

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 229**

51 Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08803537 .3**
96 Fecha de presentación: **02.09.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2197486**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **Reducción de infecciones concomitantes en cerdos mediante el uso de antígeno PCV2**

30 Prioridad:
04.09.2007 EP 07115609

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2012

73 Titular/es:
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
(100.0%)
2621 NORTH BELT HIGHWAY
ST. JOSEPH, MO 64502, US

72 Inventor/es:
FACHINGER, VICKY;
ELBERS, KNUT y
KIXMOELLER, MARION

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 389 229 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

Reducción de infecciones concomitantes en cerdos mediante el uso de antígeno PCV2

5

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato papel y en formato legible por ordenador. El listado de secuencias es idéntico al incorporado en WO06/072065.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención:

La presente invención se refiere al campo de la medicina veterinaria, en particular al campo de las enfermedades infecciosas. Además, la presente invención se refiere a un método para reducir infecciones concomitantes en cerdos causadas por patógenos que no son PCV-2.

15

Antecedentes

20 En 1996 se describió una nueva enfermedad emergente denominada "Síndrome Multisistémico de Emaciación Posdestete" (PMWS, del inglés "Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome") en referencia a varios casos observados en Canadá cinco años antes (Clark T. Pathology of the Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome of Pigs. 1996 p. 22-5). Se identificó el circovirus tipo 2 (PCV2) como un agente causante esencial de dicho síndrome. Desde entonces el PMWS ha sido observado en virtualmente todas las regiones del mundo que producen cerdos (Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. J Virol Methods 2004 15 diciembre; 122 (2): 171-8). Los cerdos de 5 a 15 semanas de edad son los afectados más habitualmente (Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: Diagnosis, Disease and Control: What do we know? 2006 16 Julio-2006 19 Julio; 2006; Allan GM, y col., Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 165-8; Chae C. Vet J 2004 Julio; 168 (1): 41-9). Los síntomas clínicos incluyen un marcado aumento de la tasa de mortalidad, de emaciación, un crecimiento generalizado de linfonodos, síntomas respiratorios y, ocasionalmente, palidez, ictericia y diarrea (Chae C. Vet J 2005 Mayo; 169 (3): 326-36; Segales J. y col. Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 151-8). Estos síntomas clínicos no son observados todos al mismo tiempo en una misma piara de cerdos afectada por PMWS, pero parece que la expresión de síntomas clínicos está relacionada indirectamente a co-patógenos específicos de granja que atacan preferencialmente a diferentes sistemas de órganos (Krakowka S. y col., Vet Pathol 2001 Enero; 38 (1): 31-42). Investigaciones epidemiológicas han demostrado que el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV, del inglés "Porcine Reproductive and Respiratory Síndrome Virus"), el virus de gripe porcina (SIV, del inglés "Swine Influenza Virus"), el parvovirus porcino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Streptococcus suis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Chae C. Vet J 2004 Julio; 168 (1): 41-9) son observados muy habitualmente en combinación con el síndrome de la enfermedad.

25

30

35

40

45

50

Para la producción de PMWS se ha postulado la activación del sistema inmune como un evento fundamental (Krakowka S. y col., Vet Pathol 2001 Enero; 38 (1): 31-42). Aunque la inoculación experimental sólo con PCV2 únicamente produjo infecciones clínicamente asintomáticas y una evidencia histológica muy modesta de inflamación, la infección dual con PCV2 y PPV o PRRSV dio como resultado síntomas clínicos más severos, lesiones flagrantes e histológicas, una carga viral mayor de PCV2 y más dispersa en los tejidos afectados. Estos descubrimientos parecen estar provocados predominantemente por PCV2, ya que la infección con PRRSV o PPV por sí solos no produjo síntomas o lesiones clínicas comparables (Allan y col., J Comp Pathol 1999 Julio; 121 (1): 1-11; Allan GM, y col., Arch Virol 2000; 145 (11): 2421-9; Harms PA, y col., Vet Pathol 2001 Septiembre; 38 (5): 528-39; Krakowka S, y col., Vet Pathol 2000 Mayo; 37 (3): 254-63; Ostanello F, y col., Vet Microbiol 2005 1 Julio; 108 (3-4): 179-86; Rovira A, y col., J Virol 2002 Abril; 76 (7): 3232-9). Adicionalmente, también podría lograrse un aumento similar de la severidad de la enfermedad en ausencia de otros agentes co-infectantes si los cerdos fueran inmunoestimulados con hemocianina de lapa californiana en adyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA) (Krakowka S. y col., Vet Pathol 2001 Enero; 38 (1): 31-42).

55

60

65

Los efectos de PCV2 en el sistema inmune del cerdo no se conocen completamente. Se ha publicado que las principales células diana de la replicación de PCV2 es el linaje de monocitos/macrófagos, así como otras células que presentan antígenos tales como las células dendríticas foliculares (Darwich L, y col., Arch Virol 2004 Mayo; 149 (5): 857-74). Diversos estudios sugirieron que el PCV2 infecta células que se dividen, macrófagos y linfocitos B, induciendo la apoptosis de las células B, lo que produce daño en los tejidos linfoides y da como resultado un agotamiento extensivo de linfocitos (Darwich L, y col., Arch Virol 2004 Mayo; 149 (5): 857-74). En particular, los cerdos afectados de PMWS muestran infiltración histiocítica y agotamiento de linfocitos en centros de folículo y en zonas parafoliculares, síntomas asociados a la presencia de PCV2 (Segales J. y col. Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 151-8; Darwich L, y col., Arch Virol 2004 Mayo; 149 (5): 857-74). Estos hechos han llevado a algunos a sugerir que la infección de PCV2 podría causar inmunosupresión (Darwich L, y col., Arch Virol 2004 Mayo; 149 (5): 857-74; Krakowka S, y col., Viral Immunol 2002; 15 (4): 567-82).

Estrategias para tratar las infecciones de PCV2, en particular de PMWS, basadas en una vacuna de ADN se describen en la Patente de EEUU N° 6.703.023. En el documento WO 03/049703 se describe la producción de una vacuna quimérica viva, que comprende un esqueleto de PCV1 en el que un gen inmunogénico de una cepa patógena de PCV2 sustituye a un gen del esqueleto del PCV1. El documento WO99/18214 ha proporcionado varias cepas de PCV2 y procedimientos para la preparación de una vacuna muerta de PVC2. En el documento WO06/072065 se ha mostrado una vacuna de subunidades eficaz basada en la ORF-2. Cualquiera de dichas vacunas tiene el objetivo de ser usadas en la vacunación/tratamiento de cerdos contra PMWS.

El documento WO 2006/113372 A2 describe el uso médico de una vacuna de combinación que comprende al menos un antígeno de Helicobacter y al menos un antígeno de circovirus porcino y un vehículo o excipiente aceptable en veterinaria, para inducir una respuesta inmunológica contra una especie de Helicobacter y circovirus porcino.

No existen publicaciones acerca del impacto potencial de las infecciones del PCV2 sobre la incidencia de infecciones concomitantes provocadas por varios patógenos de cerdo relevantes. Particularmente, no hay nada publicado acerca del impacto potencial del PCV2 sobre patógenos específicos, tales como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida*, *PRRSV*, *Salmonella* spp., *SIV* o *Streptococcus suis*. Además, aunque se conozcan durante un breve tiempo diferentes vacunas de PCV2, su impacto en infecciones concomitantes diferentes a la de PCV2 en cerdos todavía se desconoce.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Perfil de viremia de PCV2. Se tomaron muestras de sangre de animales preseleccionados tratados con placebo (Figura 1A; n=110) y de animales vacunados (Figura 1B; n=110) a los tiempos indicados. En base a los resultados de PCR cuantitativos los animales se agruparon en clases de animales con cargas víricas subclínicas ($10^4 - 10^5$ gE/mL) y con cargas víricas clínicas relevantes ($> 10^5$ gE/mL). Las barras blancas representan la proporción de animales con cargas víricas subclínicas y las barras negras ilustran la proporción de animales con cargas víricas clínicas relevantes por día de muestreo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención está basada en el descubrimiento sorprendente de que la vacuna de PCV2 no solo no puede reducir el porcentaje de infecciones de PCV2 en cerdos o en piaras de cerdos, sino que tampoco puede reducir el porcentaje de infecciones concomitantes causadas por patógenos diferentes a circovirus, en particular diferentes a PCV2.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir las infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos diferentes al PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2.

La expresión "infecciones concomitantes" tal como se usa en la presente memoria significa, aunque no se limita a ello, cualquier infección de cerdos provocada por patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o gusanos que no sean circovirus, en particular que no sean PCV2. El término "patógeno concomitante" tal como se usa en la presente memoria significa, aunque sin limitarse a ello, un patógeno de cerdo que no es circovirus, en particular que no es PCV2. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o de gusanos, diferentes a circovirus, en particular diferentes al PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2. Preferiblemente, las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos bacterianos, víricos o fúngicos, o por combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos bacterianos o víricos, o por una combinación de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la expresión "infecciones concomitantes" también significa que el cerdo infectado con uno o más patógenos concomitantes diferentes de circovirus, en particular diferentes de PCV2, está infectado también con PCV2. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos coinfectados con PCV2, en donde las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos diferentes a circovirus, en particular diferentes a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2. Preferiblemente, las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o de gusanos que no sean circovirus, en particular que no sean PCV2.

