antes del Día 49, la ADWG se ajustó para representar la ADWG desde el Día 24 hasta el día de su muerte.

Con el fin de determinar la serología de PCV2, sangre entera venosa se recogió de cada cochinito del seno venoso orbital los Días -3 y 14. Para cada cochinito, la sangre se tomó del seno venoso orbital insertando un tubo capilar estéril en el canto medial de uno de los ojos y drenando aproximadamente 3,0 mL de sangre entera en un Tubo Separador de Suero (SST - siglas en inglés) de 4,0 mL. Los Días 24, 31 y 49 se tomó sangre entera venosa de cada

cerdo de la vena cava anterior utilizando una aguja estéril 18g x 1 ½" Vacutainer (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey), un soporte de aguja Vacutainer y un SST de 13 mL. Las tomas de sangre en cada instante se registraron en el Registro de Toma de Muestras. Se dejó que se coagulara la sangre en cada SST, cada SST fue centrifugado y se recolectó el suero. El suero recolectado fue transferido a un tubo con tapón de cierre rápido estéril y se almacenó a $-70 \pm 10^\circ \text{C}$ hasta que se sometió a ensayo con posterioridad. Las muestras de suero fueron sometidas a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos de PCV2 por parte del personal de BIVI-R&D.

Los cerdos fueron observados una vez al día desde el Día 20 al Día 49 en cuanto a síntomas clínicos y las observaciones clínicas se registraron en el Registro de Observación Clínica.

Con el fin de someter a ensayo la secreción nasal de PCV2, los Días 24, 25, y después cada otro día de estudio impar hasta e incluido el Día 49, se insertó una torunda estéril de dacron por vía intranasal en la fosa nasal izquierda o derecha de cada uno de los cerdos (una torunda por cerdo) de la forma más aséptica posible, se sacudió después de unos pocos segundos y luego se retiró. Cada torunda se dispuso luego en un tubo con tapón de cierre rápido estéril sencillo que contenía 1,0 mL de medio EMEM con IFBS al 2%, 500 unidades/mL de penicilina, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina y 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fungizona. La torunda se partió en el tubo, y el tubo con tapón de cierre rápido se cerró herméticamente y se marcó apropiadamente con un número de animal, número de estudio, fecha de recogida, día de estudio y "torunda nasal". Los tubos con tapón de cierre rápido cerrados herméticamente se almacenaron a $-40 \pm 10^\circ \text{C}$ hasta su transporte durante una noche en hielo a BIVI-St. Joseph. Las recogidas de torundas nasales se registraron en el Formulario de Recogida de Muestras de Torundas Nasales. BIVI-R&D realizó un ensayo de aislamiento de virus (VI - siglas en inglés) cuantitativo en cuanto a PCV2 en muestras de torundas nasales. Los resultados se expresaron en valores \log_{10} . Un valor de 1,3 logs o menor fue considerado negativo, y cualquier valor mayor que 1,3 logs fue considerado positivo.

Se realizó una necropsia a los cerdos que murieron (n^{os} 28, 52, 56, 69, 82 y 93) en el primer sitio de estudio hasta un nivel necesario para determinar un diagnóstico. Se registraron las lesiones macroscópicas y no se guardó ningún tejido procedente de estos cerdos. En el segundo sitio de estudio, se realizó una necropsia a los cerdos que murieron antes del Día 49 (n^{os} 45, 23, 58, 35), a los cerdos a los que se encontró muertos el Día 49 antes de la eutanasia (n^{os} 2, 43) y a los cerdos sometidos a eutanasia el Día 49. Se anotaron cualesquiera lesiones macroscópicas y los porcentajes de lóbulos pulmonares con lesiones se registraron en el Formulario de Informe de la Necropsia.

De cada uno de los 103 cerdos a los que se realizó una necropsia en el segundo sitio de estudio, una muestra de tejido de las tonsilas, pulmones, corazón, hígado, nódulo linfático mesentérico, riñón y nódulo linfático inguinal se dispuso en un solo recipiente con formalina al 10% tamponada; mientras que otra muestra de tejido procedente de los mismos órganos antes mencionados se dispuso en un Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino Unido) y cada Whirl-pak se dispuso en hielo. Cada recipiente se etiquetó apropiadamente. Las recogidas de muestras se registraron en el Formulario de Informe de la Necropsia. Después de ello, muestras de tejido fijado con formalina y el Formulario de Petición de Diagnóstico se suministraron para el ensayo de IHC. El ensayo de IHC se efectuó de acuerdo con procesos de laboratorio estándares ISU para muestras de recepción, preparación de muestras y portaobjetos y técnicas de tinción. Tejidos recientes en Whirl-paks fueron transportados con paquetes de hielo al Monitor del Estudio para el almacenamiento ($-70^\circ \pm 10^\circ \text{C}$) y posible uso futuro. Los tejidos fijados con formalina fueron examinados por un patólogo en cuanto a la detección de PCV2 mediante IHC y se evaluaron utilizando el siguiente sistema de anotación: 0 = ninguno; 1 = tinción escasa positiva, pocos sitios; 2 = tinción moderada positiva, múltiples sitios; y 3 = abundante tinción positiva, difusa por todo el tejido. Debido al hecho de que el patólogo no podía diferenciar positivamente los NL inguinales de los NL mesentéricos, los resultados para estos tejidos fueron etiquetados simplemente como Nódulos Linfáticos y la puntuación daba la puntuación más alta para cada uno de los dos tejidos por animal.

Resultados

Se dan seguidamente los resultados para este ejemplo. Se señala que un cerdo del Grupo 9 murió antes del Día 0, y 5 cerdos más murieron post-vacunación (1 cerdo del Grupo 4; 1 cerdo del Grupo 6; 2 cerdos del Grupo 8; y 1 cerdo del Grupo 9). El exmaen post-mortem indicaba que todos los seis murieron debido a infecciones subyacentes que no estaban asociadas con la vacunación ni con PMWS. Adicionalmente, en ninguno de los grupos se observaron sucesos adversos ni reacciones en el sitio de la inyección.

Los resultados de la ganancia de peso media diaria (ADWG) se presentan a continuación en la Tabla 6. El Grupo 9, el grupo control estricto negativo, tenía la ADWG más alta ($0,48 \pm 0,09 \text{ kg/día}$), seguido del Grupo 5 ($0,43 \pm 0,10 \text{ kg/día}$), que recibieron una dosis de 8 μg de rORF2. El Grupo 3, que recibió una dosis de 4 μg de vORF2, tenía la ADWG más baja ($0,22 \pm 0,09 \text{ kg/día}$), seguido del Grupo 7 ($0,23 \pm 0,07 \text{ kg/día}$), que recibieron 2 dosis de vacuna muerta.

Tabla 6. Sumario de la Ganancia de Peso Media Diaria (ADWG)

Grupo	Tratamiento	N	ADWG - kg/día (Día 24 a Día 49) o ajustada para cerdos muertos antes del Día 29
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	0,39 ± 0,13 kg/día
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	0,32 ± 0,14 kg/día
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	0,22 ± 0,09 kg/día
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	0,38 ± 0,14 kg/día
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	0,43 ± 0,09 kg/día
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	0,33 ± 0,11 kg/día
7	KV (2 dosis)	12	0,23 ± 0,07 kg/día
8	Controles de Exposición	10	0,34 ± 0,09 kg/día
9	Controles Estrictos Negativos	11	0,48 ± 0,08 kg/día

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

5 Los resultados de la serología de PCV2 se presentan a continuación en la Tabla 7. Todos los nueve grupos eran seronegativos para PCV2 el Día -3. El Día 14, los Grupos que recibieron vacunas de vORF2 tenían los títulos más elevados, que oscilaban entre 187,5 y 529,2. Los cerdos que recibieron vacunas virales muertas tenían los títulos siguientes más altos, seguidos de los grupos que recibían vacunas de rORF2. Los Grupos 8 y 9 permanecieron seronegativos en este momento. El Día 24 y el Día 31 los cerdos que recibieron vacunas de vORF2 continuaban demostrando una fuerte respuesta serológica, seguida de cerca del grupo que recibía dos dosis de una vacuna viral muerta. Los cerdos que recibían vacunas de rORF2 respondían serológicamente más lentamente y los Grupos 8 y 9 continuaban siendo seronegativos. El Día 49, los cerdos que recibían vacuna de vORF2, 2 dosis de la vacuna viral muerta y la dosis más baja de rORF2 demostraron las respuestas serológicas más fuertes. Los cerdos que recibieron 16 µg y 8 µg de vacunas de rORF2 tenían títulos IFA ligeramente más altos que los controles de exposición. El Grupo 9 el Día 49 mostró una fuerte respuesta serológica.

15 **Tabla 7. Sumario del Grupo de Títulos IFA de PCV2**

TÍTULO IFA MEDIO						
Grupo	Tratamiento	Día -3	Día 14	Día 24	Día 31**	Día 49***
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	50,0	529,2	4400,0	7866,7	11054,5
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	50,0	500,0	3466,7	6800,0	10181,8
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	50,0	187,5	1133,3	5733,3	9333,3
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	50,0	95,5	1550,0	3090,9	8000,0
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	50,0	75,0	887,5	2266,7	7416,7
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	50,0	50,0	550,0	3118,2	10570,0
7	KV (2 dosis)	50,0	204,2	3087,5	4620,8	8680,0
8	Controles de exposición	50,0	55,0	50,0	50,0	5433,3
9	Controles Estrictos Negativos	50,0	59,1	59,1	54,5	6136,4

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

*Para fines de cálculo, un título IFA ≤100 se designó como un título de "50"; un título IFA ≥ 6400 se designó como un título de "12.800".

20 **Día de la exposición

***Día de la Necropsia

25 Los resultados de las observaciones clínicas después de la -exposición se presentan a continuación en la Tabla 8. Este sumario de resultados incluye observaciones del Comportamiento Anormal, Respiración Anormal, Tos y Diarrea. La Tabla 9 incluye los resultados del Sumario de Incidencia de los Síntomas Clínicos Globales del Grupo y la Tabla 10 incluye los resultados del Sumario de Tasas de Mortalidad del Grupo Post-exposición. El síntoma clínico más común señalado en este estudio era el comportamiento anormal, el cual se clasificó como letargia de suave a grave. Los cerdos que recibían las 2 dosis más bajas de vORF2, los cerdos que recibían 16 µg de rORF2 y los

cerdos que recibían 2 dosis de vacuna KV tenían tasas de incidencia de = 27,3%. Los cerdos que recibían 8 µg de rORF2 y el grupo control estricto negativo no tenían un comportamiento anormal. Ninguno de los cerdos en este estudio mostró respiración anormal. El acceso de tos se observó con frecuencia en todos los grupos (0 a 25%), al igual que la diarrea (0-20%). Ninguno de los síntomas clínicos señalados era patonómico para PMWS.

- 5 La incidencia global de los síntomas clínicos varió entre grupos. Los grupos que recibían cualquiera de las vacunas de vORF2, el grupo que recibía 16 µg de rORF2, el grupo que recibía 2 dosis de vacuna KV y el grupo control de exposición tenían la incidencia más alta de síntomas clínicos globales (= 36,4%). El grupo control estricto negativo, el grupo que recibía 8 µg de rORF2 y el grupo que recibía 4 µg de rORF2 tenían tasas de incidencia globales de síntomas clínicos de 0%, 8,3% y 9,1%, respectivamente.
- 10 También variaba las tasas de mortalidad global entre grupos. El grupo que recibía 2 dosis de vacuna de KV tenía la tasa de mortalidad más alta (16,7%); mientras que los grupos que recibían 4 µg de vORF2, 16 µg de rORF2 u 8 µg de rORF2 y el grupo control estricto negativo tenían todas las tasas de mortalidad del 0%.

Tabla 8. Sumario de Observaciones del Grupo para el Comportamiento Anormal, Respiración Anormal, Tos y Diarrea

Grupo	Tratamiento	N	Comportamiento Anormal ¹	Comportamiento Anormal ²	Tos ³	Diarrea ⁴
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	4/12 (33,3%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	1/12 (8,3%)
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	8/12 (66,7%)	0/12 (0%)	2/12 (16,7%)	1/12 (8,3%)
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 dosis)	12	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)
8	Controles de exposición	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	Controles Estrictos Negativos	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

15 vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

¹Número total de cerdos en cada grupo que mostraron algún comportamiento anormal durante al menos un día

²Número total de cerdos en cada grupo que mostraron alguna respiración anormal durante al menos un día

³Número total de cerdos en cada grupo que mostraron tos durante al menos un día

20 ⁴Número total de cerdos en cada grupo que mostraron diarrea durante al menos un día

Tabla 9. Sumario de la Incidencia Global del Grupo de Síntomas Clínicos

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con Síntomas Clínicos ¹	Tasa de Incidencia
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	5	41,7 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	5	41,7 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	8	66,7 %
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	4	36,4 %
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	1	9,1 %
7	KV (2 dosis)	12	7	58,3 %
8	Controles de exposición	10	4	40 %
9	Controles Estrictos Negativos	11	0	0 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

¹Número total de cerdos en cada grupo que mostró cualquier síntoma clínico durante al menos un día

Tabla 10. Sumario de las Tasas de Mortalidad del Grupo Post-exposición

Grupo	Tratamiento	N	Muertes Post-exposición	Tasa de Mortalidad
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	0	0 %
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	0	0 %
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	0	0 %
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	1	9,1 %
7	KV (2 dosis)	12	2	16,7 %
8	Controles de exposición	10	1	10 %
9	Controles Estrictos Negativos	11	0	0 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

5 Los resultados de la secreción nasal de PCV2 se presentan a continuación en la Tabla 11. Después del exposición el Día 24, 1 cerdo en el Grupo 7 comenzó a secretar PCV2 el Día 27. Ninguno de los otros grupos experimentó la secreción hasta el Día 33. La cuantía de secreción nasal se anotó desde el Día 35 al Día 45. Grupos que recibían cualquiera de las tres vacunas de vORF2 y grupos que recibían 4 u 8 µg de rORF2 tenían la incidencia más baja de secreción nasal de PCV2 ($\leq 9,1\%$). El grupo control de exposición (Grupo 8) tenía la tasa de secreción más alta (80%), seguido del grupo control estricto negativo (Grupo 9), que tenía una tasa de incidencia de 63,6%.