La expresión "coinfectado con PCV2" tal como se usa en la presente memoria significa, aunque sin limitación, cualquier forma de coinfección con PCV2, lo que significa que la infección de PCV2 se produce antes, simultáneamente o después de la infección de los patógenos que son diferentes a circovirus, en particular diferentes

a PCV2. También incluye cursos subclínicos, clínicos aparentes, fulminantes y crónicos de infecciones de PCV2. En este contexto, los cursos aparentes no se limitan a PMWS, sino que también incluyen cualquier otras apariciones clínicas de infecciones de PCV2 tales como el complejo de enfermedad respiratoria porcina (PRDC, del inglés "Porcine Respiratory Disease Complex"), el síndrome de dermatopatía y nefropatía porcina (PDNS, del inglés "Porcine Dermatopathy and Nephropathy Syndrome"), el fallo reproductivo, la enteritis granulomatosa, potencialmente, temblores congénitos (CT-All) y miocarditis perinatal (Chae, Veterinary J., 2005; 169: 326-336).

Sin embargo, la expresión "infección concomitante" no significa necesariamente que el cerdo o la pira de cerdos estén coinfectados con PCV2. La expresión "infección concomitante" también se refiere, aunque sin limitación, a casos en los que los cerdos o las piras de cerdos son expuestos a PCV2, o en los que existe riesgo de ser infectados con PCV2. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una pira de cerdos expuestos a PCV2, o en peligro o susceptibles de ser infectados con PCV2, en donde las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos diferentes a circovirus, en particular diferentes a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende PCV2. Preferiblemente, las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o de gusanos que no sean circovirus, en particular que no sean PCV2.

La expresión "el porcentaje de infecciones concomitantes se reduce" significa que el número de cerdos infectados con un patógeno que no es circovirus se reduce para dicho patógeno en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en más de un 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. En este contexto, la expresión "grupo de control no vacunado" significa un grupo de cerdos al que no se ha administrado una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una pira de cerdos provocadas por un patógeno diferente a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde el número de cerdos infectados con dicho patógeno diferente a circovirus, se reduce para dicho patógeno en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en más de un 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. Preferiblemente, la infección concomitante está provocada por un patógeno vírico, bacteriano o fúngico diferente a circovirus, en particular diferente a PCV2. Más preferiblemente, dichos cerdos o pira de cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2.

Las infecciones concomitantes provocadas por un patógeno vírico, bacteriano o fúngico diferente de circovirus, en particular diferente de PCV2, pueden provocar en los animales infectados síntomas entéricos, respiratorios, reproductivos, del sistema nervioso central o del sistema locomotor. La incidencia de cualquiera de dichos síntomas clínicos, provocados por los respectivos patógenos, puede reducirse. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una pira de cerdos provocadas por uno o más patógenos entéricos, respiratorios, reproductivos, del sistema nervioso central o del sistema locomotor, diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con un patógeno entérico, respiratorio, reproductivo, del sistema nervioso central o del sistema locomotor diferente de circovirus, se reduce para dicho patógeno entérico, respiratorio, reproductivo, del sistema nervioso central o del sistema locomotor en más del 10%, preferiblemente en más del 20%, más preferiblemente en más del 30%, incluso más preferiblemente en más del 40%, incluso más preferiblemente en más del 50%, incluso más preferiblemente en más del 60%, incluso más preferiblemente en más del 80% e incluso más preferiblemente el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

Por ejemplo, patógenos entéricos son *Lawsonia intracellularis*, *E. coli*, *Streptococcus suis*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp., rotavirus o coronavirus. Los patógenos respiratorios son por ejemplo PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*. Patógenos reproductivos son, por ejemplo, *Leptospira* spp., PRRSV, *Chlamydia* spp. Los patógenos del sistema locomotor son por ejemplo *S. suis*, *M. hyorhinis*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*. Patógenos del sistema nervioso central son, por ejemplo, el virus de la Pseudorabia, *S. suis*, *Haemophilus* sp.

En general, la expresión "patógeno diferente de PCV2" significa, aunque sin limitación, uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP); virus de la fiebre porcina africana; *Aspergillus* spp.; *Astrovirus*; *Ascaris suum*; *Blastocystis* spp.; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*; *Brucella suis*, *Brucella suis* biovars

1, 2 y 3; *Candida* spp.; virus de la fiebre porcina clásica; *Clostridium* spp., en particular *C. difficile*, *C. perfringens* tipos A, B y C, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. tetani*; *Chlamydia* spp., *Cryptosporidium* spp.; virus de encefalomiocarditis; Eperythrozoonosis suis; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Fusarium* spp.; *Haemophilus parasuis*; virus de la encefalomiocarditis hemoaglutinante; virus de Hepatitis E; virus de la encefalitis japonesa; *Hyostroglylus rubidus*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., *L. australis*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagicae*, *L. interrogans*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. sejroe*, *L. bratislava*; *Mannheimia haemolytica*; virus Menangle; *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp., *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; virus Nipah; *Oesophagostom* spp., *Oesophagostom dentatum*, *Oesophagostom quadrosinulatum*; *Pasteurella* spp., *P. multocida*; *Penicillium* spp.; adenovirus porcino; citomegalovirus porcino; calicivirus entéricos porcinos; picornavirus entéricos porcinos; parvovirus porcino; coronavirus respiratorio porcino; virus PRRS; virus de pseudorabia; Reovirus; Rotavirus; Rubulavirus; *Salmonella* spp., *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*; *Sarcoptes* spp.; *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp., *S. suis*, *S. porcinus*, *S. dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; *Strongyloides ransomi*; virus de herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus de la varicela porcina; virus de gastroenteritis transmisible; *Trichuris* spp. *Taenia* spp., *Trichinella spiralis*; virus de la estomatitis vesicular; virus de exantema vesicular de cerdos; virus del Nilo Occidental; o *Yersinia* spp., *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos diferentes a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde los patógenos que provocan las infecciones concomitantes se seleccionan del grupo que consiste en: *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP); virus de la fiebre porcina africana; *Aspergillus* spp.; *Astrovirus*; *Ascaris suum*; *Blastocystis* spp.; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*; *Brucella suis*, *Brucella suis* biovars 1, 2 y 3; *Candida* spp.; virus de la fiebre porcina clásica; *Clostridium* spp., en particular *C. difficile*, *C. perfringens* tipos A, B y C, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. tetani*; *Chlamydia* spp., *Cryptosporidium* spp.; virus de encefalomiocarditis; Eperythrozoonosis suis; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Fusarium* spp.; *Haemophilus parasuis*; virus de la encefalomiocarditis hemoaglutinante; virus de Hepatitis E; virus de la encefalitis japonesa; *Hyostroglylus rubidus*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., *L. australis*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagicae*, *L. interrogans*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. sejroe*, *L. bratislava*; *Mannheimia haemolytica*; virus Menangle; *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp., *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; virus Nipah; *Oesophagostom* spp., *Oesophagostom dentatum*, *Oesophagostom quadrosinulatum*; *Pasteurella* spp., *P. multocida*; *Penicillium* spp.; adenovirus porcino; citomegalovirus porcino; calicivirus entéricos porcinos; picornavirus entéricos porcinos; parvovirus porcino; coronavirus respiratorio porcino; virus PRRS; virus de pseudorabia; Reovirus; Rotavirus; Rubulavirus; *Salmonella* spp., *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*; *Sarcoptes* spp.; *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp., *S. suis*, *S. porcinus*, *S. dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; *Strongyloides ransomi*; virus herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus varicela porcina; virus de gastroenteritis transmisible; *Trichuris* spp. *Taenia* spp., *Trichinella spiralis*; virus de la estomatitis vesicular; virus de exantema vesicular de cerdos; virus del Nilo Occidental; o *Yersinia* spp., *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*.

Preferiblemente dichas infecciones concomitantes están causadas por uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Mycoplasma hyorhinis*; *Pasteurella multocida*; PRRS; *Salmonella* spp. y *Streptococcus suis*. Más preferiblemente dichas infecciones concomitantes están causadas por uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Mycoplasma hyorhinis*; *Pasteurella multocida*; PRRS; *Salmonella* spp. y *Streptococcus suis*. Más preferiblemente dichas infecciones concomitantes están causadas por uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Mycoplasma hyorhinis*, y PRRS. Más preferiblemente por *Mycoplasma hyorhinis* y/o PRRS.

Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con uno o más de dichos patógenos anteriores, que no son circovirus, se reduce para dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en más de un 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. En caso de infecciones múltiples, las tasas de reducción descritas se refieren a cada patógeno específico. Por ejemplo, una reducción de más del 10% de infecciones concomitantes en un cerdo infectado múltiplemente significa que la tasa de infección con respecto a un patógeno específico se reduce en más de un 10%. No significa necesariamente que la tasa de infección con respecto a todos los patógenos se reduzca en más del 10% en comparación con un grupo de control no vacunado, o con respecto a una piara de cerdos que menos del 10% de los cerdos de dicha piara están infectados con todos los patógenos.

La expresión "antígeno de PCV2", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos que provoca una respuesta inmunológica contra PCV2 en un hospedante. Un antígeno, tal como se

usa en la presente memoria, incluye la secuencia de longitud completa de cualquier proteína del PCV2, sus análogos o sus fragmentos inmunogénicos.

La expresión "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítomos y, así, provoca la respuesta inmunológica en un huésped. Dichos fragmentos pueden identificarse utilizando cualquier técnica de representación en mapas de epítomos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítomos lineales se pueden determinar, por ejemplo, sintetizando concurrentemente una gran cantidad de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos, a la vez que los péptidos siguen estando fijados a los soportes. Dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, 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, los epítomos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, *supra*.

Dentro de la definición de antígenos sintéticos también se incluyen, por ejemplo, los poliepítomos, epítomos flanqueantes y otros antígenos recombinantes u obtenidos de forma sintética. Véase, por ejemplo, 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.