10

Tabla 11. Sumario de la Incidencia de Secreción Nasal de PCV2 en el Grupo

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que secretó durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	2	18,2 %
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	1	9,1 %
7	KV (2 dosis)	12	5	41,7 %
8	Controles de exposición	10	8	80 %
9	Controles Estrictos Negativos	11	7	63,6 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

15

El Sumario de la Incidencia de Ictericia del Grupo, la Incidencia de Úlceras Gástricas en el Grupo, las Anotaciones de Lesiones Pulmonares Medias del Grupo y la Incidencia de Lesiones Pulmonares en el Grupo se muestran a continuación en la Tabla 12. Seis cerdos murieron en el primer sitio de ensayo durante la fase de post-vacunación del estudio (Grupo 4, N = 1; Grupo 6, N = 1; Grupo 8, N = 2; Grupo 9, N = 2). Cuatro de seis cerdos tenían lesiones fibrosas en una o más cavidades corporales, un cerdo (Grupo 6) tenía lesiones consistente con una enfermedad clostridial, y un cerdo (Grupo 9) no tenía lesiones macroscópicas. Ninguno de los cerdos que murieron durante la fase post-vacunación del estudio tenía lesiones consistentes con PMWS.

20

Se realizó una necropsia a cerdos que murieron después de la -exposición y a cerdos sometidos a eutanasia el Día 49. En la necropsia, no estaban presentes en ningún grupo ictericia ni úlceras gástricas. Con respecto a % medio en las lesiones pulmonares, el Grupo 9 tenía el % medio más bajo en las lesiones pulmonares (0%), seguido del Grupo 1 con $0,40 \pm 0,50\%$ y del Grupo 5 con $0,68 \pm 1,15\%$. Los Grupos 2, 3, 7 y 8 tenían el % medio más alto en las lesiones pulmonares (= 7,27%). Cada uno de estos cuatro grupos contenía un cerdo con un % de lesiones pulmonares = 71,5%, que sesgó más altos los resultados para estos cuatro grupos. Con la excepción del Grupo 9 con un 0% de lesiones pulmonares observadas, los restantes 8 grupos tenía un = 36% de lesiones pulmonares. Casi todas la lesiones pulmonares observadas se describieron como rojas/púrpura y se consolidaron.

25

Tabla 12. Sumario de la Incidencia de Ictericia en el Grupo, Incidencia de Úlceras Gástricas en el Grupo, % Medio de Anotaciones de Lesiones Pulmonares en el Grupo e Incidencia de Lesiones Pulmonares en el Grupo Anotados

Grupo	Tratamiento	Ictericia	Úlceras Gástricas	% Medio de Lesiones Pulmonares	Incidencia de Lesiones Pulmonares Anotadas
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,40 ± 0,50%	10/12 (83%)
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,41 ± 20,2%	10/12 (83%)
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	9,20 ± 20,9%	10/12 (83%)
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	1,5 ± 4,74%	4/11 (36%)
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,68 ± 1,15%	9/12 (75%)
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2,95 ± 5,12%	7/11 (64%)
7	KV (2 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,27 ± 22,9%	9/12 (75%)
8	Controles de exposición	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9,88 ± 29,2%	8/10 (80%)
9	Controles Estrictos Negativos	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

El Sumario de los Resultados de la Incidencia IHC Positiva en el Grupo se muestran en la Tabla 13. El Grupo 1 (vORF2 - 16 µg) y el Grupo 5 (rORF2 - 8 µg) tenían la tasa más baja de los resultados IHC positivos (16,7%). El Grupo 8 (Controles de exposición) y el Grupo 9 (Controles Estrictos Negativos) tenían la tasa más alta de los resultados IHC positivos, 90% y 90,9%, respectivamente.

Tabla 13. Sumario de la Tasa de Incidencia IHC Positiva en el Grupo

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que tenían al menos un tejido positivo para PCV2	Tasa de Incidencia
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	2	16,7 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	3	25,0 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	8	66,7 %
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	4	36,3 %
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	2	16,7 %
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	4	36,4 %
7	KV (2 dosis)	12	5	41,7 %
8	Controles de exposición	10	9	90,0 %
9	Controles Estrictos Negativos	11	10	90,9 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

Después de la-exposición, el Grupo 5, que recibió una dosis de 8 µg de antígeno rORF2, superó a los otros 6 grupos de vacuna. El Grupo 5 tenía la ADWG más alta (0,43 ± 0,10 kg/día), la incidencia más baja de comportamiento anormal (0%), la segunda incidencia más baja de tos (8,3%), la incidencia más baja de síntomas clínicos globales (8,3%), la tasa de mortalidad más baja (0%), la tasa más baja de secreción nasal de PCV2 (8,3%), la segunda tasa más baja del % medio de lesiones pulmonares (0,68 ± 1,15%) y la tasa de incidencia más baja para tejidos positivos (16,7%). Grupos que recibían diversos niveles de antígeno rORF2 superó globalmente a grupos que recibían diversos niveles de vORF2 y el grupo que recibía 2 dosis de vacuna contra PCV2 de células enteras muertas se manifestó el peor. Las Tablas 14 y 15 contienen sumarios de datos post-exposición del grupo.

Tabla 14. Sumario de Datos Post-exposición en el Grupo - Parte 1

Grupo	N	Tratamiento	ADWG (kg/día)	Comportamiento Anormal	Tos	Incidencia Global de Síntomas Clínicos
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	0,39 ± 0,13%	2/12 (16,7%)	3/12 (25%)	41,7 %
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	0,32 ± 0,14%	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)	41,7 %
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	0,22 ± 0,09%	8/12 (66,7%)	2/12 (16,7%)	66,7 %
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	0,38 ± 0,14%	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	36,4 %
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	0,43 ± 0,10%	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	8,3 %
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	0,33 ± 0,11%	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	9,1 %
7	12	KV (2 dosis)	0,23 ± 0,07%	7/12(58,3)	0/12 (0%)	58,3 %
8	10	Controles de exposición	0,34 ± 0,09%	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40 %
9	11	Controles Estrictos Negativos	0,48 ± 0,07%	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

Tabla 15. Sumario de Datos Post-exposición en el Grupo - Parte 2

Grupo	N	Tratamiento	Tasa de Mortalidad	Secreción Nasal	% Medio de Lesiones Pulmonares	Tasa de Incidencia de al menos un tejido IHC positivo para PCV2
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	8,3 %	8,3 %	0,40 ± 0,50%	16,7 %
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	8,3 %	8,3 %	7,41 ± 20,2%	25,0 %
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	0 %	8,3 %	9,20 ± 20,9%	66,7 %
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	0 %	18,2 %	1,50 ± 4,74%	36,3 %
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	0 %	8,3 %	0,68 ± 1,15%	16,7 %
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	9,1 %	9,1 %	2,95 ± 5,12%	36,4 %
7	12	KV (2 dosis)	16,7 %	41,7 %	7,27 ± 22,9%	41,7 %
8	10	Controles de exposición	10 %	80 %	9,88 ± 29,2%	90,0 %
9	11	Controles Estrictos Negativos	0 %	63,6 %	0/11 (0%)	90,9 %

5 vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

10 Los resultados de este estudio indican que todos los esfuerzos adicionales de vacunas deberían dirigirse a una vacuna de rORF2. En general, la secreción nasal de PCV2 fue detectada post-exposición y la vacunación con una vacuna contra PCV2 dio como resultado una reducción de la secreción. La inmunohistoquímica de tejidos linfoides seleccionados servía también como un buen parámetro de la eficacia de la vacuna, mientras que grandes diferencias en la ADWG, los síntomas clínicos y las grandes lesiones no se detectaron entre grupos. Este estudio se complicó por el hecho de que PCV2 extraño se introdujo en el mismo punto durante el estudio, según se evidencia por la secreción nasal de PCV2, seroconversión de PCV2 y tejidos IHC positivos en el Grupo 9, el grupo control estricto negativo.

15 Discusión

20 Siete vacunas contra PCV2 fueron evaluadas en este estudio, que incluía tres niveles de dosis diferentes de antígeno vORF2 administrada una vez al Día 0, tres niveles de dosis diferentes de antígeno rORF2 administrados una vez el Día 0 y un nivel de dosis de vacuna contra PCV2 de células enteras muertas, administrada el Día 0 y el Día 14. En general, el Grupo 5, que recibía 1 dosis de vacuna que contenía 8 µg de antígeno rORF2, tenía los mejores resultados. El Grupo 5 tenía la ADWG más alta, la incidencia más baja de comportamiento anormal, la incidencia más baja de respiración anormal, la segunda incidencia más baja de tos, la incidencia más baja de síntomas clínicos globales, la tasa de mortalidad más baja, la tasa más baja de secreción nasal de PCV2, la segunda tasa más baja del % medio de lesiones pulmonares y la tasa de incidencia más baja para tejidos IHC positivos.

25 De manera interesante, el Grupo 4, que recibió una dosis más alta de antígeno rORF2 que el Grupo 5, no se

comportó tan bien ni mejor que el Grupo 5. El Grupo 4 tenía una ADWG ligera menor, una mayor incidencia de comportamiento anormal, una mayor incidencia de síntomas clínicos globales, una mayor tasa de secreción nasal de PCV2, un mayor % medio de lesiones pulmonares y una mayor tasa de tejidos IHC positivos que el Grupo 5. Los análisis estadísticos, que pueden indicar que las diferencias entre estos dos grupos no eran estadísticamente significativas, no se realizaron en estos datos, pero existía una tendencia observada de que el Grupo 4 no se comportaba tan bien como el Grupo 5.

Post-vacunación, 6 cerdos murieron en el primer sitio de estudio. Cuatro de los seis cerdos procedían del Grupo 8 o del Grupo 9, que no recibieron ninguna vacuna. Ninguno de los seis cerdos mostró lesiones consistentes con PMWS, no se informó de sucesos adversos y, en general, las siete vacunas parecían ser seguras cuando se administraban a cerdos de aproximadamente 11 días de edad. Durante la fase de post-vacunación del estudio, los cerdos recibieron tres niveles de dosis de vacuna vORF2 o la vacuna de células enteras muertas tenía los niveles IFAT más altos, mientras que el Grupo 5 tenía los niveles IFAT más bajos justo antes de la exposición de los grupos de vacuna.

A pesar de que no se ha demostrado formalmente, se piensa que la vía predominante de transmisión de PCV2 a cerdos jóvenes poco después del destete es por contacto oronasal directo y una vacuna eficaz que reduce la secreción nasal de PCV2 en un ajuste de producción ayudaría a controlar la difusión de la infección. Grupos que recibían uno de los tres niveles de antígeno de vORF2 y el grupo que recibía 8 µg de rORF2 tenía la tasa de incidencia más baja de secreción nasal de PCV2 (8,3%). De manera esperada, el grupo control de exposición tenía la tasa de incidencia más alta de secreción nasal (80%).

Lesiones macroscópicas en cerdos con PMWS secundaria a la infección por PCV2 consistía típicamente en linfadenopatía generalizada en combinación con uno o más de lo siguiente: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis. En la necropsia, no se observaron ictericia, hepatitis, nefritis y úlceras gástricas en ninguno de los grupos y no se examinó específicamente la linfadenopatía. El % medio de puntuaciones de lesiones pulmonares variaba entre grupos. El grupo que recibía 16 µg de antígeno vORF2 tenía el % medio más bajo de puntuaciones de lesiones pulmonares ($0,40 \pm 0,50\%$), seguido del grupo que recibía 8 µg de rORF2 ($0,68 \pm 1,15\%$). Como era de esperar, el grupo control de exposición tenía el % medio más alto de puntuaciones de lesiones pulmonares ($9,88 \pm 29,2\%$). En los cuatro grupos, el % medio de puntuaciones de lesiones pulmonares se elevó debido a un cerdo en cada uno de estos grupos que tenía puntuaciones muy altas de lesiones pulmonares. La mayor parte de las lesiones pulmonares se describieron como rojas/púrpura y se consolidaron. Típicamente, las lesiones pulmonares asociadas con PMWS se describen como de color canela y no colapsables con edema interlobular. Las lesiones pulmonares anotadas en este estudio no se asociaron con una infección por PCV2 o puede estar presente un segundo agente infeccioso pulmonar. Dentro del contexto de este estudio, el % de puntuación de lesiones pulmonares no refleja, probablemente, una medida verdadera de la cantidad de infección pulmonar debida a PCV2.

Otros investigadores han demostrado una correlación directa entre la presencia de antígeno de PCV2 por IHC e histopatología. No se realizó con este estudio la histopatología en tejidos seleccionados. El Grupo 1 (16 µg de vORF2) y el Grupo 5 (8 µg de rORF2) tenían la tasa de incidencia más baja de cerdos positivos en cuanto al antígeno de PCV2 (8,3%), mientras que el Grupo 9 (el grupo control estricto negativo - 90,9%) y el Grupo 8 (el grupo control de exposición - 90,0%) tenía las tasas de incidencia más altas de cerdos positivos en cuanto al antígeno de PCV2. Debido a la naturaleza no subjetiva de este ensayo, los resultados de IHC son, probablemente, uno de los mejores parámetros para juzgar la eficacia de la vacuna.