Una "respuesta inmunológica" significa, pero no se limita al desarrollo en un huésped de una respuesta inmunológica celular y/o mediada por anticuerpos a un antígeno, composición inmunológica 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, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped exhibirá bien una respuesta inmunológica terapéutica o bien protectora (memoria), de modo que la resistencia a una nueva infección resultará reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad quedará reducida. Esta protección se verá demostrada bien por una reducción en el número o en la gravedad de los síntomas, o bien por la ausencia de uno o más de los síntomas asociados con las infecciones por PCV2, por un retraso en la aparición de viremia, por una persistencia vírica reducida, por una reducción en la carga vírica global y/o por una reducción en la excreción vírica.

La expresión "composición inmunogénica" o el término "vacuna" (ambos se utilizan como sinónimos), tal como se utilizan en la presente, se refieren a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno del PCV2, pudiéndose utilizar dicha composición para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado con una infección por PCV2 en un sujeto. Una composición inmunogénica preferida puede inducir, estimular o reforzar la respuesta inmune frente al PCV2. Por lo tanto, la expresión abarca tanto composiciones inmunogénicas de subunidades, tales como las que se describen a continuación, así como composiciones que contienen PCV2 completo matado o atenuado y/o desactivado.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en el que la composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2 es una composición inmunogénica de subunidades, una composición que contiene PCV2 enteros muertos, o atenuados y/o desactivados. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en más de un 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

La expresión "composición inmunogénica de subunidades", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una composición que contiene al menos un polipéptido o antígeno inmunogénico, pero no todos los antígenos, derivados u homólogos de un antígeno procedente del PCV2. Una composición de este tipo está sustancialmente exenta de PCV2 intacto. Así, una "composición inmunogénica de subunidades" se prepara a partir de polipéptidos inmunogénicos procedentes del PCV2 al menos parcialmente purificados o fraccionados (preferiblemente esencialmente purificados), o análogos recombinantes de los mismos. Una composición inmunogénica de subunidades puede comprender las subunidades del antígeno o antígenos de interés esencialmente exentas de otros antígenos o polipéptidos procedentes del PCV2, o en forma fraccionada. Una composición inmunogénica de subunidades preferida comprende la proteína ORF-2 del PCV2, como se describe a continuación. Las composiciones más preferidas son las composiciones inmunogénicas de subunidades que comprenden cualquiera

de los antígenos del PCV2 proporcionados en el documento WO06/072065, que se incorporan todos en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Según un aspecto adicional, la composición inmunogénica, como se utiliza en la presente memoria, comprende más preferiblemente el polipéptido, o uno de sus fragmentos, expresado por ORF-2 del PCV2. El ADN y la proteína ORF-2 del PCV2, utilizados en la presente memoria para la preparación de las composiciones y en los procedimientos proporcionados en la presente memoria es un dominio altamente conservado en elementos aislados de PCV2 y, por tanto, cualquier ORF-2 del PCV2 será eficaz como fuente de ADN y/o de polipéptidos de ORF-2 del PCV2 tal como se usa en la presente memoria. Una proteína ORF-2 del PCV2 preferida es la de SEQ ID NO: 11 del documento WO06/072065. Un polipéptido ORF-2 del PCV más preferido se proporciona como SEQ ID NO: 5 en el documento WO06/072065. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que esta secuencia podría variar hasta un 6-10% en homología de secuencia y aún conservar las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden estimarse, por ejemplo, mediante el experimento de exposición que se proporciona en el Ejemplo 4 del documento WO06/072065. Además, se sigue conservando la característica antigénica de un antígeno modificado cuando el antígeno modificado confiere al menos un 70%, preferiblemente un 80%, más preferiblemente un 90% de inmunidad protectora, en comparación con la proteína ORF-2 del PCV2, codificada por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4, como se proporciona en el documento WO06/072065.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por patógenos diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde el antígeno de PCV2 es una proteína ORF-2 de antígeno de PCV2 que tiene al menos un 70%, preferiblemente un 80%, incluso más preferiblemente un 90% de inmunidad protectora, en comparación con la proteína ORF-2 del PCV2, codificada por la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 3 ó de la SEQ ID NO: 4, tal como se proporciona en el documento WO06/072065. Preferiblemente, dicha ORF-2 del PCV2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 5 del documento WO06/072065. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus se reduce en más de un 40%, preferiblemente en más de un 50%, más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en más de un 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

En algunas formas, las porciones inmunogénicas de la proteína ORF-2 del PCV2 se usan como el componente antigénico en la composición inmunogénica, que comprende el antígeno del PCV2. La expresión "porción inmunogénica", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a formas truncadas y/o sustituidas, o a fragmentos de la proteína y/o del polinucleótido ORF-2 del PCV2, respectivamente. Preferiblemente, dichas formas truncadas y/o sustituidas o fragmentos comprenderán al menos 6 aminoácidos contiguos procedentes del polipéptido ORF-2 de longitud completa. Más preferiblemente, las formas truncadas o sustituidas, o fragmentos tendrán al menos 10, más preferiblemente al menos 15, y todavía más preferiblemente al menos 19 aminoácidos contiguos procedentes del polipéptido ORF-2 de PCV de longitud completa. Dos secuencias preferidas a este respecto se proporcionan como SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 del documento WO06/072065. Se entiende, además, que dichas secuencias pueden ser parte de fragmentos mayores o formas truncadas.

Como se ha mencionado anteriormente, un polipéptido ORF-2 del PCV2 preferido adicionalmente es cualquiera codificado por las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que esta secuencia podría variar tanto como 6-20% en homología de secuencia y aún conservar las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. En algunas formas, se utiliza una forma truncada o sustituida o un fragmento de este polipéptido ORF-2 del PCV2 como el componente antigénico en la composición. Preferiblemente, dichas formas truncadas o sustituidas o fragmentos comprenderán al menos 18 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos de longitud completa del ORF-2 del PCV2, por ejemplo de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, las formas truncadas o sustituidas, o los fragmentos, tendrán al menos 30, más preferiblemente al menos 45, y aún más preferiblemente al menos 57 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos del ORF-2 del PCV2 de longitud completa, por ejemplo, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

"Identidad de 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, es decir, una secuencia de referencia y una secuencia dada que debe ser comparada con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de haber alineado de forma óptima las secuencias para producir el grado más alto de similitud de secuencia, según se determina por el apareamiento entre las hebras de dichas secuencias. Tras el alineamiento, la identidad de secuencia se constata sobre una base de posición-a-posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si en esa posición los restos de nucleótidos o aminoácidos son idénticos. El número total de dichas identidades de posición se divide entonces por el número total de nucleótidos o restos en la secuencia de referencia para proporcionar el % de identidad de secuencia. La identidad de 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), cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria como referencia. Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia se diseñan para obtener el apareamiento mayor entre las secuencias sometidas a ensayo. Los métodos para determinar la identidad de secuencia están codificados en programas informáticos disponibles públicamente 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 en el NCBI y 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), cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria como referencia). Estos programas alinean de forma óptima las 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, para un nucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, 85%, preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de "identidad de secuencia" con una secuencia de nucleótidos de referencia, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de nucleótidos 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 85%, preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 15%, preferiblemente 10%, incluso más preferiblemente 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede tener eliminaciones o estar sustituido con otro nucleótido, o un cierto número de nucleótidos de hasta 15%, preferiblemente 10%, incluso más preferiblemente 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 bien individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos dada que tenga al menos, por ejemplo, 85%, preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido dado es 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 85%, preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 15%, preferiblemente hasta 10%, incluso más preferiblemente hasta 5% de los restos aminoácidos en la secuencia de referencia puede tener eliminaciones o estar sustituido con otro aminoácido, o un cierto número de aminoácidos de hasta 15%, preferiblemente hasta 10%, incluso más preferiblemente hasta 5% del número total de restos 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 restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren en sustituciones conservativas de aminoácidos. Sin embargo, las sustituciones conservativas no están incluidas como apareamiento cuando se determina la identidad de secuencia.

"Homología de secuencia", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un método para determinar el grado de relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, se alinean de forma óptima dos o más secuencias y, si es necesario, se introducen huecos. Sin embargo, en contraposición con la "identidad de secuencia", las sustituciones conservativas de aminoácidos se cuentan como un apareamiento cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido que tiene 95% de homología de secuencia con una secuencia de referencia, 85%, preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de los restos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de referencia debe aparearse o comprender una sustitución conservativa con otro aminoácido o nucleótido, o un cierto número de aminoácidos o nucleótidos hasta 15%, preferiblemente hasta 10%, incluso más preferiblemente hasta 5% del total de restos de aminoácidos o nucleótidos, sin incluir las sustituciones conservativas, en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Preferiblemente, la secuencia homóloga comprende al menos un tramo de 50, incluso más preferiblemente de al menos 100, incluso más preferiblemente de al menos 250 e incluso más preferiblemente de al menos 500 nucleótidos.

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

“Aislado” significa alterado “por la mano del hombre” respecto a 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 está presente de forma natural en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes en su estado natural está “aislado”, tal como se emplea el término en la presente memoria.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos que no son PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde dicha proteína ORF-2 del PCV2 es cualquiera de las descritas anteriormente. Preferiblemente, dicha proteína ORF-2 del 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 del documento WO06/07065,
- ii) cualquier polipéptido que es al menos 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 del documento WO06/072065,
- v) un polipéptido que es codificado por un ADN que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 del documento WO06/072065,
- vi) cualquier polipéptido que es codificado por un polinucleótido que es al menos 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 la que 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 del documento WO06/072065,

Preferiblemente, cualquiera de esas porciones inmunogénicas tiene las características inmunogénicas de la proteína ORF-2 del PCV2 que es codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 del documento WO06/07065.