Así, en un aspecto de la presente invención, se determinó la Dosificación Protectora Mínima (MPD - siglas en inglés) de una dosis de 1 ml/l de dosis de producto recombinante con antígeno de ORF2 de PCV2 (rORF2) extraído en el modelo de cerdos CDCD en la cara de un exposición de PCV2. De los tres grupos que recibían niveles variables de antígeno rORF2, el Grupo 5 (8 µg de antígeno rORF2) tenían claramente el nivel de protección más alto. El Grupo 5 tenía los mejores resultados o empataba con los resultados más favorables con relación a todos los parámetros examinados. Cuando el Grupo 5 se comparó con los otros seis grupos de vacuna post-enfriamiento, el Grupo 5 tenía la ADWG más alta ($0,43 \pm 0,10$ kg/día), la incidencia más baja de comportamiento anormal (0%), la segunda incidencia más baja de tos (8,3%), la incidencia más baja de síntomas clínicos globales (8,3%), la tasa de mortalidad más baja (0%), la tasa más baja de secreción nasal de PCV2 (8,3%), la segunda tasa más baja del % medio de lesiones pulmonares ($0,68 \pm 1,15\%$) y la tasa de incidencia más baja para tejidos IHC positivos (16,7%).

En otro aspecto de la presente invención, se determinó la MPD de 1 ml/l de dosis de producto convencional que es antígeno de ORF2 de PCV2 (vORF2) parcialmente purificado en el modelo de cerdos CDCD en la cara de un exposición con PCV2. De los tres grupos que recibían niveles variables de antígeno vORF2, el Grupo 1 (16 µg de antígeno vORF2) tenían claramente el nivel de protección más alto. El Grupo 1 superó a los Grupos 2 y 3 con respecto a la ADWG, el % medio de lesiones pulmonares e IHC. Los Grupos 1 y 2 (8 µg de antígeno vORF2) se comportaron de manera igual con respecto a la incidencia global de síntomas clínicos, el Grupo 3 (4 µg de antígeno vORF2) tenía la tasa de mortalidad más baja, y los tres grupos se comportaron de igual manera con respecto a la secreción nasal. En general, vacunas de vORF no se comportaban tan bien como las vacunas de rORF.

Todavía en otro aspecto de la presente invención, se determinó la eficacia de una dosis máxima de 2 ml/2 dosis de

5 vacuna convencional PCV2 muerta en el modelo de cerdos CDCD en la cara de un exposición con PCV2. De las siete vacunas evaluadas en este estudio, se comportaba de la peor manera la vacuna contra PCV2 de células enteras muertas. Cochinitos que recibían dos dosis de vacuna contra PCV2 de células enteras muertas tenían la ADWG más baja, la segunda tasa más alta de comportamiento anormal (58,3%), la segunda incidencia global más alta de síntomas clínicos (58,3%), la tasa de mortalidad más alta (16,7%), la segunda incidencia más alta de secreción nasal (41,7%), el % medio más alto de lesiones pulmonares ($9,88 \pm 29,2\%$), una alta incidencia de lesiones pulmonares anotada (75%) y una tasa moderada de incidencia de IHC en tejidos (41,7%). Sin embargo, seguía siendo eficaz para crear una respuesta inmune.

10 Todavía en otro aspecto de la presente invención, la secreción nasal de PCV2 se verificó como un parámetro de eficacia y se re-confirmaron a partir de estudios previos los parámetros de eficacia contra PCV2 previos. Los resultados de este estudio indican que la secreción nasal de PCV2 se produce tras un exposición intranasal y que las vacunas contra PCV2 reducen la secreción nasal de PCV2 post-exposición. Además, los resultados de este estudio y los informes en la bibliografía indican que debería continuar IHC para ser evaluado también en futuros ensayos de la vacuna contra PCV2.

15 Algunas conclusiones adicionales que surgen de este estudio son que la linfadenopatía es un distintivo de PMWS. Otro de los distintivos de PMWS es el agotamiento linfoide e histiocitos multinucleados/gigantes. Adicionalmente, no se observaron sucesos adversos ni reacciones en el sitio de inyección para ninguna de las 7 vacunas contra PCV2, y las 7 vacunas contra PCV2 parecían ser seguras cuando se administraban a cerdos jóvenes.

Ejemplo 5

20 Este ejemplo somete a ensayo la eficacia de ocho vacunas candidatas contra PCV2 y reconfirma los parámetros de exposición a PCV2 de estudios de exposición anteriores después de la exposición a una cepa virulenta de PCV2. Ciento cincuenta (150) cochinitos desprovistos de calostro derivado de la cesárea (CDCD), de 6-16 días de edad, se bloquearon en peso y se dividieron al azar en 10 grupos de igual tamaño. La Tabla 16 recoge el Diseño de Estudio General para este Ejemplo.

25 **Tabla 16. Diseño de Estudio General**

Grupo	Nº de Cerdos	Tratamiento	Día de Tratamiento	KLH/ICFA el Día 22 y el Día 28	Provocación con PCV2 Virulento el Día 25	PRRSV MLV el Día 46	Necropsia el Día 50
1	15	Vacuna 1 contra PVC2 16 µg rORF2 – IMS 1314	0 y 14	+	+	+	+
2	15	Vacuna 2 contra PVC2 16 µg vORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
3	15	Vacuna 3 contra PCV2 16 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
4	15	Vacuna 2 contra PCV2 16 µg vORF2 – Carbopol	0	+	+	+	+
5	15	Vacuna 3 contra PVC2 4 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
6	15	Vacuna 3 contra PVC2 1 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
7	15	Vacuna 3 contra PVC2 0,25 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
8	15	Vacuna 4 contra PVC2 > 8,0 log KV – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
9	15	Controles de exposición	N/A	+	+	+	+
10	15	Ninguno - Grupo Control Negativo Estricto	N/A	+	-	+	+

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

La formulación de vacuna dada a cada uno de los grupos era como sigue. La vacuna nº 1 contra PCV2, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 1, era una dosis elevada (16 µg/2 ml de dosis) de antígeno ORF2 recombinante inactivado con coadyuvante IMS 1314 (16 µg de rORF2 – IMS 1314). La vacuna nº 2 contra PCV2, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 2, era una dosis elevada (16 µg/2 ml de dosis) de un antígeno ORF2 de PCV2 generado por VIDO R-1 y parcialmente purificado adyuvado con Carbopol (16 µg de vORF2 – Carbopol). La vacuna nº 3 contra PCV2, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 3, era una dosis elevada (16 µg/2 ml de dosis) de antígeno ORF2 recombinante inactivado con coadyuvante Carbopol (16 µg de rORF2 – Carbopol). La vacuna nº 4 contra PCV2, administrada a una dosis de 1 x 1 ml al Grupo 4, era una dosis elevada (16 µg/1 ml de dosis) de un antígeno ORF2 de PCV2 generado por VIDO R-1 y parcialmente purificado adyuvado con Carbopol (16 µg de vORF2 – Carbopol). La vacuna nº 5 contra PCV2, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 5, era una dosis elevada 4 µg/2 ml de dosis de un antígeno ORF2 recombinante inactivado con coadyuvante Carbopol (4 µg de rORF2 – Carbopol). La vacuna nº 6 contra PCV2, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 6, era una dosis elevada 1 µg/2 ml de dosis de un antígeno ORF2 recombinante inactivado con coadyuvante Carbopol (1 µg de rORF2 – Carbopol). La vacuna nº 7 contra PCV2, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 7, era una dosis baja (0,25 µg/2 ml de dosis) de antígeno ORF2 recombinante inactivado con coadyuvante Carbopol (0,25 µg de rORF2 – Carbopol). La vacuna nº 8 contra PCV2, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 8, era una dosis elevada (título de pre-inactivación > 8,0 log/2 ml de dosis) de un antígeno Struve de PCV2 generado por VIDO R-1 inactivado convencional adyuvado con Carbopol (>8,0 log KV – Carbopol). El Día 0, los Grupos 1 - 8 fueron tratados con sus vacunas asignadas. Los Grupos 1-3 y 5-8 recibieron refuerzos de sus vacunas respectivas de nuevo el Día 14. La eficacia de una dosis única de 16 µg de vORF2 – Carbopol se sometió a ensayo en el Grupo 4 que no recibió un refuerzo el Día 14. Los cochinitos fueron observados en cuanto a sucesos adversos y las reacciones del sitio de inyección después de las dos vacunaciones. El Día 21 los cochinitos fueron trasladados a un segundo sitio de estudio en donde los Grupos 1-9 fueron alojados agrupados en un edificio y el Grupo 10 fue alojado en un edificio separado. Todos los cerdos recibieron hemocianina de lapa bocallave emulsionada con coadyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA) los Días 22 y 28. El Día 25, los Grupos 1-9 fueron enfrentados con aproximadamente 4 logs de virus PCV2 virulento. Hacia el Día 46 se habían producido muy pocas muertes en el grupo control de provocación. En un intento de inmunoestimular los cerdos y de aumentar la virulencia del material de provocación de PCV2, todos los Grupos fueron tratados con INGELVAC® PRRSV MLV (Vacuna Reproductora y Respiratoria Porcina, Virus Vivo Modificado) el Día 46.

Antes y después del provocación se tomaron muestras de sangre para la serología del PCV2. Post-provocación, se recogieron los datos de peso corporal para la determinación de la ganancia de peso media diaria (ADWG) y observaciones de síntomas clínicos. El Día 50, se realizó una necropsia a todos los cerdos supervivientes, se registraron lesiones macroscópicas, se puntuó a los pulmones en cuanto a la patología, y tejidos seleccionados fueron conservados en formalina para su examen por inmunohistoquímica (IHC) para la detección posterior de antígeno de PCV2.

Materiales y Métodos

Este era un estudio de capacidad de provocación frente a la vacunación parcialmente ciego realizado en cerdos CDCD, de 6 a 16 días de edad el Día 0. Para ser incluidos en el estudio, los títulos IFA de cerdas eran = 1:1000. Adicionalmente, el estado serológico de cerdas procedía de una piara PRRS-negativa conocida. Se sometió a ensayo a dieciseis (16) cerdas en cuanto al estado serológico de PCV2 y las dieciseis (16) tenían un título de PCV2 de = 1000 y fueron transferidas al primer sitio de estudio. Ciento cincuenta (150) cochinitos fueron proporcionados mediante cirugía por sección cesárea y estaban disponibles para este estudio el Día -3. El Día -3, se pesaron 150 cerdos CDCD en el primer sitio de estudio, se identificaron con etiquetas de oreja, se bloquearon por el peso y se asignaron al azar a 1 de 10 grupos, según se recoge antes en la tabla 16. Muestras de sangre fueron tomadas de todos los cerdos. Si cualquier animal de ensayo que cumplía los criterios de inclusión fue enrolado en el estudio y posteriormente fue excluido por cualquier motivo, el Investigador y Monitor consultó con el fin de determinar el uso de datos recogidos del animal en el análisis final. Se documentó la fecha en donde se excluyó a los cerdos enrolados y el motivo de la exclusión. No se excluyeron cerdas que cumplían con los criterios de inclusión, seleccionadas para el estudio y fueron transportadas al primer sitio de estudio. No se excluyeron cochinitos del estudio, y antes de terminar no se retiró del estudio a ningún animal de ensayo. La Tabla 17 describe los intervalos de tiempo para las actividades clave de este Ejemplo.

Tabla 17. Actividades de Estudio

Día de Estudio	Fechas Reales (dd/mm/aa)	Actividad de Estudio
-3	04/04/03	Los cerdos se pesan; se hace un examen de salud; se distribuyen al azar en grupos; se toman muestras de sangre
-3 0-21	04/04/03 del 07/04/03 al 27/05/03	Se vigila la salud general y los eventos adversos post-vacunación
0	07/04/03	Se administran los IVPs respectivos a los Grupos 1-8
0-7	del 07/04/03 al 14/04/03	Se vigilan las reacciones en los sitios de inyección de los cerdos
14	21/04/03	Los Grupos 1-3, 5-8 se refuerzan con los respectivos IVPs; se toman muestras de sangre de todos los cerdos
14-21	del 21/04/03 al 28/04/03	Se vigilan las reacciones a la inyección en los cerdos
19-21	del 26/04/03 al 28/04/03	Se tratan todos los cerdos con antibióticos
21	28/04/03	Se transportan los cerdos desde Struve Labs, Inc. a Veterinary Resources, Inc. (VRI)
22-50	del 28/04/03 al 27/05/03	Se vigilan los síntomas clínicos post-exposición en los cerdos
22	29/04/03	Los grupos 1-10 se tratan con KLH/ICFA
25	02/05/03	Se toman muestras de sangre de todos los cerdos; se pesan todos los cerdos; los Grupos 1-9 se exponen al material de exposición de PCV2
28	05/05/03	Los grupos 1-10 se tratan con KLH/ICFA
32	09/05/03	Se toman muestras de sangre de todos los cerdos
46	23/05/03	Se administra INGELVAC® PRRS MLV a todos los grupos
50	27/05/03	Se toman muestra de sangre, se pesan y someten a necropsia todos los cerdos; se registran lesiones macroscópicas; se evalúan las lesiones en los pulmones; se guardan muestras de tejido recientes y fijadas con formalina; se completa la fase <i>in vivo</i> del estudio

Después de completarse la fase *in vivo* del estudio, tejidos fijados con formalina fueron examinados por inmunohistoquímica (IHC) para la detección de antígeno de PCV2 por parte de un patólogo, las muestras de sangre se evaluaron en cuanto a la serología de PCV2 y la ganancia de peso media diaria (ADWG) fue determinada desde el Día 25 al Día 50.

Los animales fueron alojados en el primer sitio de estudio en jaulas individuales en siete recintos desde el nacimiento hasta aproximadamente 11 días de edad (aproximadamente el Día 0 del estudio). Cada recinto era idéntico en su distribución y consistía en jaulas de acero inoxidable individuales apiladas, siendo suministrado aire calentado y filtrado por separado a cada una de las unidades de aislamiento. Cada recinto disponía de calor y ventilación separados, proporcionando con ello una contaminación cruzada de aire entre los recintos. Los animales fueron alojados en dos edificios diferentes en el segundo sitio de estudio. El Grupo 10 (el grupo control estricto negativo) fue alojado por separado en un edificio de acabado convertido y los Grupos 1-9 fueron alojados en un edificio de parto convertido. Cada grupo fue alojado en un redil separado (14-15 cerdos por redil) y cada redil proporcionaba aproximadamente 1 metro cuadrado por cerdo. Los Grupos 2, 4 y 8 fueron alojados en tres rediles adyacentes en un lado del pasadizo y los Grupos 1, 3, 5, 6, 7 y 9 fueron alojados en seis rediles adyacentes en el otro lado del pasadizo. La separación de los Grupos era debida a la preocupación del Monitor del Estudio de que vacunas administradas a los Grupos 2, 4 y 8 no habían sido inactivadas por completo. Cada redil se encontraba sobre una cubierta elevada con pisos de lamas de plástico. Un foso debajo de los rediles servía como depósito de excrementos y desechos. Cada edificio tenía sus sistemas calefactores y de ventilación separados, con escasa probabilidad de contaminación cruzada de aire entre los edificios.

En el primer sitio de estudio, los cochinitos fueron alimentados con una ración de leche especialmente formulada desde el nacimiento hasta aproximadamente 3 semanas de edad. Todos los cochinitos consumían una ración

sólida, especial mixta el Día 21 (aproximadamente 4 ½ semanas de edad). En el segundo sitio de estudio, se alimentó a todos los cerdos con una ración mixta comercial habitual, no medicada, en cuanto a su edad y peso, *ad libitum*. También se disponía *ad libitum* de agua en los dos sitios de estudio.

5 Todos los cerdos fueron tratados con 1,0 mL de NAXCEL®, IM, en jamones alternantes los Días 19, 20 y 21. Además, el Cerdo nº 11 (Grupo 1) fue tratado con 0,5 mL de NAXCEL® el Día 10, el Cerdo nº 13 (Grupo 10) fue tratado con 1 mL de penicilina y 1 mL de PREDEF® 2X el Día 10, el Cerdo nº 4 (Grupo 9) fue tratado con 1,0 mL de NAXCEL® IM el Día 11, y los Cerdos 1 (Grupo 1), 4 y 11 fueron tratados cada uno con 1,0 mL de NAXCEL® el Día 14 por diversos motivos de salud.

10 Mientras se encontraban en los dos sitios de estudio, los cerdos se encontraban bajo cuidado veterinario. Todos los animales gozaba de buen estado de salud y nutricional antes de la vacunación, según se determina por observación el Día 0. Se observó que todos los animales de ensayo gozaba de buen estado de salud y nutricional antes del exposición. Las carcasas y los tejidos fueron desechados mediante vertido. La disposición final de los animales de estudio se registró en el Registro de Disposición de los Animales.

15 Los Días 0 y 14, los cerdos asignados a los Grupos 1-3 y 5-8 recibieron 2,0 mL de vacunas 1-4 de PCV2, respectivamente, IM en las zonas derecha e izquierda del cuello, respectivamente, utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x ½". Los cerdos asignados al Grupo 4 recibieron 1,0 mL de vacuna nº 2 de PCV2, IM en la zona derecha del cuello, utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x ½" el Día 0 solamente.

20 El Día 22 todos los cerdos de ensayo recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x 1". El Día 28 todos los cerdos de ensayo recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA IM en la zona del jamón derecho utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x 1".

25 El Día 25, los cerdos asignados a los Grupos 1-9, recibieron 1,0 mL de material de exposición ISUVDL de PCV2 (3,98 log₁₀ TCID₅₀/mL), IM en la zona derecha del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x 1". Se administró 1,0 mL adicional del mismo material, IN a cada cerdo (0,5 mL por fosa nasal) utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una cánula nasal.

El Día 46 todos los cerdos de ensayo recibieron 2,0 mL de INGELVAC® PRRS MLV, IM, en la zona derecha del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x 1". El PRRSV MLV fue administrado en un intento de aumentar la virulencia del material de exposición a PCV2.

30 Los cerdos de ensayo fueron observados diariamente en cuanto a la salud general y sucesos adversos el Día -3 y desde el Día 0 al Día 21. Cada uno de los cerdos fue puntuado en cuanto a comportamiento normal o anormal, respiración o tos. Las observaciones se registraron en el Registro de Observación Clínica. Todos los cerdos de ensayo fueron observados desde el Día 0 hasta el Día 7, y el Grupo 7 fue observado adicionalmente desde el Día 14 hasta el 21, en cuanto a las reacciones del sitio de inyección. La ganancia de peso media diaria se determinó pesando a cada cerdo sobre una escala calibrada los Días -3, 25 y 50, o el día en que se encontró muerto a un cerdo después del exposición. Los pesos corporales se registraron en el Formulario de Peso Corporal. Los pesos corporales del Día -3 se utilizaron para bloquear a los cerdos antes del reparto aleatorio. Los datos de peso del Día 25 y del Día 50 se utilizó para determinar la ganancia de peso media diaria (ADWG) para cada cerdo durante estos momentos. Para los cerdos que murieron después del exposición y antes del Día 50, la ADWG se ajustó para representar la ADWG desde el Día 25 hasta el día de su muerte.

35 Con el fin de determinar la serología de PCV2, sangre entera venosa se recogió de cada cochinito del seno venoso orbital los Días -3 y 14. Para cada cochinito, la sangre se tomó del seno venoso orbital insertando un tubo capilar estéril en el canto medial de uno de los ojos y drenando aproximadamente 3,0 mL de sangre entera en un Tubo Separador de Suero (SST - siglas en inglés) de 4,0 mL. Los Días 25, 32 y 50 se tomó sangre entera venosa de cada cerdo de la vena cava anterior utilizando una aguja estéril 20g x 1 ½" Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey), un soporte de aguja Vacutainer® y un SST de 13 mL. Las tomas de sangre en cada instante se registraron en el Registro de Toma de Muestras. Se dejó que se coagulara la sangre en cada SST, cada SST fue centrifugado y se recolectó el suero. El suero recolectado fue transferido a un tubo con tapón de cierre rápido estéril y se almacenó a -70± 10° C hasta que se sometió a ensayo con posterioridad. Las muestras de suero fueron sometidas a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos de PCV2 por parte del personal de BIVI-R&D.

Los cerdos fueron observados una vez al día desde el Día 22 al Día 50 en cuanto a síntomas clínicos y fueron puntuados en cuanto al comportamiento normal o anormal, la respiración o tos. Las observaciones clínicas se registraron en el Registro de Observación Clínica.

55 Los cerdos nºs 46 (Grupo 1) y 98 (Grupos 9) murieron en el primer sitio de estudio. Estas dos muertes fueron catalogadas como muertes por hemorragia y no se realizaron necropsias en estos dos cerdos. En el segundo sitio de estudio, se realizó una necropsia a los cerdos que morían después del exposición y antes del Día 50, y a los cerdos sometidos a eutanasia el Día 50. Se anotaron cualesquiera lesiones macroscópicas y los porcentajes de lóbulos pulmonares con lesiones se registraron en el Formulario de Informe de la Necropsia.

De cada uno de los cerdos a los que se realizó una necropsia en el segundo sitio de estudio, una muestra de tejido de las tonsilas, pulmones, corazón, hígado, nódulo linfático mesentérico se dispuso en un solo recipiente con formalina al 10% tamponada; mientras que otra muestra de tejido procedente de los mismos órganos antes mencionados se dispuso en un Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino Unido) y cada Whirl-pak® se dispuso en hielo. Cada recipiente se etiquetó apropiadamente. Las recogidas de muestras se registraron en el Formulario de Informe de la Necropsia. Después de ello, muestras de tejido fijado con formalina y el Formulario de Petición de Diagnóstico se suministraron para el ensayo de IHC. El ensayo de IHC se efectuó de acuerdo con procesos de laboratorio estándares para muestras de recepción, preparación de muestras y portaobjetos y técnicas de tinción. Tejidos recientes en Whirl-paks® fueron transportados con paquetes de hielo al Monitor del Estudio para el almacenamiento (-70° ± 10° C) y posible uso futuro.

Los tejidos fijados con formalina fueron examinados por un patólogo en cuanto a la detección de PCV2 mediante IHC y se evaluaron utilizando el siguiente sistema de anotación: 0 = ninguno; 1 = tinción escasa positiva, pocos sitios; 2 = tinción moderada positiva, múltiples sitios; y 3 = abundante tinción positiva, difusa por todo el tejido. Para fines analíticos, una puntuación de 0 se consideró "negativa," y una puntuación mayor que 0 se consideró "positiva."

15 **Resultados**

Se dan seguidamente los resultados para este ejemplo. Se anota que los Cerdos nº 46 y 98 murieron los días 14 y 25, respectivamente. Estas muertes fueron catalogadas como muertes por hemorragia. El Cerdo nº 11 (Grupo 1) resollaba con rápida respiración el Día 15. Por lo demás, todos los cerdos eran normales en cuanto al comportamiento, la respiración y la tos durante este periodo de observación y no se señalaron sucesos adversos sistémicos con ninguno de los grupos. No se señalaron reacciones en el sitio de inyección después de la vacunación el Día 0. Después de la vacunación el Día 14, siete (7) de catorce (14) cerdos del Grupo 1 (50,0%) tenía una hinchazón con una puntuación de "2" el Día 15. Cuatro (4) de catorce (14) cerdos del Grupo 1 (28,6%) seguía teniendo una hinchazón de "2" el Día 16. Ninguno de estos otros grupos experimentó reacciones en el sitio de inyección después de cualquier vacunación.

Los resultados de la ganancia de peso media diaria (ADWG) se presentan a continuación en la Tabla 18. De los resultados del grupo se excluyó a los Cerdos nºs 46 y 98 que murieron de hemorragia. El Grupo 4, que recibía una dosis de 16 µg de vORF2 – Carbopol, tenía la ADWG más alta (0,52 ± 0,12 kg/día), seguido de los Grupos 1, 2, 3, 5, 6 y 10 que tenían ADWGs que oscilaban entre 0,48 ± 0,10 kg/día a 0,50 ± 0,12 kg/día. El Grupo 9 tenía la ADWG más baja (0,40 ± 0,13 kg/día), seguido de los Grupos 8 y 7, que tenían ADWGs de 0,42 ± 0,14 kg/día y 0,41 ± 0,19 kg/día, respectivamente.

Tabla 18. Sumario de las Ganancias de Peso Medias Diarias (ADWG) de cada grupo

Grupo	Tratamiento	N	ADWG kg/día (Día 25 a Día 50) o ajustada para cerdos muertos antes del Día 50
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	0,48 ± 0,14 kg/día
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,50 ± 0,07 kg/día
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,48 ± 0,09 kg/día
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	0,52 ± 0,12 kg/día
5	rORF2 – 4 µg – Carbopol 1 dosis	15	0,48 ± 0,12 kg/día
6	rORF2 – 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,50 ± 0,12 kg/día
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,45 ± 0,20 kg/día
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	0,42 ± 0,15 kg/día
9	Controles de exposición	14	0,36 ± 0,13 kg/día
10	Controles Estrictos Negativos	15	0,48 ± 0,10 kg/día

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

Los resultados de la serología de PCV2 se presentan a continuación en la Tabla 19. Todos los diez (10) grupos eran seronegativos para PCV2 el Día -3. El Día 14, los títulos de PCV2 seguían bajos para los diez (10) grupos (intervalo de 50-113). El Día 25, el Grupo 8, que recibía la vacuna de virus matado de células completas tenía el título de PCV2 más alto (4617), seguido del Grupo 2, que recibía 16 µg de vORF2 – Carbopol, el Grupo 4, que recibía como dosis única 16 µg de vORF2 – Carbopol, y el Grupo 3, que recibía 16 µg de rORF2 – Carbopol, que tenían títulos de 2507, 1920 y 1503, respectivamente. El Día 32 (una semana post exposición), los títulos para los Grupos 1-6 y el Grupo 8 oscilaban entre 2360 y 7619; mientras que los Grupos 7 (0,25 µg de rORF2 – Carbopol), 9 (Control de exposición) y 10 (control estricto negativo) tenía títulos de 382, 129 y 78, respectivamente. El Día 50 (día de la

necropsia), los diez (10) grupos mostraron altos títulos de PCV2 (= 1257).