Preferiblemente, dichos cerdos infectados están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

Según un aspecto adicional, la proteína ORF-2 del PCV2 se proporciona en la composición inmunogénica en un nivel de inclusión de antígeno eficaz para el tratamiento de animales infectados subclínicamente con PCV2. Preferiblemente, el nivel de inclusión de la proteína ORF-2 del 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, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/ml, incluso 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, incluso 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 preferible de aproximadamente 1,6 µg/ml.

Según otro aspecto, el nivel de inclusión del antígeno ORF-2 del PCV es al menos 0,2 µg/proteína ORF-2 del PCV2, tal como se ha descrito anteriormente, por dosis de la composición antigénica final (µg/dosis), más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/dosis, incluso 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, incluso 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 preferible aproximadamente 1,6 µg/dosis.

El polipéptido ORF-2 del PCV2 utilizado en la composición inmunogénica según la presente invención se puede obtener de cualquier manera, incluyendo el aislamiento y la purificación del ORF2 del PCV2, síntesis convencional de proteínas y metodología recombinante. Métodos preferidos para obtener el polipéptido ORF-2 del PCV2 se proporcionan en el documento WO06/072065, cuyas enseñanzas y contenido se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. En síntesis, se infectan células susceptibles con un vector vírico recombinante que contiene secuencias codificadoras del ADN de la ORF-2 del PCV2, el polipéptido ORF-2 del PCV2 es expresado por el virus recombinante, y el polipéptido ORF-2 del PCV2 expresado se recupera del sobrenadante por filtración y se desactiva mediante cualquier método convencional, preferiblemente utilizando etilimina binaria, que luego se neutraliza para detener el proceso de desactivación.

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF-2 del PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, y ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante. Además, la composición inmunogénica puede comprender i) cualquiera de las proteínas ORF-2 del PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante y iii) una porción del sobrenadante del cultivo celular.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos que no son PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde dicho antígeno de PCV2 es ORF-2 de PCV2 recombinante, preferiblemente una ORF-2 de PCV2 expresada en baculovirus. Preferiblemente, aquellos ORF-2 del PCV2 recombinante o expresado por baculovirus tienen la secuencia como se ha descrito anteriormente.

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF-2 del PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, y iii) una porción del cultivo celular; en la que aproximadamente 90% de los componentes tienen un tamaño menor que 1 μm .

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF-2 del PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) y un agente desactivante para desactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente la BEI, en la que aproximadamente 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 μm . Preferiblemente, la BEI está presente en concentraciones eficaces para desactivar el baculovirus, preferiblemente en una cantidad de 2 a aproximadamente 8 mM de BEI, preferiblemente de aproximadamente 5 mM de BEI.

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF-2 del PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) un agente desactivante para desactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la desactivación mediada por el agente desactivante, en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 μm . Preferiblemente, si el agente desactivante es la BEI, dicha composición comprende tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a la BEI.

El polipéptido se incorpora en una composición que puede ser administrada a un animal susceptible de una infección por PCV2. En las formas preferidas, la composición puede incluir también componentes adicionales conocidos por los expertos en la técnica (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18^a ed. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes aceptables desde un punto de vista veterinario. Tal como se emplea en esta memoria, "un soporte aceptable desde el punto de vista veterinario" incluye uno y cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la adsorción y similares. En un modo de realización preferido, la composición inmunogénica comprende la proteína ORF-2 del PCV2 según se proporciona en la presente memoria, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, la cual se mezcla con un adyuvante, preferiblemente Carbopol, y disolución salina fisiológica.

Los expertos en la técnica comprenderán que la composición utilizada en la presente memoria puede incorporar disoluciones estériles inyectables fisiológicamente aceptables conocidas. Para preparar una disolución lista para el uso para inyección parenteral o infusión, se encuentran disponibles fácilmente disoluciones isotónicas acuosas, tales como, por ejemplo, disolución salina o correspondientes disoluciones de proteínas en plasma. Además, las composiciones de vacuna e inmunogénicas de la presente invención pueden incluir diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes. Diluyentes pueden incluir agua, disolución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares.

Agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetracético, entre otros.

5 “Adyuvantes”, tal como se utiliza en la presente memoria, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, 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 y emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede tener una base, en particular, de aceite de parafina líquido ligero (tipo de la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide, tal como aceite de escualano o de 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-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o alcoholes ramificados, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferiblemente tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo, 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, especialmente L121. Véase Hunter *et al.*, *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd *et al.*, *Vaccine* 15: 564-570 (1997).

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

25 Un ejemplo adicional de un adyuvante es un compuesto elegido entre los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueniolo. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialqueniol-éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el término de carbómero (*Phameuropa*, vol. 8, nº 2, junio 1996). Los expertos en la técnica también pueden referirse a la patente de EE.UU. nº 2.909.462 que describe polímeros acrílicos de este tipo reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos sustituidos con radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados también pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos con el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son particularmente apropiados. Están reticulados con una aliisacarosa o con alilpentaeritritol. Entre ellos se pueden mencionar el Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferido, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

40 Adyuvantes adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a ellos, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), copolímero de bloques (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil-lípido A, adyuvante de lípido-amina Avridina, enterotoxina térmicamente lábil procedente de *E. coli* (recombinante o de otra forma), toxina de cólera, IMS 1314 o dipéptido de muramilo, entre muchos otros.

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

50 Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. Tal como se utiliza en la presente memoria, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye uno y cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retardan la adsorción y similares. Lo más preferiblemente, la composición proporcionada con la presente, contiene proteína ORF-2 de PCV2 recuperada del sobrenadante de células cultivadas in vitro, en la que dichas células estaban infectadas con un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF-2 de PCV2 y que expresan proteína ORF-2 de PCV2, y en el que dicho cultivo celular se trató con aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM de BEI, preferiblemente con aproximadamente 5 mM de BEI, para desactivar el vector viral, y una concentración equivalente de un agente de neutralización, preferiblemente disolución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM.

65 De acuerdo con otra realización adicional, la presente invención también se refiere al uso de antígeno de PCV2 para la preparación de una composición inmunogénica para la reducción de infecciones concomitantes provocadas por uno o más patógenos que no son PCV-2 en cerdos o en una piara de cerdos, en donde dicha composición

5 inmunogénica comprende i) cualquiera de las proteína ORF-2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 de PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) un agente desactivante para desactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la desactivación mediada por el agente de desactivación, preferiblemente tiosulfato sódico en cantidades equivalentes al BEI; y vi) un adyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971, en las cantidades descritas anteriormente; en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tiene un tamaño menor que 1 µm. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en más de un 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

15 Según un aspecto adicional, esta composición inmunogénica comprende, además, una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una sal de 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.

20 La composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere también a una composición que comprende, por 1 ml i) al menos 1,6 µg de proteína ORF-2 del PCV2 descrita anteriormente, ii) al menos una porción de baculovirus que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) BEI de aproximadamente 2 a 8 mM, v) tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a las de la BEI; y vi) aproximadamente 1 mg de Carbopol 971, y vii) sal de fosfato en una concentración fisiológicamente aceptable; en la que aproximadamente 90% de los componentes i) a iii) tiene un tamaño menor que 1 µm, y el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta aproximadamente entre 6,5 y 7,5.

30 Las composiciones inmunogénicas pueden además incluir uno o más agentes adicionales inmunomoduladores, tales como, por ejemplo, interleuquinas, interferones u otras citoquinas. Las composiciones inmunogénicas pueden también incluir gentamicina y mertiolato. Si bien las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 2.000 µg de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 250 µg/mL de dosis de la composición de vacuna. Así, la composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere también a una composición que comprende de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 60 µg/mL de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/mL de antibióticos.

40 La composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquier proteína ORF-2 del PCV2 descrita anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) un agente desactivante para desactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente BEI, v) un agente de neutralización para detener la desactivación mediada por el agente desactivante, preferiblemente tiosulfato sódico en cantidades equivalentes al BEI; vi) un adyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971, en las cantidades descritas anteriormente; vii) una concentración farmacéuticamente aceptable de una disolución tampón salina, preferiblemente de una sal fosfato, y viii) un agente anti-microbiológico activo; en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tiene un tamaño menor que 1 µm.

50 La composición inmunogénica, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere también a Ingelvac®, CircoFLEX™, (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, MO, EEUU), CircoVac® (Merial SAS, Lyon, Francia), CircoVent (Intervet Inc., Millsboro, DE, EEUU) o Suvaxyn PCV-2 One Dose® (Fort Dodge Animal Health, Kansas City, KA, EEUU). Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde dicha composición inmunogénica que comprende un antígeno de PCV2 es Ingelvac® CircoFLEX™, CircoVac®, CircoVent y/o Suvaxyn PCV-2 One Dose®, preferiblemente es Ingelvac® CircoFLEX™. Preferiblemente, dichos cerdos infectados están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

La expresión "una cantidad eficaz de un antígeno de PCV2", tal como se utiliza en la presente memoria, significa, aunque sin limitación, una cantidad de un antígeno de PCV2 que provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunológica en un animal, al cual se administra dicha cantidad eficaz de un antígeno de PCV2.

5 La cantidad que es eficaz depende de los ingredientes de la vacuna y del esquema de administración. Típicamente, cuando se utiliza una preparación con un virus desactivado o un virus vivo modificado en la vacuna de combinación, se utilizará una cantidad de vacuna que contenga aproximadamente de $10^{2.0}$ a aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀ por dosis, preferiblemente aproximadamente de $10^{3.0}$ a aproximadamente $10^{8.0}$ DICT₅₀ por dosis, más preferiblemente, aproximadamente de $10^{4.0}$ a aproximadamente $10^{8.0}$ DICT₅₀ por dosis. En particular, cuando se utiliza PCV2 vivo
10 modificado en las vacunas, la dosis recomendada para ser administrada al animal susceptible es preferiblemente de aproximadamente $10^{3.0}$ DICT₅₀ (50% del punto final de la dosis infecciosa en cultivo de tejido) /dosis a aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/dosis, y más preferiblemente de aproximadamente $10^{4.0}$ DICT₅₀/dosis a aproximadamente $10^{5.0}$ DICT₅₀/dosis. En general, la cantidad de antígeno estará entre 0,2 y 5.000 microgramos, y entre $10^{2.0}$ y $10^{9.0}$ DICT₅₀, preferiblemente entre $10^{3.0}$ y $10^{6.0}$ DICT₅₀, más preferiblemente entre $10^{4.0}$ y $10^{5.0}$ DICT₅₀,
15 cuando se utiliza un antígeno purificado.

Las vacunas de subunidades se administran normalmente con un nivel de inclusión del antígeno de al menos 0,2 µg de antígeno por dosis, preferiblemente con aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 400 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 200 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,35 hasta aproximadamente 100 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 50 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,45 hasta aproximadamente 30 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,6 hasta aproximadamente 16 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 incluso más preferiblemente con aproximadamente 1,3 hasta aproximadamente 3,0 µg/dosis.
20
25

La administración de antígeno de PCV2 a cerdos no sólo produce la reducción del porcentaje de infecciones concomitantes provocadas por patógenos diferentes de circovirus, en particular diferentes de PCV2, sino que también produce una mejoría general de la salud, particularmente de la resistencia frente a dichas infecciones concomitantes. Así, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para mejorar la resistencia de cerdos contra una o más infecciones concomitantes con patógenos diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende el antígeno de PCV2. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2.
30
35

La expresión "mejorar la resistencia de los cerdos contra infecciones concomitantes" tal como se usa en la presente memoria se refiere, aunque sin limitación, a un proceso en el que el número de cerdos infectados con un patógeno diferente de circovirus se reduce con respecto a dicho patógeno en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para mejorar la resistencia de cerdos frente a infecciones concomitantes con uno o más patógenos diferentes a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde el número de cerdos infectados con uno o más de dichos patógenos diferentes a circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2.
40
45
50

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN PREFERIDOS

55 Los siguientes ejemplos recogen los materiales y procedimientos preferidos 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 del alcance global de la invención.

60 EJEMPLO 1

Detección de infecciones concomitantes en animales infectados con PCV-2

Población de estudio

65 El estudio se llevó a cabo en la zona sur de Alemania. Se obtuvieron cerdos híbridos de líneas de cría comerciales (Landrace o Edelschwein (f) x Pietrain (m)) de 15 granjas de cría diferentes que son parte de una

"comunidad productora de cerdos". Las granjas de cría presentaban distinto tamaño (de 50 a 300 cerdas), manejo y estado de salud. Las medidas rutinarias preventivas de los cochinitos de todas las granjas de cría incluían inyección de hierro, cortado de dientes y cola y castración. Tras el destete a la edad aproximada de 4 semanas, se transfirieron cochinitos de las diferentes granjas de cría a una granja guardería con un sistema de producción todo-dentro-todo-fuera. Fueron alojados combinados en tres cuadras con corrales diseñados para entre 60 y 120 cerdos por corral. Las medidas preventivas rutinarias en la zona de guardería incluían tratamiento profiláctico con tetraciclina hidrócloruro para los primeros diez días tras la llegada. Se realizaron cuatro cambios en la composición de la comida durante la guardería. El alimento proporcionado a los animales fue auto-preparado en base a cebada y minerales. A la edad aproximada de 12 semanas los cerdos fueron trasladados a una granja de engorde con un sistema de producción todo-dentro-todo-fuera. Nuevamente fueron combinados y alojados en dos establos con corrales diseñados para entre 10 y 30 cerdos por corral. Se realizaron tres cambios en la composición de la comida durante el engorde. El alimento proporcionado a los animales fue auto-preparado en base a cebada, trigo, maíz y concentrado de suero. Los cerdos permanecieron en la granja de engorde durante de 13 a 18 semanas.

Historial de la enfermedad

El modelo de enfermedad de PMWS se había vuelto clínicamente aparente aproximadamente tres años antes del inicio del estudio, en noviembre de 2002, y fue confirmado serológicamente en diciembre de 2002. Al final de la guardería / principio del engorde, los animales comenzaron a mostrar los signos típicos de PMWS, tales como emaciación, síntomas respiratorios y un marcado incremento de la tasa de mortalidad. La enfermedad se complicó con dos coinfecciones con PRRSV. La tasa de mortalidad durante la guardería (4-12 semanas de edad) normalmente osciló entre 3,5 y 4,8 %, pero también se produjeron ocasionalmente picos de hasta un 10% de mortalidad. Durante la mitad de la fase tardía del engorde, los síntomas respiratorios y el retraso en el crecimiento fueron predominantes en los animales infectados con PCV2. La tasa de mortalidad durante el engorde (cerdos de 12-26 semanas de edad) fue aproximadamente 1,7-2,4 % y el número de muertes selectivas fue del 1%. La ganancia de peso media diaria sólo fue moderada (719-731 g/día). Tres meses antes del inicio del estudio se verificó el diagnóstico de PMWS en base a los signos clínicos y la viremia de PCV2, produciéndose ambos cuando los animales tenían una edad aproximada de 9 a 13 semanas. Como patógenos coinfectantes, se identificaron PRRSV y *Mycoplasma hyorhinis* en muestras de irrigación de pulmón de animales infectados con PCV2.

Artículos de ensayo

Para la vacunación activa contra PCV2, se administró una vacuna de subunidad desactivada (Ingelvac® CircoFLEX™, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH). La vacuna contenía la proteína de cápsida ORF2 del PCV2 como componente activo, y carbómero como adyuvante. La secuencia de ORF2 fue derivada de un elemento aislado de PCV2 Norte Americano que había sido aislado a partir de muestras de amígdala y de hígado de dos cerdos con síntomas de PMWS. La secuencia de ORF2 fue insertada posteriormente en un sistema de expresión de baculovirus usando una línea celular de insecto derivada de ovarios del gusano *Sodoptera frugiperda* (células SF+) como hospedante. Como artículo de control se empleó un placebo que contenía sobrenadante de cultivo celular libre de proteína de cápsida de PCV2, y carbómero como adyuvante.

Diseño experimental

El ensayo de campo se llevó a cabo de acuerdo con los principios de "Buenas Prácticas Clínicas" (BPC) y siguió un diseño de estudio paralelo aleatorio, con control negativo, doblemente ciego. Un total de 1519 cochinitos sanos fueron distribuidos homogéneamente en dos grupos de tratamiento con respecto al peso corporal inicial y la asignación de lecho. Una semana antes del destete, se vacunó un grupo de cochinitos (n = 754) con Ingelvac® CircoFLEX™ y el otro grupo (n = 765) recibió un placebo. Los artículos evaluados fueron administrados como dosis sencillas de 1 mL intramuscularmente en la región derecha del cuello cuando los cochinitos tenían una edad de $25,4 \pm 3,18$ días (media \pm S.D.). Tras el destete, cerdos de ambos grupos de tratamiento fueron mantenidos en grupos mixtos hasta el final a fin de maximizar la exposición uniforme a patógenos.

Reacciones en cadena de polimerasa

Los ensayos de reacción en cadena de polimerasa fueron usados tal como se describe a fin de detectar ácidos nucleicos específicos para PRRSV (Mardassi H, y col., J Clin Microbiol 1994; 32 (9): 2197-203), *Mycoplasma hyorhinis* (Caron J, y col., J Clin Microbiol 2000; 38 (4): 1390-6), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Calsamiglia M, y col., J Vet Diagn Invest 1999 Mayo; 11 (3): 246-51), *Streptococcus suis* (Wisselink HJ, y col., J Clin Microbiol 2002 Agosto; 40 (8): 2922-9), *Pasteurella multocida* (Townsend KM, y col., J Clin Microbiol 1998 Abril; 36 (4): 1096-100), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Schaller A, y col., Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. Vet Microbiol 2000 12 de Junio; 74 (4): 365-76), *Bordetella bronchiseptica* (Hozbor D, y col., Res Microbiol 1999 Junio; 150 (5): 333-41) y *Haemophilus parasuis* (Calsamiglia M, y col., J Vet Diagn Invest 1999 Marzo; 11 (2): 140-5) en muestras de tejido de pulmón.

Para la cuantificación de la carga vírica de PCV2 en suero, se cuantifican/cuantificaron equivalentes de genoma de PCV2 de acuerdo con el método descrito en Brunborg y col., 2004; J. Virol. Methods 122: 171-178. Para la amplificación del PCV2 se usaron/usan iniciadores PCV2-84-1265U21 y PCV2-84-1319L21. El nivel de corte para una muestra positiva se fijó en 10^4 copias de plantilla por mL de suero en base a experimentos de

validación. Todos los ensayos de cuantificación de ADN de PCV2 se llevaron a cabo en bioScreen GmbH, Münster, Alemania.

Resultados

Viremia de PCV2

Se investigó si el comienzo y la gravedad de los síntomas clínicos y lesiones observados característicos de PMWS estaban relacionados con el inicio de la viremia de PCV2 en la sangre de "animales de muestra" preseleccionados. Tal como se ilustra en la Figura 1, el inicio de la viremia de PCV2 comenzó en el grupo tratado con placebo cuando los animales tenían una edad de aproximadamente 9-10 semanas. Se alcanzaron niveles máximos de hasta un 85% de animales positivos en PCV2 cuando los animales tenían una edad aproximada de entre 11 y 14 semanas. A partir de las 14 semanas de edad y hasta el final del engorde, la proporción de animales virémicos con PCV2 fue decreciendo sin que sin embargo se alcanzaran de nuevo los niveles de línea base. De media, la duración individual de la viremia duró 56 días (datos no mostrados).