Los Días 25, 32 y 50, el Grupo 3, que recibía dos dosis de 16 µg de rORF2 – Carbopol tenía títulos de anticuerpos mayores que el Grupo 1, que recibía dos dosis de 16 µg de rORF2 – IMS 1314. Los Días 25, 32 y 50, Grupo 2, que recibía dos dosis de 16 µg de vORF2 tenía títulos mayores que el Grupo 4, que recibía solamente una dosis de la misma vacuna. Los Grupos 3, 5, 6, 7, que recibían niveles decrecientes de rORF2 – Carbopol, de 16, 4, 1 y 0,25 µg, respectivamente, mostraron títulos de anticuerpos correspondientemente decrecientes los Días 25 y 32.

Tabla 19. Sumario del Grupo de Títulos IFA de PCV2

Grupo	Tratamiento	Día -3	Día 14**	Día 25***	Día 32	Día 50****
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	50	64	646	3326	4314
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	50	61	1867	3933	4533
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	50	70	490	2360	5740
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	50	73	63	382	5819
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	50	97	4617	7619	10817
9	Controles de exposición	50	53	50	129	4288
10	Controles Estrictos Negativos	50	50	50	78	11205

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

*Para fines de cálculo, un título IFA ≤100 se designó como un título de "50"; un título IFA ≥ 6400 se designó como un título de "12.800".

**Día de exposición

***Día de la Necropsia

Los resultados de las observaciones clínicas post-exposición se presentan a continuación. La Tabla 20 incluye observaciones para el Comportamiento Anormal, Respiración Anormal, Tos y Diarrea. La Tabla 21 incluye los resultados del Sumario de Incidencia de los Síntomas Clínicos Globales del Grupo y la Tabla 22 incluye los resultados del Sumario de Tasas de Mortalidad del Grupo Post-exposición. La incidencia del comportamiento anormal, respiración anormal y tos post-exposición era baja en cerdos que recibían 16 µg de rORF2–IMS 1314 (Grupo 1), 16 µg de rORF2–Carbopol (Grupo 3), 1 µg de rORF2–Carbopol (Grupo 6), 0,25 µg de rORF2–Carbopol (Grupo 7), y en cerdos en el Grupo Control de exposición (Grupo 9). La incidencia del comportamiento anormal, respiración anormal y tos post-exposición era cero en cerdos que recibían 16 µg de vORF2–Carbopol (Grupo 2), una dosis única de 16 µg de vORF2–Carbopol (Grupo 4), 4 µg de rORF2–Carbopol (Grupo 5), >8 log de KV–Carbopol (Grupo 8), y en cerdos en el Grupo Control Estricto Negativo (Grupo 10).

La incidencia global de los síntomas clínicos varió entre grupos. Los cerdos que recibían de 16 µg de vORF2–Carbopol (Grupo 2), una dosis única de 16 µg de vORF2–Carbopol (Grupo 4), y los cerdos en el grupo control estricto negativo (Grupo 10) tenían tasas de incidencia de 0%; cerdos que recibían 16 µg de rORF2–Carbopol (Grupo 3), y 1 µg de rORF2–Carbopol (Grupo 6) tenían tasas de incidencia de 6,7%; cerdos que recibían 16 µg de rORF2–IMS 1314 (Grupo 1) tenían una tasa de incidencia global de 7,1%; cerdos que recibían 4 µg de rORF2–Carbopol (Grupo 5), 0,25 µg de rORF2–Carbopol (Grupo 7) y vacuna KV >8 log tenía tasas de incidencia de 13,3%; y cerdos en el Grupo Control de exposición (Grupo 9) tenía una tasa de incidencia de 14,3%.

También variaban las tasas de mortalidad global entre grupos. El grupo 8, que recibía 2 dosis de vacuna de KV tenía la tasa de mortalidad más alta de 20,0%; seguido del Grupo 9, el grupo control de exposición, y el Grupo 7, que recibía 0,25 µg de rORF2–Carbopol y tenía tasas de mortalidad de 14,3% y 13,3%, respectivamente. El Grupo 4, que recibía una dosis de 16 µg de vORF2–Carbopol tenía una tasa de mortalidad de 6,7%. Todos los otros Grupos 1, 2, 3, 5, 6 y 10 tenían una tasa de mortalidad del 0%.

Tabla 20. Sumario de Observaciones del Grupo para el Comportamiento Anormal, Respiración Anormal y Tos Post-Enfriamiento

Grupo	Tratamiento	N	Comportamiento Anormal ¹	Comportamiento Anormal ²	Tos ³
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7,1 %)
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	15	1/15 (6,7 %)	1/15 (6,7 %)	0/15 (0%)
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)	1/15 (0,67 %)
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	1/15 (6,7 %)	1/15 (6,7 %)	0/15 (0%)
9	Controles de exposición	14	1/14 (7,1 %)	1/14 (7,1 %)	2/14 (14/3%)
10	Controles Estrictos Negativos	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

¹Número total de cerdos en cada grupo que mostró algún comportamiento anormal durante al menos un día

²Número total de cerdos en cada grupo que mostró alguna respiración anormal durante al menos un día

5 ³Número total de cerdos en cada grupo que mostró tos durante al menos un día

Tabla 21. Sumario de la Incidencia Global del Grupo de Síntomas Clínicos Post-exposición

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con Síntomas Clínicos ¹	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	1	7,1 %
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	0	0,0 %
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	15	2	13,3 %
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	2	13,3 %
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	2	13,3 %
9	Controles de exposición	14	2	14,3 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	0	0,0 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

¹Número total de cerdos en cada grupo que mostró cualquier síntoma clínico durante al menos un día

10

Tabla 22. Sumario de las Tasas de Mortalidad del Grupo Post-exposición

Grupo	Tratamiento	N	Muertes Post-exposición	Tasa de Mortalidad
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	0	0,0 %
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	1	6,7 %
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	2	13,3 %
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
9	Controles de Exposición	14	2	14,3 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	0	0,0 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

El Sumario del Porcentaje Medio de Lesiones Pulmonares y la Diagnóstico Tentativa se da a continuación en la Tabla 23. El Grupo 9, el grupo control de exposición, tenía el porcentaje más alto de lesiones pulmonares con una media de $10,81 \pm 23,27\%$, seguido del Grupo 7, que recibía $0,25 \mu\text{g}$ de rORF2–Carbopol y tenía una media de $6,57 \pm 24,74\%$, el Grupo 5, que recibía $4 \mu\text{g}$ de rORF2–Carbopol y tenía una media de $2,88 \pm 8,88\%$, y el Grupo 8, que recibía la vacuna de KV y tenía una media de $2,01 \pm 4,98\%$. Los restantes seis (6) grupos tenían un porcentaje medio de lesiones pulmonares que oscilaba entre $0,11 \pm 0,38\%$ y $0,90 \pm 0,15\%$.

El diagnóstico tentativo de neumonía variaba entre los grupos. El Grupo 3, que recibía dos dosis de $16 \mu\text{g}$ de rORF2–Carbopol, tenía el diagnóstico tentativo de neumonía más bajo, con $13,3\%$. El Grupo 9, el grupo control de exposición, tenía al 50% del grupo diagnosticado tentativamente de neumonía, seguido del Grupo 10, el grupo control estricto negativo y el Grupo 2, que recibieron dos dosis de $16 \mu\text{g}$ de vORF2–Carbopol, con $46,7\%$ de 40% , respectivamente, diagnosticado tentativamente de neumonía.

Los Grupos 1, 2, 3, 5, 9 y 10 tenían el 0% del grupo diagnosticado tentativamente como infectado con PCV2; mientras que el Grupo 8, que recibía dos dosis de vacuna KV, tenía la más alta tasa en el grupo del diagnóstico tentativo de infección por PCV2, con el 20%. El Grupo 7, que recibía dos dosis de $0,25 \mu\text{g}$ de rORF2–Carbopol, y el Grupo 4, que recibía una dosis de $16 \mu\text{g}$ de vORF2–Carbopol tenían diagnósticos de grupo tentativos de infección por PCV2 en el $13,3\%$ y $6,7\%$ de cada grupo, respectivamente.

Úlceras gástricas fueron sólo diagnosticadas en un cerdo en el Grupo 7 ($6,7\%$); mientras que los otros 9 grupos permanecieron exentos de úlceras gástricas.

Tabla 23. Sumario del % Medio de Lesiones Pulmonares y Diagnóstico Tentativo en el Grupo

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que secretó durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - $16 \mu\text{g}$ – IMS 1314 2 dosis	15	0	0 %
2	vORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
3	rORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
4	vORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 1 dosis	15	2	13,3 %
5	rORF2 - $4 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
6	rORF2 - $1 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	6	40,0 %
7	rORF2 – $0,25 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	7	46,7 %
8	KV > $8,0 \log$ – Carbopol 2 dosis	15	12	80 %
9	Controles de Exposición	14	14	100,0 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	14	93,3 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

El Sumario de los Resultados de la Incidencia IHC Positiva en el Grupo se muestran a continuación en la Tabla 24. El Grupo 1 ($16 \mu\text{g}$ de rORF2 – IMS 1314) tenía la tasa de grupo más baja de resultados IHC positivos con 0% de los cerdos positivos para PCV2, seguido del Grupo 2 ($16 \mu\text{g}$ de vORF2 – Carbopol) y del Grupo 4 (dosis única de $16 \mu\text{g}$ de vORF2 – Carbopol), que tenía tasas IHC del grupo de $6,7\%$ y $13,3\%$, respectivamente. El Grupo 9, el grupo control de exposición, tenía la tasa de incidencia IHC positiva más alta con un 100% de los cerdos positivos para PCV2, seguido del Grupo 10, el grupo control estricto negativo, y el Grupo 8 (vacuna de KV), con $93,3\%$ y 80% de los cerdos positivos para PCV2, respectivamente.

Tabla 24. Sumario de la Tasa de Incidencia IHC Positiva en el Grupo

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que secretó durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - $16 \mu\text{g}$ – IMS 1314 2 dosis	15	0	0 %
2	vORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
3	rORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
4	vORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 1 dosis	15	2	13,3 %
5	rORF2 - $4 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
6	rORF2 - $1 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	6	40,0 %
7	rORF2 – $0,25 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	7	46,7 %

8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	12	80 %
9	Controles de Exposición	14	14	100,0 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	14	93,3 %

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o virus muertos de células completas = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado

Discusión

5 En este ejemplo se evaluaron siete vacunas contra PCV2, que incluían una alta dosis (16 µg) de antígeno rORF2
 10 adyuvado con IMS 1314 administrado dos veces, una alta dosis (16 µg) de antígeno vORF2 adyuvado con Carbopol
 15 administrado una vez a un grupo de cerdos y dos veces a un segundo grupo de cerdos, una alta dosis (16 µg) de
 20 antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol administrado dos veces, una dosis de 4 µg de antígeno rORF2 adyuvado
 con Carbopol administrado dos veces, una dosis de 1 µg de antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol administrado
 dos veces, una baja dosis (0,25 µg) de antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol administrado dos veces, y una alta
 dosis (> 8 log) de vacuna contra PCV2 de células enteras muertas, adyuvada con Carbopol. En general, el Grupo 1,
 que recibía dos dosis de 16 µg de rORF2 – IMS 1314, se comportaba ligeramente mejor que los Grupos 2 a 7, que
 recibían vacunas que contenían diversos niveles de antígeno vORF2 o rORF2 adyuvado con Carbopol y mucho
 mejor que el Grupo 8, que recibía dos dosis de vacuna contra PCV2 de células enteras muertas. El Grupo 1 tenía la
 tercera ADWG más alta ($0,81 \pm 0,14$ kg/día), la incidencia más baja de comportamiento anormal (0%), la incidencia
 más baja de respiración anormal (0%), una incidencia baja de tos (7,1%), una baja incidencia de síntomas clínicos
 globales (7,1%), estaba empatado con otros tres grupos en cuanto a la más baja tasa de mortalidad (0%), la
 segunda tasa más baja del % medio de lesiones pulmonares ($0,15 \pm 0,34$ %), la segunda tasa más baja de neumonía
 (21,4%) y la tasa de incidencia más baja para tejidos IHC positivos (0%). Sin embargo, el Grupo 1 era el único grupo
 en donde se observaban reacciones en el sitio de inyección, que incluía el 50% de los vacunados 1 día después de
 la segunda vacunación. Las otras vacunas administradas a los Grupos 2 a 7 se comportaban mejor que la vacuna
 muerta y casi tan bien como la vacuna administrada al Grupo 1.

25 El Grupo 8, que recibía dos dosis de vacuna contra PCV2 muerta, adyuvada con Carbopol, tenía el peor conjunto de
 30 resultados para cualquier grupo de vacuna. El Grupo 8 tenía la ADWG más baja ($0,42 \pm 0,15$ kg/día), la segunda
 tasa más alta de comportamiento anormal (6,7%), la tasa más alta de respiración anormal (6,7%), estaba empatada
 con otros tres grupos en cuanto a la tasa de incidencia global más alta de síntomas clínicos (13,3%), tenía la más
 alta tasa de mortalidad de todos los grupos (20%), y tenía la tasa IHC positiva más alta (80%) de cualquier grupo de
 vacuna. Había preocupación que la vacuna contra PCV2 de células enteras muertas pudiera no haber sido
 totalmente inactivada antes de la administración al Grupo 8, que puede explicar los pobres resultados de este grupo.
 Desgraciadamente, los datos definitivos no estaban disponibles para confirmar esta preocupación. En general, en el
 contexto de este ejemplo, una vacuna KV Convencional Muerta no ayudaba a reducir la enfermedad asociada a PCV2.