En comparación con el grupo tratado con placebo, la proporción de animales positivos en PCV2 del grupo vacunado fue significativamente más reducida ($p < 0,0001$) con no más del 35% de animales positivos en el máximo de viremia (Figura 1B). La duración media de la viremia en los animales vacunados se redujo en 31 días ($p < 0,0001$; datos no mostrados).

También se realizó un examen de la carga vírica en los animales. En este estudio se observaron principalmente cargas víricas de relevancia clínica ($> 10^6$ gE/mL de suero) en los animales tratados con placebo en la fase temprana de la viremia, cuando los animales tenían aproximadamente 10-15 semanas de edad (Figura 1A). A la edad de 11 semanas, la proporción de animales con cargas víricas clínicas relevantes (40%) era mayor que la proporción de animales con cargas víricas subclínicas relevantes (37%). Esta relación fue cambiando dramáticamente en la última fase de la viremia (17-25 semanas de edad) debido a una reducción significativa de las infecciones de relevancia clínica. En los animales vacunados que fueron positivos en PCV2, las infecciones subclínicas fueron predominantes en todos los puntos temporales analizados (Figura 1B).

En resumen, el perfil de PCV2 en las zonas de estudio seleccionadas durante el tiempo del estudio se caracterizó por lo siguiente: a) un inicio de la viremia de PCV2 en la semana de estudio 9-10 que coincidió con el inicio de los síntomas clínicos y de las lesiones de PMWS, b) una elevada carga vírica en los animales tratados con placebo en la fase inicial de la viremia de PCV2, c) una reducción significativa de la duración de la viremia y del porcentaje de animales con cargas víricas clínicas y subclínicas relevantes en los animales vacunados en comparación con los animales tratados con placebo.

Presencia de infecciones concomitantes en los animales tratados con placebo

Los resultados obtenidos hasta el momento confirman el diagnóstico de PMWS en la población de estudio analizada, e indican que la vacunación contra PCV2 puede proteger considerablemente a los animales frente al PMWS. Este experimento de inmunización controlado con placebo permitió por tanto la evaluación de la hipótesis de que el PMWS causa una inmunosupresión subyacente en los animales. Se especuló que en el caso de una inmunodeficiencia asociada a PCV2, la frecuencia de coinfecciones tras el inicio de la viremia de PCV2 sería mayor en los animales tratados con placebo que en los animales vacunados. Por tanto, en una primera etapa se analizó con más detalle la exposición de los animales del estudio a organismos oportunistas. Ya que la monitorización de los síntomas clínicos había mostrado que los animales padecían predominantemente síntomas respiratorios, se decidió seleccionar muestras pulmonares de los animales muertos para el respectivo escrutinio de patógenos mediante PCR. En la Tabla 3 se presentan los resultados de los animales tratados con placebo únicamente, ya que se considera que son los que reflejan más estrechamente las condiciones de campo naturales.

Antes del inicio de la viremia de PCV2 (a las 3-8 semanas de edad), el único patógeno que se detectó en 2 de cada 5 muestras de pulmón de animales tratados con placebo fue el *Streptococcus suis*. En el inicio de la viremia de PCV2 (a las 9-10 semanas de edad), 1 de cada 8 muestras de pulmón de animales tratados con placebo era positiva en PCV2, mientras 4 de cada 8 muestras de pulmón analizadas fueron positivas en PRRSV. Otros patógenos detectados en baja cantidad tanto por sí solos como en combinación con estos dos patógenos fueron *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Streptococcus suis*. La mayor cantidad de patógenos coinfectantes se detectó en muestras de pulmón de animales tratados con placebo durante la fase aguda de la viremia de PCV2 (de 11 a 16 semanas de edad). Entre las 17 muestras de pulmón evaluadas como positivas para PCV2, 12 también resultaron positivas para PRRSV y 13 para *Mycoplasma hyorhinis*. Además, esporádicamente se detectaron coinfecciones con *Streptococcus suis* o *Pasteurella multocida*. Finalmente, en la última fase de la viremia (de 17 a 26 semanas de edad), las coinfecciones con *Mycoplasma hyopneumoniae* fueron predominantes (6 de cada 7 muestras positivas para PCV2), pero también se detectaron coinfecciones con *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Streptococcus suis*. Para el periodo completo de tiempo tras el inicio de la viremia (9-26 semanas de vida), sólo 2 de cada 22 muestras de pulmón de animales tratados con placebo fueron evaluados como positivos únicamente para PCV2. En la mayoría de las muestras de pulmón analizadas positivas para PCV2, se detectaron combinaciones de dos o tres organismos. Durante el transcurso del estudio se observó por tanto infección de PCV2 en asociación con varias infecciones respiratorias concomitantes. El inicio y el máximo de la viremia de PCV2 coincidió con los inicios y los máximos de las coinfecciones con PRRSV y *Mycoplasma hyorhinis*, mientras que la última fase de la viremia de PCV2 vino acompañada del inicio de una infección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Reducción de coinfecciones mediante vacunación contra PCV2

La comparación de la frecuencia de patógenos respiratorios detectados en muestras de pulmón no reveló diferencias importantes entre ambos grupos de tratamiento para el momento anterior al inicio de la viremia de PCV2 (datos no mostrados). Tras el inicio de la viremia de PCV2 (10-26 semanas de edad), la proporción de muestras de pulmón de animales vacunados que fueron evaluados como positivos para *Mycoplasma hyorhinis* y PRRSV se redujo en un 71% ($p = 0,0293$) y un 46% ($p = 0,2847$), respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1: Resultados del estudio de B05 BIVI 030

	Placebo		Vacuna		Reducción %
	%	(N)	%	(N)	
PCV2	92	(24/26)	55	(6/11)	40
PRRSV	50	(13/26)	27	(3/11)	46
<i>M. hyorhinis</i>	62	(16/26)	18	(2/11)	71
<i>M. hyopneumoniae</i>	23	(6/26)	45	(5/11)	-
<i>S. suis</i>	12	(3/26)	27	(3/11)	-
<i>P. multocida</i>	4	(1/26)	9	(1/11)	-
APP	8	(2/26)	0	(0/11)	100
<i>B. bronchiseptica</i>	0	(0/26)	0	(0/11)	0
<i>H. parasuis</i>	0	(0/26)	0	(0/11)	0

Además, esporádicamente se descubrieron muestras pulmonares de animales tratados con placebo positivas para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se observaron pequeñas diferencias en el número de muestras pulmonares positivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis* o *Pasteurella multocida* en un segundo estudio entre ambos grupos de tratamiento. Tal como se indica en la Tabla 2, estos patógenos estaban presentes en bajas frecuencias (*Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*) o aparecían en la fase final de la infección de PCV2 (*Mycoplasma hyopneumoniae*).

En otro estudio (estudio B05 BIVI 013), se observó una resistencia similar a patógenos concomitantes en los animales vacunados, tal como se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados del estudio de B05 BIVI 013

	Placebo		Vacuna		Reducción %
	%	(N)	%	(N)	
<i>P. multocida</i>	14	15/109	0	0/32	100
<i>H. parasuis</i>	3	3/109	0	0/32	100
Salmonella spp.	5	5/109	0	0/32	100
APP	4	4/109	0	0/32	100
<i>S. suis</i>	50	15/30	n.a.	n.a.	n.a.

Por lo tanto, bajo la influencia de la vacunación contra PCV-2, se redujo notablemente la frecuencia de infecciones de PCV2, así como la frecuencia de coinfecciones de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida*, PRRSV, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.

Asimismo, en otro estudio se observó una resistencia similar a *Mycoplasma hyopneumoniae* en los animales vacunados.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Clark T. Pathology of the Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome of Pigs. 1996 p. 22-5.
- [2] Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. J Virol Methods 2004 15 diciembre; 122 (2): 171-8.
- [3] Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: Diagnosis, Disease and Control: What do we know? 2006 16 Julio-2006 19 Julio; 2006.
- [4] Allan GM, McNeilly F, Ellis J, y col. PMWS: experimental model and co-infections. Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 165-8.
- [5] Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. Vet J 2004 Julio; 168 (1): 41-9.

- [6] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 2005 Mayo; 169 (3): 326-36.
- [7] Segales J, Domingo M, Chianini F, y col. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol* 2004 4 Febrero; 98 (2): 151-8.
- 5 [8] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 2001 Enero; 38 (1): 31-42.
- [9] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, y col. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 1999 Julio; 121 (1): 1-11.
- 10 [10] Allan GM, McNeilly F, Ellis J, y col. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 2000; 145 (11): 2421-9.
- [11] Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, y col. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 2001 Septiembre; 38 (5): 528-39.
- 15 [12] Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 2000 Mayo; 37 (3): 254-63.
- [13] Ostanello F, Caprioli A, Di FA, y col. Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol* 2005 1 Julio; 108 (3-4): 179-86.
- 20 [14] Rovira A, Balasch M, Segales J, y col. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 2002 Abril; 76 (7): 3232-9.
- [15] Darwich L, Segales J, Mateu E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 2004 Mayo; 149 (5): 857-74.
- 25 [16] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, y col. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* 2002; 15 (4): 567-82.
- [17] Batista L. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrom (PMWS) in Quebec, is it an emerging disease? 2006 4 Marzo-7 Marzo; 2006.
- 30 [18] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, y col. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 2003 7 Noviembre; 21 (31): 4565-75.
- [19] Caron J., Ouardani M., Dea S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (4): 1390-6.
- 35 [20] Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest* 1999 Mayo; 11 (3): 246-51.
- [21] Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *J Clin Microbiol* 2002 Agosto; 40 (8): 2922-9.
- 40 [22] Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 1998 Abril; 36 (4): 1096-100.
- [23] Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. *Vet Microbiol* 2000 12 Junio; 74 (4): 365-76.
- 45 [24] Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1999 Junio; 150 (5): 333-41.