35 Como se ha mencionado previamente, ningún suceso adverso estaba asociado con las vacunas de ensayo, con la
 excepción de la vacuna adyuvada con IMS 1314. Reacciones en el sitio de inyección se notaron en el 50,0% de los
 40 cerdos 1 día después de la segunda vacunación con la vacuna formulada con IMS 1314 y en el 28,6% de los cerdos
 2 días después de la segunda vacunación. No se notaron reacciones en ningún cerdo que recibían vacunas
 adyuvadas con Carbopol. Debería continuarse con cualquier estudio adicional que incluía cerdos vacunados con
 vacunas adyuvadas con IMS 1314 para vigilar estrechamente a cerdos en cuanto a las reacciones en el sitio de
 inyección.

45 Todos los cerdos eran sero-negativos para PCV2 el Día -3 y sólo el Grupo 2 tenía un título superior a 100 el Día 14.
 El Día 25 (día de la exposición), el Grupo 8 tenía el título de anticuerpos contra PCV2 más alto (4619), seguido del
 50 Grupo 2 (2507). Con la excepción de los Grupos 7, 9 y 10, todos los grupos mostraron una fuerte respuesta a los
 anticuerpos hacia el Día 32. Hacia el Día 50, todos los grupos, incluidos los Grupos 7, 9 y 10 mostraron una fuerte
 respuesta a los anticuerpos.

Una de las características distintivas de la infección por PCV2 en fase tardía y el subsiguiente desarrollo de PMWS
 es el retardo en el crecimiento de cerdos destetados, y en casos graves, se observa una pérdida de peso. La
 45 ganancia de peso media diaria de los grupos es un método cuantitativo de demostrar el retardo de crecimiento o la
 pérdida de peso. En este ejemplo no había una gran diferencia en la ADWG entre grupos. El Grupo 8 tenía la más
 baja ADWG de $0,40 \pm 0,12$ kg/día, mientras que el Grupo 4 tenía la más alta ADWG $0,53 \pm 0,11$ kg/día. Dentro del
 contexto de este estudio no había una diferencia suficiente entre grupos para basar la futura eficacia de la vacuna
 sobre la ADWG.

50 Además de la pérdida de peso – disnea, letargia, palidez de la piel y, a veces, ictericia son síntomas clínicos
 asociados con PMWS. En este ejemplo, para cada grupo se observaron, de manera no frecuente, un
 comportamiento anormal y una respiración anormal y tos. Como se evidencia en este estudio, este modelo de
 exposición y cepa de exposición no dan como resultado síntomas clínicos abrumadores, y este no es un parámetro
 fuerte en donde basar la eficacia de la vacuna.

55 En general, las tasas de mortalidad no eran tan altas en este ejemplo y la ausencia de una alta tasa de mortalidad

en el grupo control de exposición limita este parámetro en donde basar la eficacia de la vacuna. Antes del Día 46, en cada uno de los Grupos 4 y 7 moría uno de quince cerdos, en el Grupo 9 morían dos de catorce cerdos y en el Grupo 8 morían tres de quince cerdos. Debido al hecho de que el Grupo 9, el grupo control de exposición, no mostraba síntomas clínicos de PCV2 y solamente se habían producido dos muertes en este grupo hacia el Día 46, se administró a todos los cerdos la vacuna MLV del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (PRRSV) MLV el Día 46. Estudios anteriores habían utilizado INGELVAC® PRRS MLV como un inmunoestimulante para exasperar la enfermedad PMWS asociada a PCV2 y las tasas de mortalidad eran más altas en estos estudios anteriores. Se producían dos muertes poco después de administrar la vacuna PRRS el Día 46 – el Grupo 4 tenía una muerte el Día 46 y el Grupo 7 tenía una muerte el Día 47 – que probablemente no estaban asociadas con la administración de la vacuna PRRS. Hacia el Día 50, el Grupo 8, que recibía dos dosis de vacuna muerta, tenía la más alta tasa de mortalidad (20%), seguido del Grupo 9 (control de exposición) y el Grupo 7 (0,25 µg de rORF2 – Carbopol), con tasas de mortalidad de 14,3% y 13,3%, respectivamente. En general, la administración tardía de la vacuna PRRS al modelo de exposición en la fase de observación post-exposición de este ejemplo no aumentaba significativamente las tasas de mortalidad.

Lesiones macroscópicas en cerdos con PMWS secundaria a la infección por PCV2 consistía típicamente en linfadenopatía generalizada en combinación con uno o más de lo siguiente: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis. En la necropsia (Día 50), no se observó en ninguno de los grupos ictericia, hepatitis ni nefritis. Una úlcera gástrica fue observada en un cerdo del Grupo 7, pero no se examinó específicamente una linfadenopatía. En base a la presencia de lesiones que eran consistentes con una infección por PCV2, tres grupos tenían al menos un cerdo diagnosticado tentativamente con PCV2 (PMWS). El Grupo 8, que recibía dos dosis de vacuna muerta, tenía un 20% diagnosticado tentativamente con PCV2, mientras que el Grupo 7 y el Grupo 4 tenían 13,3% y 6,7%, respectivamente, diagnosticado tentativamente con PCV2. El % medio de puntuaciones de lesiones pulmonares variaba entre grupos en la necropsia. Los Grupos 1, 2, 3, 4, 6 y 10 tenían un bajo % de puntuación de lesiones pulmonares que oscilaba entre $0,11 \pm 0,38\%$ y $0,90 \pm 0,15\%$. Como era de esperar, el Grupo 9, el grupo control de exposición tenía el % medio más alto de puntuaciones de lesiones pulmonares ($10,81 \pm 23,27\%$). En los cuatro grupos, el % medio de puntuaciones de lesiones pulmonares se elevó debido a uno hasta tres cerdos en cada uno de estos grupos que tenían puntuaciones muy altas de lesiones pulmonares. Las lesiones pulmonares eran rojas/púrpura y estaban consolidadas. Típicamente, las lesiones pulmonares asociadas con PMWS se describen como de color canela y no colapsables con edema interlobular. Las lesiones pulmonares observadas en este estudio no se asociaron con una infección por PCV2 o puede estar presente un segundo agente infeccioso pulmonar. Dentro del contexto de este estudio, el % de puntuación de lesiones pulmonares no reflejan, probablemente, una medida verdadera de la cantidad de infección pulmonar debida a PCV2. De igual manera, también se puede haber sobreutilizado un diagnóstico tentativo de neumonía. Cualquier cerdo con lesiones pulmonares, algunas tan pequeñas como del 0,10%, fueron listados con un diagnóstico tentativo de neumonía. En este ejemplo no había diferencia suficiente entre grupos con respecto a lesiones macroscópicas y el % de lesiones pulmonares en donde basar la eficacia de la vacuna.

Los resultados de IHC mostraron las mayores diferencias entre grupos. El Grupo 1 (16 µg de rORF2 – IMS 1314) tenía los resultados IHC positivos más bajos para el antígeno de PCV2 (0%); mientras que los Grupos 9 y 10 tenían los resultados IHC positivos más altos con tasas de incidencia de 100% y 93,3%, respectivamente. Los Grupos 3, 5, 6 y 7, que recibían 16, 4, 1 ó 0,25 µg de antígeno rORF2, respectivamente, adyuvados con Carbopol, tenían tasas IHC positivas de 20%, 20%, 40% y 46,7%, respectivamente. El Grupo 2, que recibía dos dosis de 16 µg de vORF2 adyuvado con Carbopol tenía una tasa IHC positiva de 6,7%, mientras que el Grupo 4, que recibía solamente una dosis de la misma vacuna, tenía una tasa IHC positiva de 13,3%. Debido a la naturaleza objetiva de este ensayo y al hecho de que los resultados de IHC se correlacionaban con los resultados esperados, el ensayo de IHC es probablemente uno de los mejores parámetros en los que basar la eficacia de la vacuna.

Así, en un aspecto de la presente invención, se determina la Dosificación Protectora Mínima (MPD) de un antígeno de ORF2 de PCV2 adyuvado con Carbopol en el modelo de cerdos CDCD en la cara de un exposición de PCV2. Cada uno de los Grupos 3, 5, 6 y 7 recibía dos dosis de antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol, pero el nivel de antígeno rORF2 variaba para cada grupo. Cada uno de los Grupos 3, 5, 6 y 7 recibía 16, 4, 1 ó 0,25 µg de antígeno rORF2, respectivamente. En general, la disminución del nivel de antígeno rORF2 redujo los títulos de anticuerpos de PCV2, y aumentó la tasa de mortalidad, el % medio de lesiones pulmonares y la incidencia de tejidos IHC positivos. De los cuatro grupos que recibían niveles variables de rORF2 – Carbopol, los Grupos 3 y 5, que recibían dos dosis de 16 ó 4 µg de antígeno rORF2, respectivamente, cada uno tenía una tasa IHC positiva de solamente 20%, y cada uno tenía similares títulos de anticuerpos. En general, en base a los resultados IHC positivos, la dosificación protectora mínima de antígeno rORF2 administrada dos veces es de aproximadamente 4 µg.

En otro aspecto de la presente invención, se evaluó la antigenicidad de antígenos de PCV2 recombinante (rORF2) y VIDO R-1 (vORF2). El Grupo 2 recibía dos dosis de 16 µg de vORF2 y el Grupo 3 recibía dos dosis de 16 µg de rORF2. Ambas vacunas estaban adyuvadas con Carbopol. Se encontró que las dos vacunas eran seguras y ambas tenían una tasa de mortalidad de 0%. El Grupo 2 tenía un título de anticuerpos de PCV2 de 2507 el Día 25, mientras que el Grupo 3 tenía un título de anticuerpos de PCV2 de 1503. El Grupo 3 tenía una menor puntuación del % medio de lesiones pulmonares que el Grupo 2 ($0,11 \pm 0,38\%$ frente a $0,90 \pm 0,15\%$), pero el Grupo 2 tenía una menor tasa de incidencia IHC positiva que el Grupo 3 (6,7% frente a 20%). En general, las dos vacunas tenían una antigenicidad

similar, pero vORF2 estaba asociada con resultados IHC ligeramente mejores.

5 Aún en otro aspecto de la presente invención, se determinó la idoneidad de dos coadyuvantes diferentes (Carbopol e IMS 1314). Los dos Grupos 1 y 3 recibían dos dosis de vacuna que contenía 16 µg de antígeno rORF2, pero el Grupo 1 recibía el antígeno adyuvado con IMS 1314, mientras que el Grupo 3 recibía el antígeno adyuvado con Carbopol. Los dos grupos tenían esencialmente la misma ADWG, esencialmente la misma incidencia de síntomas clínicos post-exposición, la misma tasa de mortalidad, y esencialmente el mismo % medio de lesiones pulmonares; pero el Grupo 1 tenía una tasa IHC positiva de 0%, mientras que el Grupo 3 tenía una tasa IHC positiva de 20%. Sin embargo, el Grupo 3, que recibía la vacuna adyuvada con Carbopol, tenía mayores títulos de IFAT PCV2 los Días 25, 32 y 50 que el Grupo 1, que recibía la vacuna adyuvada con IMS 1314. En general, a pesar de que la vacuna contra PCV2 adyuvada con IMS 1314 proporcionaba mejores resultados IHC, no proporcionaba una protección abrumadoramente mejor frente a una infección por PCV2 ni inducía una reacción del sitio de inyección. Mientras que la vacuna contra PCV2 adyuvada con Carbopol se comportaba casi tan bien como la vacuna adyuvada con IMS 1314, pero no estaba asociada a ningún suceso adverso.

15 Aún en otro aspecto de la presente invención, se determinó la idoneidad de ORF2 de PCV2 como 1 ml, 1 dosis de producto. Los Grupos 2 y 4 recibían ambos 16 µg de vacuna vORF2 adyuvada con Carbopol el Día 0, pero el Grupo 2 recibía una segunda dosis el Día 14. El Grupo 4 tenía una ADWG ligeramente más alta y un menor % medio de lesiones pulmonares que el Grupo 2, pero el Grupo 2 tenía títulos IFAT PCV2 más altos los Días 25, 32 y 50, y una tasa de incidencia ligeramente menor de tejidos IHC positivos. Todos los otros resultados para estos dos grupos eran similares. En general, una dosis de vORF2 adyuvado con Carbopol se comportaba de manera similar a dos dosis de la misma vacuna.

Lista de secuencias

- 25 <110> Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.
Roof, Mike
Eichmeyer, Mark
Nitzel, Greg
Schaeffer, Merrill
Hayes, Phillip
- 30 <120> COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE PCV2 MULTIVALENTES Y MÉTODOS PARA PRODUCIR DICHAS COMPOSICIONES
- <130> 36895-PCT
- 35 <160> 11
- <170> PatentIn version 3.3
- 40 <210> 1
<211> 8
<212> ADN
<213> Artificial
- 45 <220>
<223> Esta es una secuencia de kozak modificada
- <400> 1
ccgccatg 8
- 50 <210> 2
<211> 6
<212> ADN
<213> Artificial
- 55 <220>
<223> Esta es una secuencia Eco RI recombinante.
- <400> 2
gaattc 6
- 60 <210> 3
<211> 713
<212> ADN

ES 2 814 473 T3

<213> Circovirus porcino

<400> 3

cagctatgac gtatccaagg aggcggtacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc cggccaccgc taccgttggg 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccggcc tctccgcac cttcggatat actgtggaga 180
 aggaaaaatg gcatcttcaa caccggcctc tcccgacact tcggatatac tgtgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaataa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttaa accctaatg aat 713

5

<210> 4

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 4

ccgccatgac gtatccaagg aggcggtacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc cggccaccgc taccgttggg 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccggcc tctccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
 ctaccacagt cacaacgccc tcttggcggg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaataa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttga accctaatg ttc 713

15

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 5

20

ES 2 814 473 T3

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

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

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

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

- <210> 6
- 5 <211> 233
- <212> PRT
- <213> Circovirus porcino
- <400> 6

ES 2 814 473 T3

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

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

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

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
 225 230

5 <210> 7
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Esta secuencia es de Circovirus porcino tipo 2, marco de lectura abierto 2, junto con una porción del vector pGEM T-easy.