- [25] Calsamiglia M, Pijoan C, Solano G, Rapp-Gabrielson V. Development of an oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay for detection of *Haemophilus*

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA Inc

<120> REDUCCIÓN DE INFECCIONES CONCOMINANTES EN CERDOS MEDIANTE
EL USO DE ANTÍGENO PCV2

<130> 10-0100

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta es una secuencia de Kozak modificada.

<400> 1

ccgccatg

8

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta es una secuencia Eco R1 recombinante.

<400> 2

gaattc

6

<210> 3

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

ES 2 389 229 T3

<400> 3

```

cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgcgcg cgcacctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcgc tctcccgcac cttcggatat actgtggaga 180
aggaaaaatg gcattctcaa caccgcctc tcccgcaact tcggatatac tgtgacgact 240
ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaagggtta ggttgaatc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
accatattgt aaactactcc tcccgccata caatccccc acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaacct gttcttgaact ccactattga ttacttccaa ccaataaaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggcataaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaacagc aaatacagcc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaatg aat 713

```

<210> 4

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 4

```

ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgcgcg cgcacctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcgc tctcccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
ctaccacagt cacaacgccc tcttgggggg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaagggtta ggttgaatc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
accatattgt aaactactcc tcccgccata caatccccc acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaacct gttcttgaact ccactattga ttacttccaa ccaataaaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggcataaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaacagc aaatacagcc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc 713

```

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 5

ES 2 389 229 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

ES 2 389 229 T3

210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

 <210> 6
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

 <400> 6

 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

ES 2 389 229 T3

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

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

<220>
 <223> Esta secuencia procede del circovirus porcino de tipo 2, marco de lectura abierto 2, junto con una parte del vector pGEM T-easy.

<400> 7

```

gcgggcgcgg gaattcgatc cgccatgaag tatccaagga ggcggtaccg cagaagaaga   60
caocgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcgcgc gccctggct cgtccacccc   120
cgccaccgct accggtggag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctcccgacc   180
ttcggatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgccct cctgggcggg ggacatgatg   240
agatttaata ttgaogactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc   300
tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggccotgctc ccccatcacc   360
cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag   420
gccacagccc taacctatga cccatattga aactactcct ccgcacatac aatcccccaa   480
cccttctcct accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat   540
tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggctga ggctacaaac ctctagaat   600
gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatagacca ggactacaat   660
atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaate ttaaagacc cccacttgaa   720
ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggccgc                                     756
  
```

ES 2 389 229 T3

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

<220>

<223> Este es el circovirus porcino tipo 2, construcción ORF-2, que incluye secuencias codificantes de baculovirus y pGEM T-easy.

<400> 8

```

aagotttact cgtaaagcga gttgaaggat catattttagt tgcgtttatg agataagatt    60
gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgctg tggcacaact atttacaatg cggccaagtt    120
ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacccttgc ggcccgagtt gtttgcgtac    180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaa ccotagtatt    240
ggagcaataa togatttaac caacacgtct aatattatg atggtgtgca ttttttgcgg    300
gocggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgcgcgc tgaagacata    360
gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccg catgtttggtg    420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgag atatttaatg    480
cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtoac    540
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc    600
tttaacaaat accttatcct attttcaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaaacta    660
tgcttcgctt gctccgttta gctttagcgc gatcagtgcc gttgttccaa tcgacggtag    720
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttaact ttatgctttt    780
ggttttccac gtaactcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgcgc tcgcgcgcca    840
cgcaacaac cggatgtttg cgttgtccg cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat    900
ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttgcctt    960
tcttttgcac ggtttcctgg aagccggtgt acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg   1020
tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgtccttgat ggcaacgatg cgttcaataa   1080
actcttgttt ttaacaagt tcctcggttt tttgcgccac caccgcttgc agcgcgcttg   1140
tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctccggtt   1200
gtttgatcgc gggatcgtac ttgcgggtgc agagcacttg aggaattact tctttcaaaa   1260
gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcagc   1320
cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaaatcag cgggtcgcgc cttttcaaga   1380
cgtgtttaga ggtagggccc ccattttgga tggctctgctc aaataacgat ttgtatttat   1440
tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaactg ttagcgcagc   1500
ccttggccac gaaccggacc tgttggtcgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat   1560
ctctccaaa tttaaattct ccaattttaa cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat   1620
tttgcaacaa ctattgtttt ttaacgcaaa ctaaaactat tgtggtaagc aataattaaa   1680
tatgggggaa catgcgcgcg tacaacactc gtogttatga acgcagacgg cgcggtctc   1740
  
```

ES 2 389 229 T3

ggcgcaagcg gctaaaaogt gttgocggtt caacgcggca aacatogcaa aagccaatag 1800
 tacagttttg atttgcataa taacggogag tttttaaatt atcttattta ataaatagtt 1860
 atgacgccta caactccccg cccgcggtga ctogctgcac ctogagcagt tccgttgacgc 1920
 ctctctccgt gtggccgaac acgtogagcg ggtggtcgat gaccagcggc gtgcocgacg 1980
 cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcca aggcacgtcg gcoctcaagt 2040
 ggcaatattg gcaaattoga aaatatatac agttgggttg tttgcgcata tctatogtgg 2100
 cgttgggcat gtacgtccga acgttgattt gcatgcaagc cgaaattaaa tcatgtcgat 2160
 tagtgcgatt aaaaogttgt acatcctogc ttttaateat gccgtcgatt aaatcgcgca 2220
 atcagatcaa gtgatcaaag tgtggaataa tgttttcttt gtattcccga gtcaagcgcg 2280
 gcgcgtatth taacaaaact gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc 2340
 aataatataa tatgtatogc acgtcaagaa ttaacaatgc gcccggtgtc gcatctcaac 2400
 acgactatga tagagatcaa ataaagocg aattaaatag cttgocgacg aacgtgcacg 2460
 atctgtgcac gcggtccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca 2520
 tgacccccgt agtgacaacg atcacgcca aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt 2580
 atgtcggatg cgttaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc 2640
 tggctgcgaga agccgcgaag tatggogaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt 2700
 agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atcccgatga ttttatgtat 2760
 aaattgaccc taactccata caccgtatcc tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc 2820
 ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccccccacta ttaatgaaat taaaaattcc 2880
 aattttaaaa aacgcagcaa gagaaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa 2940
 aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg 3000
 aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggccggtatgt acaggaagag gtttatacta 3060
 aactgttaca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaaagtgtg aaaaccgatg tttaatcaag 3120
 gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcatctttta 3180
 atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aatgaaaac tgtcgcacaag 3240
 ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata 3300
 aaacaattat aatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa 3360
 cattttagt attatctata attgaaaaag cgtagttata atcgtcgagg taatatttaa 3420
 aatcattttc aatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac 3480
 tagacgcctt gtcgtctctt tottcttatt cctctctttt ttcatttttc tctcataaaa 3540
 aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt 3600
 tgcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtttttc 3660
 tgtaatttac aacagtgcga tttctcggta gttctcggga gtgtgttgcct ttaattatta 3720
 aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt 3780
 acgcagcttc ttctagttca attacaccat tttttagcag cacoggatta acataacttt 3840
 ccaaaatggt gtacgaaccg ttaaacaaaa acagttccac tcccttttct atactattgt 3900
 ctgcgagcag ttgtttggtg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaaacataa 3960
 atcaaaaact ggaaatgtct atcaatataa agttgctgat atcatggaga taattaaaaa 4020
 gataaccatc tcgcaataaa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa 4080
 aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tccggcgcgg atcagatctg 4140
 cagcggcgcg gggaaatcga tccgcatga cgtatccaag gaggcgttac cgcagaagaa 4200