<400> 7
 gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcggtaccg cagaagaaga 60
 caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgccgcc gccctggct cgtccacccc 120

ES 2 814 473 T3

cgccaccgct accgttggag aaggaaaaat ggcattttca acacccgcct ctcccgcacc 180
 ttcggatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgccct cctgggcggt ggacatgatg 240
 agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc 300
 tttgaatact acagaataag aaaggtaag gttgaattct ggccctgctc ccccatcacc 360
 cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag 420
 gccacagccc taacctatga cccatatgta aactactcct ccgcccatac aatcccccaa 480
 cccttctcct accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat 540
 tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggtgga ggctacaaac ctctagaaat 600
 gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat 660
 atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagacc cccacttgaa 720
 ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggccgc 756

<210> 8
 <211> 10387
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Esto es el Circovirus porcino tipo 2, construcción ORF2, que incluye baculovirus y pGEM T-easy secuencias codificantes.

10

<400> 8
 aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgtttatg agataagatt 60
 gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt 120
 ataaaagatt ctaatctgat atgttttaa acacctttgc ggcccgagtt gtttgcgtac 180
 gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt 240
 ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca ttttttgagg 300
 gcgggacctg tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata 360
 gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccgg catgttggtg 420
 ggcgtgcaact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgag atatttaatg 480
 cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac 540
 aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc 600
 tttacaacaa actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaacta 660
 tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttccaa tcgacggtag 720
 gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttacgt ttatgctttt 780
 ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaa cgtagtgccg tcgcgcgctca 840
 cgcacaacac cggatgtttg cgcttgcctc cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat 900

ES 2 814 473 T3

ccaccacttt ggcaactaaa toggtagacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttctgttt 960
 tcttttgcac ggtttcctgg aagccgggtg acatgcgggt tagatcagtc atgacgcgcg 1020
 tgacctgcaa atctttggcc togatctgct tgtccttgat ggcaacgatg cgttcaataa 1080
 actcttgttt tttacaagt tcctcggttt tttgcgccac caccgcttgc agcgcgtttg 1140
 tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctcccgtt 1200
 gtttgatcgc gggatcgtac ttgccgggtg agagcacttg aggaattact tcttctaaaa 1260
 gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc 1320
 cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaatacagc cgggtcgcgc cttttcacga 1380
 cgtcttaga ggtagggcc ccattttgga tggctctgct aaataacgat ttgtatttat 1440
 tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaaactg ttagcgacgt 1500
 ccttgccac gaaccggacc tgttgctgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat 1560
 cttctccaaa tttaaattct ccaattttaa cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat 1620
 tttgcaacaa ctattgtttt ttaacgcaa ctaaacttat tgtgtaagc aataattaaa 1680
 tatgggggaa catgcgcgcg tacaacactc gtcgttatga acgcagacgg cgcgggtctc 1740
 ggcgcaagcg gctaaaacgt gttgcgcgtt caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag 1800
 tacagttttg atttgcatat taacggcgat tttttaaatt atcttattta ataaatagtt 1860
 atgacgccta caactccccg cccgcgttga ctgcgtgcac ctgcgagcagt tcggtgacgc 1920
 cttcctccgt gtggccgaac acgtcgcgagc ggtggtcgat gaccagcggc gtgcgcgacg 1980
 cgcgcacaaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcca aggcacgtcg gcctccaagt 2040
 ggcaatattg gcaaatoga aaatatatac agttgggttg tttgcgcata tctatcgtgg 2100
 cgttgggcat gtacgtccga acggttattt gcatgcaagc cgaaattaaa tcattgcgat 2160
 tagtgcgatt aaaacgttgt acatcctcgc ttttaatcat gccgtcgatt aaatgcgcga 2220
 atcaggtcaa gtgatcaaag tgtggaataa tgttttcttt gtattcccga gtcaagcgca 2280
 gcgcgtattt taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc 2340
 aataatatat tatgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gcccgttgtc gcatctcaac 2400
 acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag cttgcgacgc aacgtgcacg 2460
 atctgtgcac gcgttcgggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca 2520
 tgacccccgt agtgacaacg atcacgcca aaagaactgc cgaactacaaa attaccgagt 2580
 atgtcgggtg cgttaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc 2640
 tgggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt 2700
 agagcgtcat gtttagacaa gaaagetaca tatttaattg atcccgatga ttttattgat 2760
 aaattgacct taactccata cacggtattc tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc 2820

ES 2 814 473 T3

ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccgcccacta ttaatgaaat taaaaattcc 2880
 aattttaaaa aacgcagcaa gagaaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa 2940
 aatgctgctc acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg 3000
 aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgctc ggcggtatgt acaggaagag gtttatacta 3060
 aactgttaca ttgcaaactg ggtttcgtgt gccaaagtgtg aaaaccgatg tttaatcaag 3120
 gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcatctttta 3180
 atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aatgaaaac tgctgacaag 3240
 ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata 3300
 aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa 3360
 catttgtagt attatctata attgaaaacg cgtagtata atcgcctgagg taatatttaa 3420
 aatcattttc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac 3480
 tagacgcctt gtgctcttct tcttcgtatt ccttctcttt ttcatttttc tctcataaa 3540
 aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt 3600
 tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtttttc 3660
 tgtaatttac aacagtgcta ttttctggta gttcttcgga gtgtgttgct ttaattatta 3720
 aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatggtg ccggcatagt 3780
 acgcagcttc ttctagttca attacaccat tttttagcag caccggatta acataacttt 3840
 ccaaaatggt gtaoaaaccg ttaaacaaaa acagttcacc tcccttttct atactattgt 3900
 ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaactaat 3960
 atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaat 4020
 gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa 4080
 aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcgg atcagatctg 4140
 cagcggccgc gggaattcga tccgccatga cgtatccaag gaggcgttac cgcagaagaa 4200
 gacaccgccc ccgcagccat cttggccaga tcctccgccc ccgcccctgg ctcgtccacc 4260
 cccgccaccg ctaccggttg agaaggaaaa atggcatctt caacaccgc ctctcccgca 4320
 ccttcgata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctctggggcg gtggacatga 4380
 tgagatttaa tattgacgac tttgttccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac 4440
 ctttgaata ctacagaata agaaaggtta aggttgaatt ctggcctgc tccccatca 4500
 cccaggggta taggggagtg ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa 4560
 aggccacagc cctaacctat gaccatattg taaactactc ctcccgcct acaatcccc 4620
 aacccttctc ctaccactcc cgttacttca caccxaaacc tgttcttgac tccactattg 4680

ES 2 814 473 T3

attacttcca accaaataac aaaaggaatc agctttggct gaggctacaa acctctagaa 4740
 atgtggacca cgtaggcctc ggcactgcgt tcgaaaacag taatacgcac caggactaca 4800
 atatcctgtg aaccatgtat gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccacttg 4860
 aaccetaaga attctatcac tagtgaatc gcggccgcgc gccgctccag aattctagaa 4920
 ggtaccggg atcctttcct gggaccgggc aagaaccaa aactcaactc cttcaaggaa 4980
 atccgtaatg ttaaaccoga cacgatgaag cttgtcgttg gatggaaag aaaagagtc 5040
 tacagggaaa cttggaccog cttcatggaa gacagcttcc ccattgttaa cgaccaagaa 5100
 gtgatggatg ttttccttgt tgtcaacatg cgtcccacta gaccaaccog ttgttacaaa 5160
 ttctggccc aacacgctct gcgttcgcac ccgactatg tacctcatga cgtgattagg 5220
 atcgtcgcgc cttcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcagcct ggctaagaag 5280
 ggcggcggct gcccaataat gaaccttcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagtc 5340
 atcgatcgtg tcatctggga gaacttctac aagcccatcg tttacatcgg taccgactct 5400
 gctgaagag aggaaattct ccttgaagtt tcctcgtgt tcaaagtaa ggagtttgca 5460
 ccagacgcac ctctgttcac tggccggcg tattaaaaca cgatacattg ttattagtac 5520
 attattaag cgctagattc tgtgcgttgt tgatttacag acaattgttg tacgtatfff 5580
 aataattcat taaatttata atctttaggg tggatgtta gagcgaaaat caaatgattt 5640
 tcagcgtcct tatactgaa tttaaatatt aaatcctcaa tagatttgta aaataggttt 5700
 cgattagttt caaacaaggg ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt 5760
 tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc 5820
 gtttgtgttt tgttttghaa taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta 5880
 tttctttcat cactgtcgtt agtgtaacat tgactcgcgc taaacacggt aaataaagct 5940
 tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattaggcc gattatcgtc gtcgtcccaa 6000
 ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta 6060
 attgtgtcgg ctaacacgtc cgcgatcaaa tttgtagtig agctttttgg aattatttct 6120
 gattgcgggc gtttttgggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac 6180
 acgtagaaa gcgatgggtc aggcggtggg aacatttcag acggcaaatc tactaatggc 6240
 ggcggtgggt gagctgatga taaatctacc atcggtgag gcgcaggcgg ggcggcggc 6300
 ggaggcggag gcggaggtgg tggcgggat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct 6360
 ttaggcaaca cagtcggcac ctcaactatt gtactggttt cgggcgcctg ttttggttg 6420
 accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag cttccaacaa ttgttctctg 6480
 tcgtetaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca 6540
 gacatcgtg gtggtgggtg tgggtggaggc gctggaatgt taggcacggg agaaggtggt 6600

ES 2 814 473 T3

ggcgccggtg ccgcccgtat aattgttct ggttagttt gttcgcgcac gattgtgggc 6660
 accggcgag gcgcccgtg ctgcacaacg gaaggctcgc tgcttcgagg cagcgcttgg 6720
 ggtggtggca attcaatatt ataattgga tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt 6780
 gtaatttcgc tatcgtttac cgtgcogata ttaacaacc gctcaatgta agcaattgta 6840
 ttgtaaagag attgtctcaa gctcgcgca cgcgataac aagcctttc attttacta 6900
 cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgacgta catgtatgct ttgttgtaa 6960
 aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt 7020
 tgcgtaaat gttgttttg ataatttgc cttccgagc atcgacacgt tcaaaaaatt 7080
 gatgcgcac aattttgtt ttctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc 7140
 tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgtgcacaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200
 actgcaaaaa cgtcaaaaact cggataaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta 7260
 ttttatcgca caagcccact agcaaatgt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt 7320
 ttaacgctga cgaaataaaa gttcaccagt taatgagcga ccacccaaat tttataaaaa 7380
 tctattttaa tcacggttcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc 7440
 ccgatttatt tgaaacacta caaattaaag gcgagctttc gtaccaactt gttagcaata 7500
 ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg 7560
 acataaaact cgaaaatgic ttatatttcg aagcacttga tcgctgtgat gtttgcgatt 7620
 acggattgtg caaacacgaa aactcactta gcgtgcacga cggcaogttg gagtatttta 7680
 gtcggaaaa aattcgacac acaactatgc acgtttcgtt tgactggtac gggcgctgtt 7740
 aacatacaag ttgctaacgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 7800
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 7860
 atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 7920
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 7980
 tgggcgctct tccgcttcc cgtcactga ctgcgtcgc tcggtcgttc ggctgcgcg 8040
 agcgtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8100
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 8160
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8220
 tcagaggagg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8280
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc 8340
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg 8400
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagacc gctgcgcctt 8460

ES 2 814 473 T3

atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8520
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8580
gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcy ctctgctgaa 8640
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 8700
tagcgggtgt ttttttggtt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 8760
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaaact cacgttaag 8820
gattttggct atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 8880
aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 8940
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 9000
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 9060
gataccgcga gaccacgct caccggtcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9120
aaggcccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9180
ttgccggaa gctagagtaa gtagttcgc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9240
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtc 9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catggttctg aaaaagcgg ttagctcctt 9360
cggctcctcg atcgttctca gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcaactca tggttatggc 9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccga ccgagttgct cttgccggc 9540
gtcaatacgg gataatacgg cggcacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 9600
acgttcttcg gggcgaaaac totcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9660
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggata agggcgacac ggaatgttg 9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt atgtctcat 9840
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 10020
ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttctctg taagcggatg ccgggagcag 10080
acaagcccgt caggcgcgct cagcgggtgt tggcgggtgt cgggctggc ttaactatgc 10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtga ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg 10200
cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga 10260
agggcgatcg gtgcgggct cttegetatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 10320
aaggcgatta agttgggtaa cggcagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc 10380
cagtgcc 10387

- <210> 9
- 5 <211> 20
- <212> PRT
- <213> Circovirus porcino
- <400> 9

ES 2 814 473 T3

Ser Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His His Pro Pro Ser
 1 5 10 15

His Leu Gly Gln
 20

<210> 10

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 10

Pro Arg His His Tyr Arg Pro Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr
 1 5 10 15

Thr Leu Ser

10

<210> 11

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Esto es una secuencia de aminoácidos para Circovirus porcino tipo 2, marco de lectura abierto 2.

<400> 11

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

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

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

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60

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

ES 2 814 473 T3

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna combinada multivalente para uso en un método para

- (i) la prevención de una infección por PCV2, o de reinfección por PCV2 o
- (ii) la reducción o eliminación de los síntomas clínicos causados por PCV2

5 en un sujeto, donde debe administrarse una dosis de la vacuna por vía intramuscular al sujeto y donde

- (i) dicha prevención de una infección por PCV2, o reinfección por PCV2 o
- (ii) dicha reducción o eliminación de los síntomas clínicos causados por PCV2, se obtiene mediante una única administración de la vacuna,

y donde la vacuna incluye

10 - una composición antigénica obtenible mediante un método que comprende:

- i) preparar y recuperar la proteína ORF2 de PCV2 recombinante, y
- ii) mezclarla con un coadyuvante adecuado

y

15 - al menos un componente activo inmunogénico contra otro organismo causante de enfermedades en el cerdo.

2. La vacuna combinada multivalente según la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 recombinante se puede obtener (i) permitiendo la infección de células susceptibles en cultivo con un vector viral de baculovirus recombinante que contiene secuencias de ADN que codifican la proteína ORF2 de PCV2, en donde la proteína ORF2 es expresada por el vector viral de baculovirus recombinante, y (ii) recuperando posteriormente dicha ORF2 en el sobrenadante.

3. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicha vacuna comprende un vector viral de baculovirus inactivado y sobrenadante de cultivo celular, donde dicho vector viral se inactiva opcionalmente mediante la adición de BEI, y en donde además opcionalmente BEI se neutraliza con tiosulfato de sodio.

25 4. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha vacuna comprende un coadyuvante.

5. La vacuna combinada multivalente de la reivindicación 4 para el uso de la reivindicación 4, en donde dicho coadyuvante se selecciona del grupo que consiste en polímeros acrílicos y polímeros de ácido metacrílico.

30 6. La vacuna combinada multivalente de la reivindicación 4 o 5 para el uso de la reivindicación 4 o 5, en donde dicho coadyuvante es un carbómero.

7. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha vacuna comprende de 500 µg a 5 mg de coadyuvante por dosis.

35 8. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha vacuna comprende de 4 µg a 400 µg de proteína ORF2 de PCV2 recombinante por dosis, o de 2 µg a 150 µg de proteína ORF2 de PCV2 recombinante por dosis.

9. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho componente activo inmunogénico eficaz contra otro organismo causante de enfermedad en cerdos se selecciona del grupo que consiste en un antígeno de: Actinobacillus pleuroneumonia; Adenovirus; Alfavirus tales como los virus de la encefalomiélitis equina del este; Bordetella bronchiseptica; Brachyspira spp., preferiblemente B. hyodysenteriae; B. piosicoli, Brucella suis, preferiblemente biovariedades 1, 2 y 3; Virus de la peste porcina clásica; Clostridium spp., preferiblemente Cl. difficile, Cl. perfringens tipos A, B y C, Cl. novyi, Cl. septicum, Cl. tetani; Coronavirus, preferiblemente coronavirus respiratorio porcino; Eperitrozoonosis porcina; Erysipelothrix rhusiopathiae; Escherichia coli; Haemophilus parasuis, preferiblemente subtipos 1, 7 y 14; Virus de la encefalomiélitis hemaglutinante; Virus de la encefalitis japonesa; Lawsonia intracellularis; Leptospira spp., preferiblemente Leptospira australis; Leptospira canicola; Leptospira grippotyphosa; Leptospira icterohaemorrhagicae; y Leptospira interrogans; Leptospira pomona; Leptospira tarassovi; Mycobacterium spp., preferiblemente M. avium, M. intracellulare y M. bovis; Mycoplasma hyopneumoniae (M hyo); Pasteurella multocida; Citomegalovirus porcino; Parvovirus porcino; Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS); Virus de la pseudorrabia; Rotavirus; Salmonella spp., preferiblemente S. thyphimurium y S. choleraesuis; Staph. hyicus; Staphylococcus spp., Streptococcus spp., preferiblemente Strep. suis; Virus del herpes porcino; Virus

de la gripe porcina; Virus de la viruela porcina; Virus de la viruela porcina; Virus de la estomatitis vesicular; y Virus del exantema vesicular del cerdo.

- 5 10. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a [9], en donde dicho componente activo inmunogénico adicional es un componente activo inmunológico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y un componente activo del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
11. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho componente activo inmunogénico adicional es un componente activo inmunológico del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.
- 10 12. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho componente activo inmunogénico adicional es un componente activo inmunológico de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
13. La vacuna combinada multivalente de la reivindicación 10 u 11 para el uso de la reivindicación 10 u 11 para la profilaxis de infecciones causadas por PCV2 y PRRSV.
- 15 14. La vacuna combinada multivalente de la reivindicación 10 o 12 para el uso de la reivindicación 10 o 12 para la profilaxis de infecciones causadas por PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*.
15. La vacuna combinada multivalente de la reivindicación 10 para el uso de de la reivindicación 10 para la profilaxis de infecciones causadas por PCV2, PRRSV y *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 20 16. La vacuna combinada multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el sujeto es un cerdo o un lechón.
17. Uso de una proteína ORF2 de PCV2 recombinante en la fabricación de una vacuna combinada para
- (i) la prevención de una infección por PCV2, o de reinfección por PCV2 o
 - (ii) la reducción o eliminación de los síntomas clínicos causados por PCV2
- en un sujeto por administración intramuscular de una dosis de dicha vacuna, donde
- 25 (i) dicha prevención de una infección por PCV2, o de reinfección por PCV2 o
- (ii) dicha reducción o eliminación de los síntomas clínicos provocados por PCV2, se obtiene mediante una única administración de la vacuna,
- incluyendo la vacuna
- una composición antigénica obtenible mediante un método que comprende:
- 30 (i) preparar y recuperar la proteína ORF2 de PCV2 recombinante, y
- (ii) mezclarla con un coadyuvante adecuado
- y
- al menos un componente activo inmunogénico contra otro organismo causante de enfermedad en el cerdo.

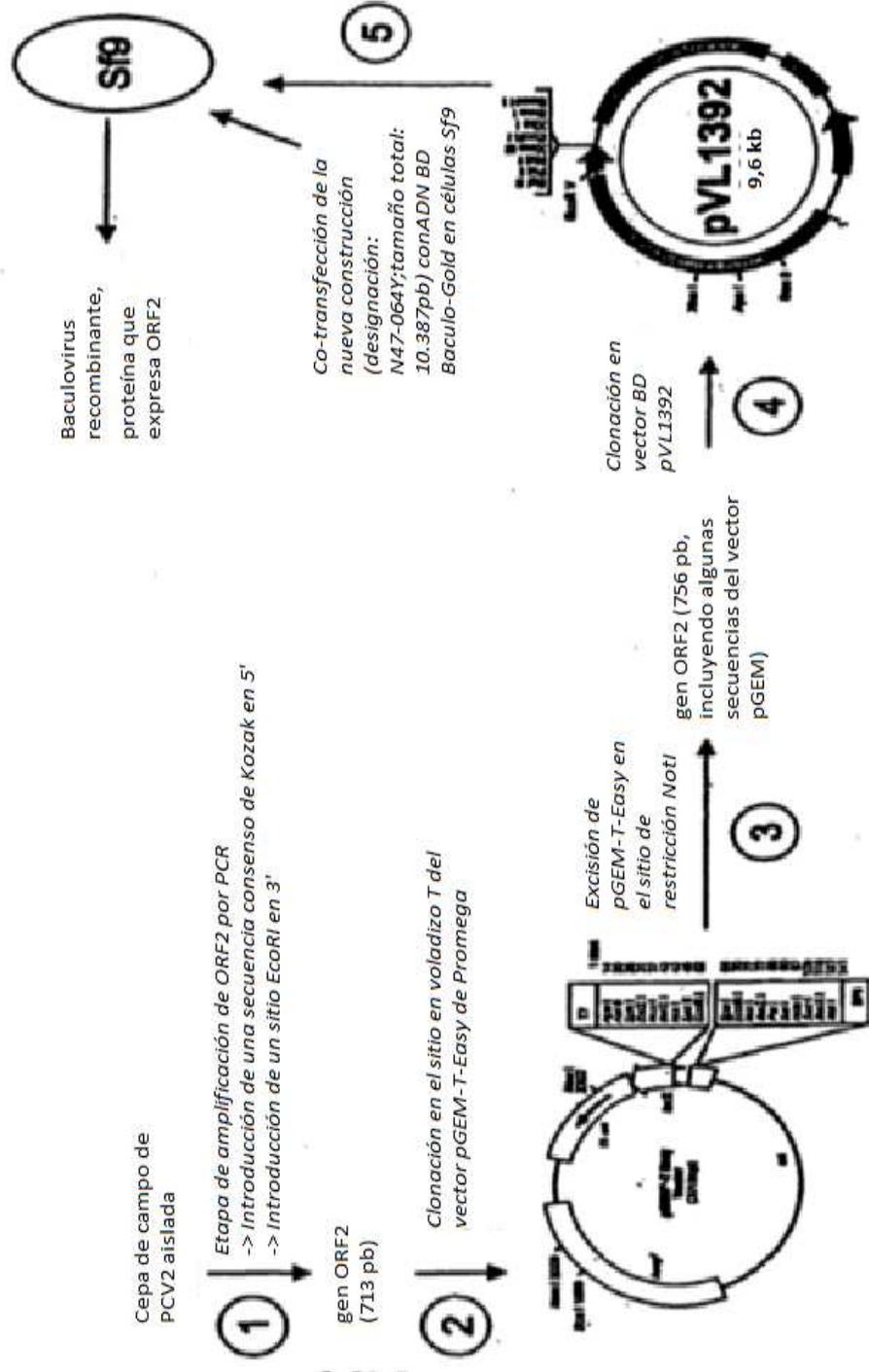


Fig. 1

Nota: Esta es la mejor copia disponible

Fig. 2(a)

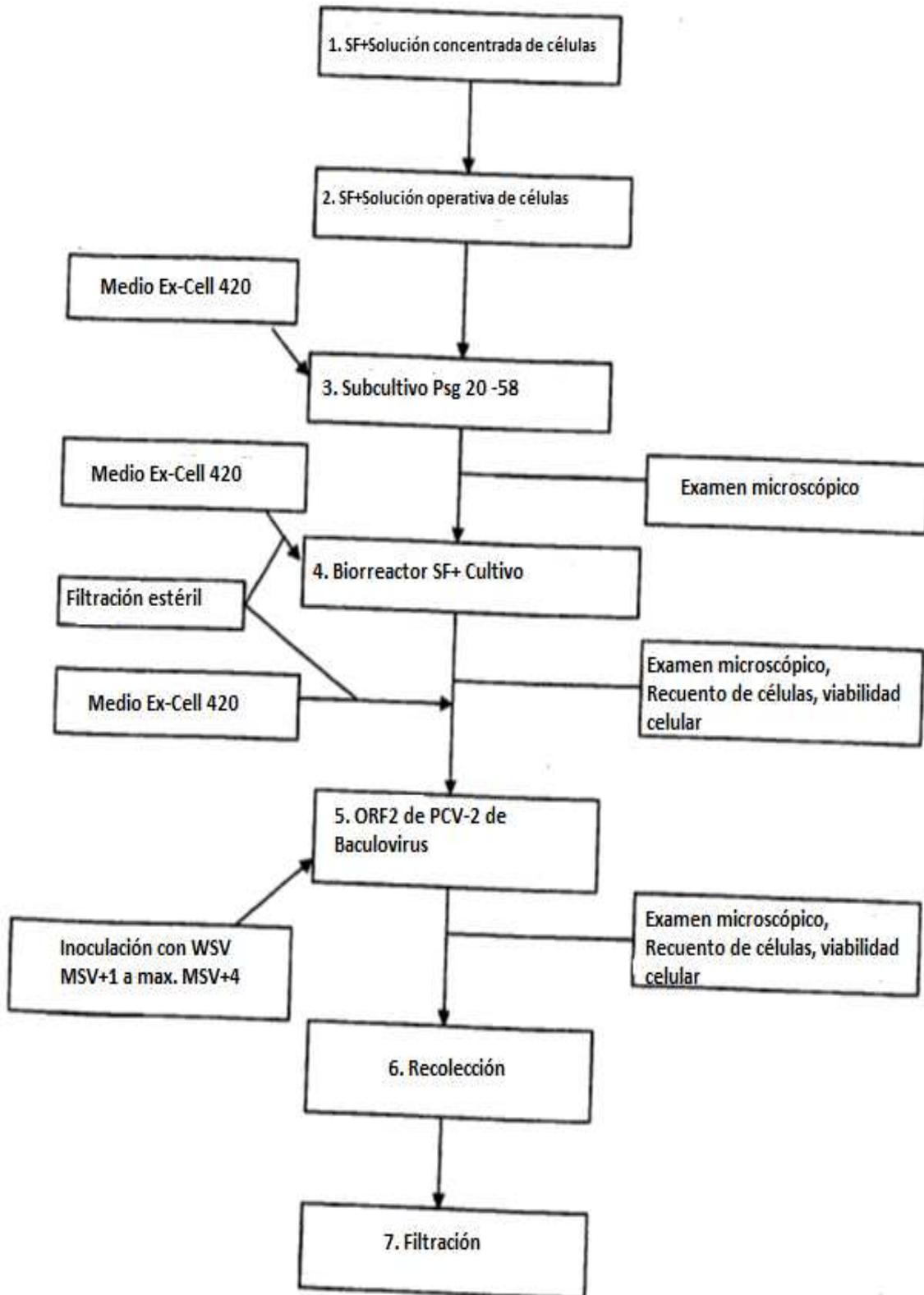


Fig 2(b)