ES 2 389 229 T3

gacaccgccc ccgcagccat cttggccaga tctccgcgc ccgcccctgg ctcgteccacc 4260
cccgccaccg ctaccglttg agaaggaaaa atggcatctt caacaccgc ctctcccga 4320
ccttcggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctccctgggcg gtggacatga 4380
tgagatttaa tattgacgac tttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac 4440
cctttgaata ctacagaata agaagggtta aggttgaatt ctggccctgc tccccatca 4500
cccaggtga taggggagtg ggtccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa 4560
aggccacagc cctaacctat gaccatattg taaactactc ctcccggcat acaatcccc 4620
aaccttctc ctaccactcc cgttacttca caccacaacc tgttcttgac tccactattg 4680
attactcca accaaataac aaaaggaatc agctttggct gaggctacaa acctctagaa 4740
atgtggacca cgtaggcctc ggcactgcgt tcgaaaacag taaatacgc caggactaca 4800
atctccgtgt aaccatgtat gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccactg 4860
aacctaaga attctatcac tagtgaattc ggcgcgcgc gccgctccag aattctagaa 4920
ggtaccocgg atcctttctt gggaccocgc aagaaccaaa aactcactct cttcaaggaa 4980
atccgtaatg ttaaaccoga cacgatgaag cttgtcgttg gatggaaagg aaaagagttc 5040
tacagggaaa cttggaccoc cttcatggaa gacagcttcc ccattgttaa cgaccaagaa 5100
gtgatggatg ttttccttgt tgtcaacatg cgtcccacta gaccacaacc ttgttacaaa 5160
ttctggccc aacaocctct gcgttgcgac cccgactatg tacctcatga cgtgattagg 5220
atcgtcagc cttcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcacagcct ggctaagaag 5280
ggcggcggct gcccaataat gaacctcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagttc 5340
atcgatcgtg tcactcggga gaacttctac aagccatcg tttacatcgg taccgactct 5400
gctgaagagg aggaaattct ccttgaagtt tccctgggtg tcaaaagtaa ggagtttgc 5460
ccagacgcac ctctgttcac tggtcocggc tattaaaaca cgatacattg ttattagtac 5520
atatttaag cgttagatto tgtgcgttgt tgatttacag acaattgttg tacgtatttt 5580
aataattcat taaatttata atctttaggg tggatgtta gagcgaaaat caaatgatit 5640
tcagcgtctt tatatctgaa tttaaatatt aaatcctca tagatttgta aaataggttt 5700
cgattagttt caacaaggg ttgtttttcc gaacogatgg ctggactatc taatggattt 5760
tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtogatatto 5820
gtttgtgttt tgttttghta taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgtttttgta 5880
ttctttcat cactgtcgtt agtgtacaat tgactcgcgc taaacacggt aaataaagct 5940
tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattaggcc gattatcgtc gtctcccaa 6000
ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta 6060
attgtgtcgg ctaacacgtc ccgcatcaaa tttgtagttg agctttttgg aattatttct 6120
gattgcgggc gtttttgggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac 6180
acgttagaaa gcgatggtgc aggcgggtggt aacatttcag acggcaaatc tactaatggc 6240
ggcgggtggt gagctgatga taaatctacc atcgggtggag gcgcagcgg ggctggcggc 6300
ggagcgggag ggggaggtgg tggcgggtgat gcagacggc gtttaggctc aaatgtctct 6360
ttaggcaaca cagtccgac ctcaactatt gtactggttt cgggcgcctt ttttggtttg 6420
accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttotaatag cttccaacaa ttgttgtctg 6480
tcgtctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca 6540
gacatogatg gtggtggtgg tgggtggagc gctggaatgt taggcaacgg agaggtggt 6600
ggcggcggtg ccgcgggat aatttgttct ggttagttt gttcgcgcac gattgtggc 6660

ES 2 389 229 T3

accggcgcag gcgcgcgtgg ctgcacaacg gaaggctcgc tgccttcgagg cagcgccttgg 6720
 ggtggtggca attcaatatt ataattggaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt 6780
 gtaatttcgc tatcgtttac cgtgcgcgata tttacaacc gctcaatgta agcaattgta 6840
 ttgtaaagag attgtctcaa gctcgcgcga cgcgcgataac aagccttttc atttttacta 6900
 cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgcgta catgtatgct ttgttgcata 6960
 aaocgtcgtt ggcaagcctt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt 7020
 tgcctgtaaat gttgtttttg ataatttgcg ctccgcagc atcgacacgt tcaaaaaatt 7080
 gatcgcgac c aattttgttg ttccctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc 7140
 tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgtgcgcaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200
 actgcaaaaa cgtcaaaaact cgggtataaaa taatcaacgg gcgcctttggc aaaatatcta 7260
 ttttatcgca caagcccact agcaaatgtt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt 7320
 ttaacgctga cgaaataaaa gttcaccagc taatgagcga ccacccaaat tttataaaaa 7380
 tctattttaa tcacgggtcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgct 7440
 ccgatttatt tgaaacaacta caaatataag gcgagccttc gtaccaactt gttagcaata 7500
 ttattagaca gctgtgtgaa gcgcctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg 7560
 acataaaaact cgaaaaatgct ttatatctcg aagcacttga tcgcgtgtat gtttgcgatt 7620
 accgattgtg caaacacgaa aactcactta gcgtgcacga cggcaocgtt gagtatttta 7680
 gtcocgaaaa aattcgacac acaactatgc acgtttcgtt tgactcgtac gcgcgcgtgtt 7740
 aacatacaag ttgctaacgt aatcatggct atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 7800
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 7860
 atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgcctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 7920
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 7980
 tgggcgctct tcgccttcc cgtcactga ctgcctgcgc tcggtcgttc ggtgcggcg 8040
 agcggatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataaccg 8100
 aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt 8160
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccc cgcgcgacat cacaaaaatc gacgcctcaag 8220
 tcagaggtg gcgaaaccca caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8280
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaaccga tactctcgc ccttctctcc 8340
 ttogggaagc gtggcgcctt ctcatagctc acgctgtagg tactctcgtt cgtgttaggt 8400
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccagc gctgcgcctt 8460
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaacc ggtaagacac gaattatcgc cactggcagc 8520
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtagge ggtgctacag agttcttgaa 8580
 gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctcgtgaa 8640
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg 8700
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattaocgc agaaaaaag gatctcaaga 8760
 agatccttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtg aaacgaaaact caogttaagg 8820
 gatcttggct atgagattat caaaaaggat ctccacctag atccttttaa attaaaaatg 8880
 aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt 8940
 aatcagtgag gcacctatct cagcagatctg tctatctcgt tcatccatag ttgcctgact 9000
 ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 9060
 gataccgca gaccacgcct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9120

ES 2 389 229 T3

```

aagggcagag cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9180
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9240
tgctacaggc atcgtgggtg caagctcgtc gtttgggatg gcttcattca gctccggttc 9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 9360
cggctctccg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggtc 9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgettttctg tgactgggtga 9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 9540
gtcaatacgg gataatacgg cgcacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 9600
acgtttctcg ggcgaaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttogatgta 9660
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaa ggaaggcaaa atgcgcgaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg 9780
aatactcata ctcttccttt tccaatatta ttgaagcatt taccagggtt attgtctcat 9840
gagcggatag atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcagagggc cctttcgtct cgcgcgttcc ggtgatgacg gtgaaaacct 10020
ctgacacatg cagctcccg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag 10080
acaagcccg cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg 10200
cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga 10260
agggcgatcg gtgcgggctt ctctgcatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 10320
aaggcgatta agttgggtaa cgcagggtt tcccagtc cgcagttgta aaacgacggc 10380
cagtgcc                                     10387

```

```

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

```

```

<400> 9

```

```

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

```

ES 2 389 229 T3

<212> PRT

<213> Porcine circovirus

<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

<210> 11

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Esta es una secuencia de aminoácidos para el circovirus porcino tip
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

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

ES 2 389 229 T3

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

- 5 1. Una composición inmunogénica que consiste en una proteína ORF-2 del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) y uno o más soportes aceptables en veterinaria para uso en la reducción de la infección concomitante provocada por PCV-2 y uno o más patógenos virales, bacterianos y/o fúngicos diferentes al PCV2 en cerdos.
- 10 2. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uno o más soportes aceptables en veterinaria se selecciona del grupo que consiste en disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que demoran la adsorción.
- 15 3. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la infección concomitante está provocada por un patógeno vírico.
- 20 4. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada porque la infección concomitante está provocada por el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRS).
- 25 5. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la infección concomitante está provocada por un patógeno bacteriano.
- 30 6. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la infección concomitante está provocada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyrhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.
- 35 7. Proteína ORF-2 del PCV-2 en calidad de antígeno, para la reducción de la infección concomitante provocada por PCV-2 y uno o más patógenos virales, bacterianos y/o fúngicos diferentes al PCV2 en cerdos.
- 40 8. La proteína ORF-2 del PCV-2 en calidad del antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque la infección concomitante está provocada por un patógeno vírico.
9. La proteína ORF-2 del PCV-2 en calidad del antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque la infección concomitante está provocada por el virus del PRRS.
10. La proteína ORF-2 del PCV-2 en calidad del antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque la infección concomitante está provocada por un patógeno bacteriano.
11. La proteína ORF-2 del PCV-2 en calidad del antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada porque la infección concomitante está provocada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyrhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.

Figura 1A:

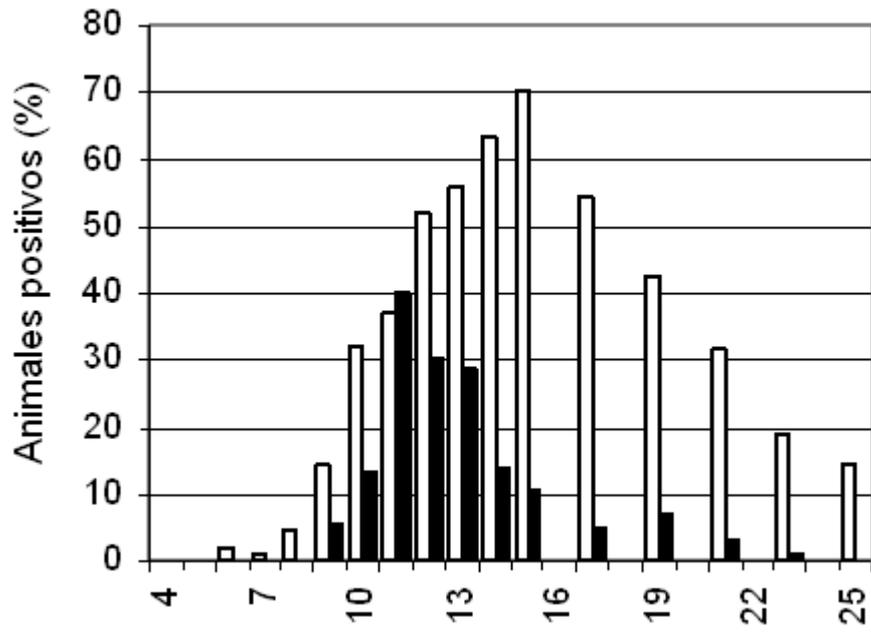


Figura 1B:

