

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 117**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2008** **E 08708877 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013** **EP 2114447**

54 Título: **Prevención y tratamiento de PCVD subclínica**

30 Prioridad:

**13.02.2007 EP 07102250**

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

**13.12.2013**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.  
(100.0%)  
2621 NORTH BELT HIGHWAY  
ST. JOSEPH MO 64506-2002, US**

72 Inventor/es:

**FACHINGER, VICKY;  
ELBERS, KNUT;  
KIXMOELLER, MARION;  
ORVEILLON, FRANCOIS-XAVIER;  
FREIIN VON RICHTHOFEN, ISABELLE y  
LISCHEWSKI, AXEL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 434 117 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

Prevención y tratamiento de PCVD subclínica

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al uso de una composición inmunogénica que comprende un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) para la prevención y tratamiento de infecciones subclínicas (crónicas) por PCV2 en animales, es decir, en cerdos.

Descripción de la técnica anterior

15 El circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) es un virus pequeño (17 - 22 nm de diámetro), icosaédrico, de ADN sin cubierta, que contiene un genoma circular de cadena sencilla. El PCV2 comparte una identidad de secuencia de aproximadamente 80% con el circovirus porcino de tipo 1 (PCV1). Sin embargo, a diferencia del PCV1, que generalmente no es virulento, la infección de suidos con PCV2 se ha asociado recientemente con varios síndromes patológicos que se han denominado colectivamente Enfermedades por Circovirus Porcino (PCVD) (también denominadas Enfermedades asociadas con el Circovirus Porcino (PCVAD)) (Allan *et al*, 2006, *IPVS Congress*). El síndrome de adelgazamiento multisistémico posterior al destete (PMWS) se considera generalmente la manifestación clínica más importante de la PCVD (Harding *et al*, 1997, *Swine Health Prod*; 5: 201-203; Kennedy *et al*, 2000, *J. Comp. Pathol.*; 122: 9-24). Otros trastornos potencialmente relacionados referidos en la bibliografía incluyen el complejo respiratorio porcino (PRDC), el síndrome de dermatopatía y nefropatía porcino (PDNS), la insuficiencia reproductora, la enteritis granulomatosa y, potencialmente, los temblores congénitos (CT-All) y la miocarditis perinatal (Chae, *Veterinary J.*, 2005, 169: 326-336).

20 La PCVD afecta a cerdos entre 5-22 semanas de edad. Clínicamente, la PCVD se caracteriza por un adelgazamiento, palidez de la piel, un desarrollo poco vigoroso, insuficiencia respiratoria, diarrea, ícterus e ictericia. En algunos suidos afectados, resultará evidente una combinación de todos los síntomas, mientras que otros suidos afectados solamente tendrán uno o dos de estos síntomas (Muirhead, 2002, *Vet. Rec.*; 150: 456). La tasa de mortalidad para suidos infectados con el PCV2 puede aproximarse a 50%. Durante la necropsia, también aparecen lesiones microscópicas y macroscópicas en varios tejidos y órganos, siendo los órganos linfoides el sitio más común para las lesiones (Allan y Ellis, 2000; *J Vet. Diagn. Invest.*, 12: 3-14). Se ha observado una fuerte correlación entre la cantidad de ácidos nucleicos o antígenos del PCV2 y la gravedad de las lesiones linfoides microscópicas (Brunborg, 2004). Además, también se ha encontrado una correlación entre la cantidad de ácido nucleico o antígeno en la sangre y la gravedad de los síntomas clínicos (Brunborg, 2004; Liu, 2000; Olvera, 2004). Se ha demostrado que los cerdos afectados por PCVD presentan cargas víricas mayores que 10<sup>6</sup> equivalentes genómicos por ml.

35 El documento WO 2006/072065 A2 describe el uso médico de una proteína recuperada que ha sido expresada por el marco de lectura abierto 2 de PCV2 en células infestadas con un virus que contiene dicho marco de lectura abierto 2. Los Ejemplos 4 y 5 (páginas 54-106) del documento WO 06/072065 A2 muestran ensayos de eficacia de siete y ocho vacunas candidato contra PCV2, respectivamente, en lechones derivados por cesárea y desprovistos de calostro (CDGD), en donde los títulos IFA de PCV2 de las cerdas eran  $\leq$  1000 y el estado serológico de las cerdas era de una piara PRRS-negativa.

40 El documento US 6.703.023 B1 describe un protocolo de vacunación, en el que se utilizaron lechones con la enfermedad de la pérdida de peso de lechones (PWD) para evaluar la eficacia de la composición de la vacuna, que comprende fragmentos nucleicos de circovirus de tipo B de PWD (Ejemplo 5 del documento US 6.703.023 B1). Tal como se describe en dicho documento, se demostró que los animales que recibieron una primera y una segunda inyección de plásmido pcDNA3ORF1+, plásmido pcDNA3ORF2+ y plásmido GMCSF+ y una tercera inyección de células transformadas mediante baculovirus recombinantes BAC ORF1+ y BAC ORF2+ no exhibían hipertermia. Adicionalmente, estos animales no experimentaban una disminución en su desarrollo, siendo los dmgs equiparables a los de animales testigo no infectados, y no exhibían síntoma clínico particular alguno.

50 A diferencia de las manifestaciones de enfermedad clínicamente evidentes de la infección por PCV2, se cree que las infecciones subclínicas por PCV2 están presentes en los animales que están infectados con el PCV2 pero son clínicamente asintomáticos. En general, existe una relación entre estas formas de infección por el PCV2, ya que las infecciones subclínicas pueden evolucionar fácilmente a PCVD y ya que los animales convalecientes pueden permanecer infectados de forma persistente (crónica) (véase la figura 1).

60 Observaciones recientes han demostrado que las infecciones subclínicas por PCV2 son acontecimientos frecuentes. La existencia de infecciones subclínicas ha sido demostrada tanto en estudios experimentales como en estudios de

campo. Mediante estudios de laboratorio se puede demostrar que la infección por PCV2 en cerdos individuales no está siempre asociada con signos o lesiones clínicas (Harms et al., 2001, Vet. Pathol., 38:528-539). Además, distintos estudios de campo han demostrado que la incidencia de piaras seropositivas infectadas por el PCV2 es mayor que la incidencia de piaras afectadas por la PCVD (Olvera et al., 2004, J. Virol. Methods, 117: 75-80). A menudo las piaras que han padecido un brote agudo de PCVD permanecen infectadas con el PCV2 sin mostrar ningún signo clínico evidente. Según la bibliografía, esta forma de infección subclínica (persistente) en una piara también se denomina infección "crónica" (Burch D., 2006, *Pig International*).

No se conoce, si es que existe, el impacto económico del PCV2 en piaras infectadas subclínicamente y nunca ha sido descrito hasta ahora. En particular, no se conocía y nunca se había dado ninguna indicación sobre si los casos subclínicos de infecciones por el PCV2 tienen algún impacto sobre el rendimiento del crecimiento de los animales o, en general, sobre la salud global de los animales afectados.

En la patente de EE.UU. nº 6.703.023 se describen estrategias para tratar las infecciones por PCV2 basadas en una vacuna de ADN. 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. Sin embargo, no se ha mostrado ningún dato de eficacia. En el documento WO06/072065 se ha mostrado una vacuna de subunidades eficaz basada en la ORF-2. Se pretende que estas dos vacunas se utilicen para la vacunación/tratamiento de suidos o cerdos mayores de 3 semanas de edad. Ninguna de estas vacunas ha sido nunca descrita para la profilaxis y el tratamiento de animales infectados subclínicamente con el PCV2. Además, no se ha descrito que tales vacunas confieran inmunidad frente a la infección del PCV2 en grupos de animales infectados subclínicamente ni que aumenten el rendimiento del crecimiento.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Diferentes formas de infecciones por el PCV2.

Figura 2: Tasa de mortalidad y aumento de peso diario medio durante el engorde en la granja de estudio antes y después del inicio del estudio.

Figura 3: Desarrollo de la diferencia relativa en el peso corporal (IVP-CP) y de la carga viral media (log10) a lo largo del estudio.

Figura 4: Comparación del porcentaje de animales con una carga viral  $> 10^6$  equivalentes genómicos/ml de suero en ambos grupos de tratamiento.

Figura 5: Comparación del porcentaje de animales con una carga viral de  $10^4$ - $10^6$  equivalentes genómicos/ml de suero en ambos grupos de tratamiento.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las infecciones por PCV2 evidentes clínicamente se asocian con varios síndromes patológicos. Dependiendo de la forma de expresión de la enfermedad relacionada con el PCV2, los signos clínicos de una infección por PCV2 puede ser uno o más de los siguientes síntomas: a) una tasa de mortalidad aumentada significativamente (4-20% mayor), b) un aumento significativo en la frecuencia de cerdos retrasados (5-50% mayor) y c) otros signos clínicos evidentes, tales como síntomas respiratorios, diarrea, palidez de la piel, un desarrollo poco vigoroso (tasa de morbilidad de 4-60%). Además, títulos virales elevados de más de  $10^6$  o  $10^7$  por ml de suero o tejido son un resultado característico en la mayoría de los animales con signos agudos de PCVD. Junto con esta infección aguda por PCV2, las infecciones subclínicas por PCV2 caracterizadas por una tasa de morbilidad baja o nula se hacen cada vez más visibles. En algunos casos una situación de una infección aguda por PCV2 puede evolucionar hacia una infección por PCV2 subclínica. Sin embargo, las infecciones subclínicas también pueden producirse sin ningún signo previo de infección aguda por PCV2.

Sorprendentemente, se ha encontrado que una infección subclínica por PCV2 tiene un impacto significativo sobre parámetros de rendimiento de cerdos aparentemente saludables, en particular el rendimiento del crecimiento de los cerdos. Incluso si los animales infectados subclínicamente no desarrollan síntomas clínicos típicos que permitan la identificación de la PCVD o muestran sólo una morbilidad baja, estos animales están afectados significativamente por la infección subclínica por PCV2. Las infecciones subclínicas de cerdos con el PCV2 producen una pérdida significativa en el aumento de peso (por ejemplo, véase el ejemplo 3). Como ya se ha mencionado, hasta ahora no se ha dado en la técnica anterior ninguna evidencia de que las infecciones subclínicas por PCV2 tengan ningún impacto sobre la salud, en particular sobre el rendimiento del crecimiento, en cerdos.

Sin embargo, también se ha descubierto sorprendentemente que la reducción en el aumento de peso producido por una infección subclínica por PCV2 puede reducirse mediante el tratamiento/vacunación de los animales que han

sido infectados subclínicamente con el antígeno del PCV2 (por ejemplo, véase el ejemplo 3). Por lo tanto, no solo se ha demostrado que las infecciones subclínicas por PCV2 afectan al rendimiento del crecimiento de los cerdos, sino que también se ha evidenciado que dicho impacto negativo puede reducirse significativamente mediante el tratamiento/vacunación de los animales con antígeno del PCV2. En otras palabras, aunque el fenómeno de las

- 5       – la infección subclínica por PCV2, observada ocasionalmente en el campo, tiene un impacto significativo sobre el rendimiento del crecimiento de los cerdos;
- la vacunación con antígeno del PCV2 de los cerdos o piaras afectados subclínicamente puede reducir significativamente el impacto negativo de esta infección subclínica por PCV2.

10       Por tanto, según un aspecto, la presente invención proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2 en un animal o un grupo de animales, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesite dicha administración.

15       Una "infección subclínica por PCV2", tal como se usa en la presente memoria se caracteriza por i) una carga viral en un animal individual que permanece durante la vida entera por debajo de  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero, ii) una proporción baja de animales positivos frente al PCV2 en un grupo o piara con títulos víricos de más de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, iii) una persistencia del virus en un grupo o piara de al menos 6 semanas, preferiblemente al menos 8 semanas, más preferido de al menos 10 semanas y lo más preferido de al menos 12 semanas, iv) la ausencia de síntomas clínicos típicos en un animal positivo frente al PCV2, v) una tasa de morbilidad nula o solo baja en un grupo de animales o una piara de animales positivos frente al PCV2 y/o vi) una tasa de mortalidad baja en un grupo o piara de animales positivos frente al PCV2.

25       La expresión "proporción baja de animales positivos frente al PCV2" tal como se usa en el punto ii) anterior significa que menos de 20%, preferiblemente menos de 15%, incluso más preferiblemente menos de 10%, incluso más preferiblemente menos de 8%, incluso más preferiblemente menos de 6%, incluso más preferiblemente menos de 4%, el más preferido menos de 3% de los animales positivos frente al PCV2 en un grupo de animales o una piara tiene títulos víricos de más de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero. En otras palabras, la expresión "baja proporción de animales positivos frente al PCV2 en un grupo o una piara con títulos víricos de más de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero" también significa que más de 80%, preferiblemente más de 85%, incluso más preferiblemente más de 90%, incluso más preferiblemente más de 92%, incluso más preferiblemente más de 94%, incluso más preferido más de 96%, el más preferido más de 97% de los animales positivos frente al PCV2 de un grupo de animales o una piara tienen títulos víricos de menos de  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero.

35       La expresión "positivos frente al PCV2", tal como se usa en la presente memoria, significa, pero sin limitarse a ello, un animal que comprende una cantidad detectable de equivalente genómicos (= copias víricas) de PCV2 en una muestra (1 ml de suero o 1 mg de tejido). Una cantidad detectable de equivalente genómicos del PCV2 significa que los equivalentes genómicos del PCV2 se pueden detectar mediante un análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una muestra se considera positiva en el análisis por PCR si dos muestras independientes dan a un resultado de PCR positivo en dicho análisis.

45       Métodos para la cuantificación del PCV2 mediante un ensayo por PCR son muy conocidos en la técnica. De hecho, la cuantificación de los equivalentes del genoma del PCV2 se hace/hizo mediante el método descrito en Brunborg *et al.*, 2004; *J. Virol. Methods* 122: 171-178. Para la amplificación del PCV2 se usaron/usan iniciadores PCV2-84-1265U21 y PCV2-84-1319L21. Dicho método debe considerarse como ensayo de referencia en cualquier caso de duda.

50       La expresión "persistencia vírica", tal como se usa en la presente memoria, significa que el animal infectado tiene una carga vírica de al menos  $10^4$  copias víricas de PCV2 por ml de suero durante dicho periodo de tiempo, es decir durante al menos 6 semanas o mayor como se ha definido anteriormente.

55       La expresión "ausencia de síntomas clínicos típicos en animales positivos frente al PCV2", tal como se usa en la presente memoria, significa la ausencia de cualquier síntoma clínico evidente asociado con una infección clínica por PCV2 evidente que permita una identificación precisa y sin ninguna duda de una infección por PCV2 solo mediante su apariencia clínica típica. Dichos síntomas clínicos son los conocidos como PCVD, en particular palidez de la piel, desarrollo poco vigoroso, insuficiencia respiratoria, diarrea, ícterus o ictericia.

60       La expresión "tasa de morbilidad baja", tal como se usa en la presente memoria, es un indicador de la ausencia de signos clínicos que permitan la identificación de una infección aguda por PCV2 por su apariencia clínica. Por lo tanto es un indicador de la existencia de una infección subclínica por PCV2. La expresión "tasa de morbilidad baja", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al porcentaje de animales con un estado general de salud alterado. Un estado general de salud alterado, tal como se usa en la presente memoria, se define como la presencia

de uno o más signos clínicos relacionados con la PCVD, tales como la presencia de cerdos retrasados (definidos en la presente memoria como animales con un peso corporal 25% menor que el peso medio de su grupo de animales de la misma edad), palidez de la piel, desarrollo poco vigoroso, insuficiencia respiratoria, diarrea, ícterus o ictericia. Por lo tanto, la "morbilidad baja", tal como se usa en la presente memoria, significa que menos de 25%,  
5 preferiblemente menos de 20%, más preferido menos de 15%, incluso más preferido menos de 12%, incluso más preferido menos de 10%, incluso más preferido menos de 8%, incluso más preferido menos de 6%, lo más preferido menos de 4% de los animales de un grupo de animales o piara muestra uno o más síntomas de PCVD, preferiblemente muestran la existencia de cerdos retrasados como se ha definido anteriormente, palidez de la piel, desarrollo poco vigoroso, insuficiencia respiratoria, diarrea, ícterus o ictericia.

10 La expresión "tasa de morbilidad nula", tal como se usa en la presente memoria, significa que menos de 1% de los animales positivos frente al PCV2 de un grupo de animales o piara muestran uno o más de los síntomas clínicos de la PCVD, preferiblemente muestran la existencia de cerdos retrasados como se ha definido anteriormente, palidez de la piel, desarrollo poco vigoroso, insuficiencia respiratoria, diarrea, ícterus o ictericia.

15 La expresión "tasa de mortalidad baja", tal como se usa en la presente memoria, significa, pero sin estar limitado a ello, que la tasa de mortalidad es de menos de 20%, preferiblemente de menos de 15%, más preferido de menos de 12%, incluso más preferido de menos de 10%, incluso más preferido de menos de 8%, incluso más preferido de menos de 6%, el más preferido de menos de 4%, de los animales positivos frente al PCV2 en un grupo de animales o una piara.

20 La expresión "que necesita de dicha administración" o "que necesita dicho tratamiento de administración", tal como se usa en la presente memoria, significa que la administración/tratamiento está asociado con la prevención de la salud o cualquier otro efecto medicinal positivo sobre la salud de los animales que reciben el antígeno del PCV2.

25 Según la descripción, se da un caso subclínico de una infección por PCV2 cuando son aplicables al menos: criterio i) "una carga vírica en un animal individual que permanece durante la vida completa por debajo de  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero", criterio ii) "una proporción baja de animales positivos frente al PCV2 en un grupo o piara con títulos víricos de más de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero" o criterio iii) "una persistencia vírica en un grupo o piara de al menos 6 semanas, preferiblemente de al menos 8 semanas, más preferido de al menos 10 semanas, lo más preferido de al menos 12 semanas", como se han mencionado anteriormente. Más preferiblemente, un caso subclínico de infección por PCV2 se da cuando son aplicables los criterios i) y ii) como se han mencionado anteriormente.

35 En los casos en los que el criterio i) y/o el criterio ii) se combinan con el criterio iii) "una persistencia vírica en un grupo o piara de al menos 6 semanas, preferiblemente de al menos 8 semanas, más preferido de al menos 10 semanas, lo más preferido de al menos 12 semanas", o en cualquiera de los otros casos que comprenden el criterio iii) como se ha definido anteriormente, se considera que la infección subclínica es una "infección subclínica crónica por PCV2".

40 Según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, en la que la infección subclínica por PCV2 se caracteriza por una carga vírica en un animal individual de menos de  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende antígeno del PCV2 a dicho animal que necesita dicha administración. Preferiblemente, dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza además por la presencia de menos de 20% de los animales con más de  $10^6$ ,  
45 preferiblemente más de  $10^7$ , copias víricas de PCV2 por ml de suero en un grupo de animales o una piara y/o una persistencia vírica en dicho grupo o piara de al menos 6 semanas, preferiblemente de al menos 8 semanas, más preferido de al menos 10 semanas, lo más preferido de al menos 12 semanas. Más preferiblemente, dicha infección subclínica se caracteriza además por la ausencia de cualquier signo clínico en un animal individual positivo frente al PCV2 como se ha definido anteriormente, una tasa de morbilidad baja o nula como se ha definido anteriormente y/o una tasa de mortalidad baja como se ha definido anteriormente.

50 Según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, en la que la infección subclínica por PCV2 se caracteriza por una carga vírica en un animal individual que permanecerá durante la vida completa por debajo de  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero en ausencia de cualquier administración de antígeno del PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a dicho animal que necesita dicha administración. Preferiblemente, dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza además por la presencia de menos de 20% de los animales con más de  $10^6$ ,  
55 más de  $10^7$ , copias víricas de PCV2 por ml de suero en un grupo de animales o una piara y/o una persistencia vírica en dicho grupo o piara de al menos 6 semanas, preferiblemente de al menos 8 semanas, más preferido de al menos 10 semanas, lo más preferido de al menos 12 semanas. Más preferiblemente, dicha infección subclínica se

caracteriza además por la ausencia de cualquier signo clínico en un animal individual positivo frente al PCV2 como se ha definido anteriormente, una tasa de morbilidad baja o nula como se ha definido anteriormente y/o una tasa de mortalidad baja como se ha definido anteriormente.

5 Según un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, en la que la infección subclínica por PCV2 se caracteriza por la presencia de menos de 20% de animales con más de  $10^6$ , preferiblemente más de  $10^7$ , copias víricas de PCV2 por ml de suero en un grupo de animales o una piara, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a dicho animal que  
10 necesita dicha administración. Preferiblemente, dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza además por una persistencia vírica en dicho grupo o piara de al menos 6 semanas, preferiblemente de al menos 8 semanas, más preferido de al menos 10 semanas, el más preferido de al menos 12 semanas. Más preferiblemente, dicha infección subclínica se caracteriza además por la ausencia de cualquier signo clínico en un animal individual positivo frente al PCV2 como se ha definido anteriormente, una tasa de morbilidad baja o nula como se ha definido anteriormente y/o  
15 una tasa de mortalidad baja como se ha definido anteriormente.

Según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, en la que la infección subclínica se caracteriza por una persistencia vírica en un grupo de animales positivos frente al PCV2 o piara de al menos 6 semanas, preferiblemente de al menos 8  
20 semanas, más preferido de al menos 10 semanas, el más preferido de al menos 12 semanas. Preferiblemente, dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza además por la ausencia de cualquier signo clínico en un animal individual positivo frente al PCV2 como se ha definido anteriormente, una tasa de morbilidad baja o nula como se ha definido anteriormente y/o una tasa de mortalidad baja como se ha definido anteriormente.

25 Según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, en que la infección subclínica por PCV2 se caracteriza por la ausencia de cualquier signo clínico en un animal individual positivo frente al PCV2 como se ha definido anteriormente, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha  
30 administración. Preferiblemente, dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza además por una tasa de morbilidad baja o nula como se ha definido anteriormente y/o una tasa de mortalidad baja como se ha definido anteriormente. Más preferiblemente, dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza además por una carga vírica en un animal individual que permanece durante la vida entera por debajo de  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero y/o una proporción baja de animales positivos frente al PCV2 en un grupo o una piara con títulos víricos de  
35 más de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero.

Según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, en que la infección subclínica por PCV2 se caracteriza por una morbilidad baja o nula en un grupo de animales o una piara, preferiblemente de menos de 25% o inferior como se ha  
40 definido anteriormente, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración. Preferiblemente, dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza además por una carga vírica en un animal individual que permanece durante la vida entera por debajo de  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero y/o una proporción baja de animales positivos frente al PCV2 en un grupo o una piara con títulos víricos de  
45 más de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero.

Según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, en que la infección subclínica por PCV2 se caracteriza por una tasa de mortalidad baja, como se ha definido en la presente memoria, preferiblemente de menos de 20% o inferior,  
50 que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración. Preferiblemente, dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza además por una carga vírica en un animal individual que permanece durante la vida entera por debajo de  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero y/o una proporción baja de animales positivos frente al PCV2 en un grupo o una piara con títulos víricos de más de  $10^6$   
55 copias genómicas por ml de suero.

La administración de una cantidad eficaz de un antígeno del PCV2 a animales o un grupo de animales que están infectados subclínicamente con el PCV2 produce un aumento de peso aumentado de dichos animales durante el engorde, una reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, una reducción de la excreción nasal del virus y/o una reducción de la duración de la viremia.  
60

Por tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un método para la reducción de la pérdida de aumento de peso en animales infectados subclínicamente con el PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesite dicha administración. Preferiblemente, el aumento de peso medio aumenta en las semanas 10 a 22 de edad en más de 1,5 kg en comparación con los animales no vacunados. La expresión "durante el engorde", tal como se usa en la presente memoria, significa, pero sin limitarse a ellas, las semanas 1 a 36 de edad, preferiblemente las semanas 10 a 28 de edad, de dichos animales.

La expresión "en animales infectados subclínicamente con el PCV2", tal como se usa en la presente memoria, significa el animal individual que ha sido infectado subclínicamente con el PCV2, pero también se refiere a un grupo de animales en el que la mayoría de los animales de dicho grupo ha sido infectado subclínicamente con el PCV2. Por lo tanto, la expresión "en animales infectados subclínicamente con el PCV2" debe entenderse como i) "en animales infectados subclínicamente con el PCV2" y ii) "en animales de una piara en la que dicha piara está infectada subclínicamente con el PCV2".

Según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con el PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración. Preferiblemente, el número de animales con  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero se puede reducir debido a la vacunación con un antígeno del PCV2 hasta menos de 30%, preferiblemente menos de 20%, incluso más preferiblemente menos de 10%, lo más preferiblemente menos de 5%, mientras que en el grupo de control no vacunado de animales infectados subclínicamente (con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero) más de 40% desarrollaron títulos de PCV2 con  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero.

Según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un método para la reducción del número de animales con una carga vírica clínicamente relevante (por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero) en un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con el PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración. Preferiblemente, el número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero se puede reducir mediante la vacunación con un antígeno del PCV2 a menos de 10%, preferiblemente a menos de 5%, incluso más preferiblemente a menos de 4%, incluso más preferiblemente a menos de 3%, incluso más preferiblemente a menos de 2%, lo más preferiblemente a menos de 0,5%.

Según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un método para la reducción de la excreción nasal del virus y la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con el PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesite dicha administración. Como se ha descrito anteriormente, la vacunación/tratamiento de animales infectados subclínicamente con PCV2 produjo un acortamiento de la fase virémica en comparación con los animales de control no vacunados. El acortamiento medio del tiempo de duración de la viremia fue de 17 días en comparación con los animales de control no vacunados de la misma especie. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesite dicha administración, en el que el tratamiento o profilaxis produce un acortamiento de la fase de viremia de 5 días o más, preferiblemente de 6 días o más, aún más preferiblemente de 7 días o más, aún más preferiblemente de 8 días o más, aún más preferiblemente de 9, aún más preferiblemente de 10, aún más preferiblemente de 12, aún más preferiblemente de 14, lo más preferiblemente de más de 16 días en comparación con los animales de un grupo de control no tratado de la misma especie.

El término "antígeno", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos que produce una respuesta inmunológica en un huésped. 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 epítopes y, así, provoca la respuesta inmunológica en un huésped. Dichos fragmentos pueden identificarse utilizando cualquier técnica de representación en mapas de epítopes, 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 epítopes 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. Dichas técnicas son conocidas 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 epítopes 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 poliepitopes, epítopes 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 inmunológica" incluye pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas, 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 términos 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 inactivado.

Por lo tanto, según otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, un método para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicho tratamiento, en la que la composición inmunogénica es una composición inmunogénica de subunidades o una composición que contiene PCV2 completo matado o atenuado y/o inactivado.

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, derivado u homólogo 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. En el contexto de la invención, la 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 el polipéptido 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 aislados de PCV2 y, por lo 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 entenderán que esta secuencia podría variar tanto como 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 como 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 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% de la inmunidad protectora, en comparación con la proteína ORF-2 del PCV2, codificada por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, como se proporciona en el documento WO06/072065.

Por lo tanto, según otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, un método para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  y  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración, en la que la el antígeno del PCV2 es una proteína ORF-2 del antígeno del PCV2 que presenta al menos 70%, preferiblemente 80%, incluso más preferiblemente 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. Preferiblemente, dicha ORF-2 del PCV2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 5 del documento WO06/072065.

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 los fragmentos, tendrán al menos 5, preferiblemente 8, más preferiblemente 10, más preferiblemente al menos 15 y aún más preferiblemente al menos 19 aminoácidos contiguos procedentes del polipéptido ORF-2 del 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.

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 deleciones 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 deleciones 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 lo tanto, según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, un método para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^5$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína ORF-2 del PCV2 a un animal que necesita dicha administración, en la que 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 5, preferiblemente 8, incluso más preferiblemente 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.

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  $\mu\text{g}$  de antígeno/ml de la composición inmunogénica final ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y lo más preferible de aproximadamente 1,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Según otro aspecto, el nivel de inclusión del antígeno ORF-2 del PCV es al menos 0,2  $\mu\text{g}/\text{proteína ORF-2 del PCV2}$ , tal como se ha descrito anteriormente, por dosis de la composición antigénica final ( $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ), más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ , y lo más preferible aproximadamente 1,6  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ .

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. Los 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. Brevemente, 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 inactiva mediante cualquier método convencional, preferiblemente utilizando etilenimina binaria, que luego se neutraliza para detener el proceso de inactivación.

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 lo tanto, según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, un método para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicho tratamiento, en la que el antígeno del PCV2 es el ORF-2 del PCV2 recombinante, preferiblemente un ORF-2 del PCV2 expresado por 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 de 1  $\mu$ m.

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 inactivante para inactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente la BEI, en la que aproximadamente 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor de 1  $\mu$ m. Preferiblemente, la BEI está presente en concentraciones eficaces para inactivar 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 inactivante para inactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor de 1  $\mu$ m. Preferiblemente, si el agente inactivante 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). 18ª ed. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes aceptables desde un punto de vista veterinario. Tal como se utiliza en la presente memoria, "un vehículo aceptable desde un 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 retardan 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.

5 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 para uso en la presente invención pueden incluir diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes. Los diluyentes pueden incluir agua, disolución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetracético, entre otros.

15 "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 sorbitano, 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.). JohnWiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd *et al.*, *Vaccine* 15: 564-570 (1997).

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

35 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 alqueno. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialquenoil-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 alilsacarosa 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.

50 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.

55 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.

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 en la presente memoria contiene la proteína ORF-2 del PCV2 recuperada del sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, en la que dichas células se infectaron con un vector vírico recombinante que contenía ADN de ORF-2 del PCV2 y que expresaban la proteína ORF-2 del PCV2, y en la que dicho cultivo celular se trató con aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM de BEI, preferiblemente con aproximadamente 5 mM de BEI, para inactivar el vector vírico, 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.

También se describe una composición inmunogénica para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, reducir la excreción nasal del virus, reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, en la que dicha composición inmunogénica 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 inactivante para inactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente BEI, v) un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, preferiblemente tiosulfato de sodio 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) tienen un tamaño menor de 1  $\mu$ m.

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.

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  $\mu$ g 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  $\mu$ m, y el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a aproximadamente 6,5 a 7,5.

Las composiciones inmunogénicas pueden además incluir uno o más de otros agentes inmunomoduladores, tales como, 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  $\mu$ g a aproximadamente 2.000  $\mu$ g de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 250  $\mu$ g/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  $\mu$ g/ml a aproximadamente 60  $\mu$ g/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30  $\mu$ g/ml de antibióticos.

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 inactivante para inactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente BEI, v) un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, preferiblemente tiosulfato de sodio 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 de 1  $\mu$ m.

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, EE.UU.), CircoVac® (Merial SAS, Lyon, Francia), CircoVent (Intervet Inc., Millsboro, DE, EE.UU.) o Suvaxyn PCV-2 One Dose® (Fort Dodge Animal Health, Kansas City, KA, EE.UU.). Por lo tanto, según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, un método para aumentar el aumento de peso

medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  y  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración, en la que dicha composición inmunogénica comprende un antígeno del PCV2 es Ingelvac® CircoFLEX™, CircoVac®, CircoVent y/o Suvaxyn PCV-2 One Dose®, preferiblemente es Ingelvac® o CircoFLEX™.

La expresión “una cantidad eficaz de un antígeno del PCV2”, tal como se utiliza en la presente memoria, significa pero no se limita a una cantidad de un antígeno del PCV2 que provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunológica en un animal, al cual se administra dicha cantidad eficaz de un antígeno del PCV2.

La cantidad que es eficaz depende de los ingredientes de una vacuna y del esquema de administración. Típicamente, cuando se utiliza una preparación con un virus inactivado o un virus vivo modificado en una vacuna de combinación, se utilizará una cantidad de vacuna que contenga aproximadamente  $10^{2,0}$  a aproximadamente  $10^{9,0}$  DICT<sub>50</sub> por dosis, preferiblemente aproximadamente  $10^{3,0}$  a aproximadamente  $10^{8,0}$  DICT<sub>50</sub> por dosis, más preferiblemente, aproximadamente  $10^{4,0}$  a aproximadamente  $10^{8,0}$  DICT<sub>50</sub> por dosis. En particular, cuando se utiliza PCV2 vivo modificado en una vacuna, la dosis recomendada para ser administrada al animal susceptible es preferiblemente de aproximadamente  $10^{3,0}$  DICT<sub>50</sub> (50% del punto final de la dosis infecciosa en cultivo de tejido)/dosis a aproximadamente  $10^{6,0}$  DICT<sub>50</sub>/dosis, y más preferiblemente de aproximadamente  $10^{4,0}$  DICT<sub>50</sub>/dosis a aproximadamente  $10^{5,0}$  DICT<sub>50</sub>/dosis. En general, la cantidad de antígeno será entre 0,2 y 5.000 microgramos, y entre  $10^{2,0}$  y  $10^{9,0}$  DICT<sub>50</sub>, preferiblemente entre  $10^{3,0}$  y  $10^{6,0}$  DICT<sub>50</sub>, más preferiblemente entre  $10^{4,0}$  y  $10^{5,0}$  DICT<sub>50</sub>, 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.

Se ha demostrado que la inmunidad procedente de la madre confiere un determinado grado de protección frente a la infección por PCV2 y a las enfermedades clínicas asociadas con las infecciones por PCV2. Se ha demostrado que esta protección es dependiente de la titulación: las titulaciones más altas son protectoras generalmente mientras que las titulaciones más bajas no lo son (McKeown *et al.*, 2005; *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*; 12: 1347-1351). Se ha estimado que la semivida media de los anticuerpos en los animales destetados es de 19,0 días, y la ventana para la degradación del anticuerpo pasivo contra el PCV2 en una población es relativamente amplia (Opriessnig *et al.*, 2004, *J. Swine Health Prod.*, 12: 186-191). La presencia de anticuerpo procedente de la madre no sólo puede conferir un determinado grado de protección frente a infecciones virales, que, sin embargo, no se puede predecir, sino que también se sabe que disminuye la eficacia de la inmunización. Se ha descubierto, de forma sorprendente, que la presencia de anticuerpos anti-PCV2, en particular de títulos de anticuerpos anti-PCV2 de hasta 1:1000, no afecta a la eficacia del tratamiento con PCV2.

Por lo tanto, según otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, un método para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración, en la que los animales en el momento de la vacunación tienen anticuerpos anti-PCV2, preferiblemente en la que dichos animales tienen en el momento de la vacunación un título de anticuerpos anti-PCV2 detectable de hasta 1:100, preferiblemente de más de 1:100, incluso más preferiblemente de más de 1:250, incluso más preferiblemente de más de 1:500, incluso más preferiblemente de 1:640, incluso más

preferiblemente de más de 1:750, y lo más preferible de más de 1:1000. Preferiblemente, esta titulación de anticuerpos anti-PCV2 es detectable y cuantificable en un ensayo inmune específico anti-PCV2, preferiblemente en el ensayo tal como se describe en el Ejemplo 2.

5 Métodos para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-PCV2 son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la detección y cuantificación de anticuerpos del PCV2 puede realizarse por inmunofluorescencia indirecta, como se describe en Magar *et al.*, 2000, *Can. J. Vet Res.*; 64: 184-186 o Magar *et al.*, 2000, *J. Comp. Pathol.*; 123: 258-269. Ensayos adicionales para la cuantificación de anticuerpos anti-PCV2 se describen en Opriessnig *et al.*, 2006, 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. Además, el ejemplo 2 también describe un  
10 ensayo de inmunofluorescencia indirecta, que puede utilizar un experto en la técnica. En los casos de resultados controvertidos y en cualquier caso de duda, las titulaciones de anti-PCV2 tal y como se mencionan en la presente memoria, se refieren a las que se estiman/pueden estimarse por el ensayo tal y como se describe en el Ejemplo 2.

15 Por lo tanto, según otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, un método para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  y  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción  
20 de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal joven que necesita dicha administración.

25 La expresión "animal joven" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un animal de 1 a 22 días de edad. Preferiblemente, la expresión animal joven indica un animal de 1 a 20 días de edad. Más preferiblemente, la expresión animal joven se refiere a un animal de 1 a 15 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 día de edad a 14 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 a 12 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 a 10 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 a 8 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 a 7 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 a 6 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 a 5 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 a 4 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 a 3 días de edad, incluso más preferiblemente de 1 ó 2 días de edad y lo más preferiblemente a un animal de 1 día de edad.

35 Debido a la ubicuidad del PCV2 en el campo, la mayoría de los lechones jóvenes son seropositivos con respecto al PCV2. Por lo tanto, según un aspecto adicional, dichos animales jóvenes, en el día de la vacunación/tratamiento, tienen una titulación detectable de anticuerpos anti-PCV2 de hasta 1:100, preferiblemente de más de 1:100, incluso más preferiblemente de más de 1:250, incluso más preferiblemente de más de 1:500, incluso más preferiblemente de 1:640, incluso más preferiblemente de más de 1:750, y lo más preferiblemente de más de 1:1000 en el día de la  
40 vacunación/tratamiento.

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

50 Preferiblemente, al menos una dosis de la composición inmunogénica, tal como se ha descrito anteriormente, se administra por vía intramuscular al sujeto que lo necesite. Según un aspecto adicional, el antígeno del PCV2 o la composición inmunogénica que comprende cualquiera de dichos antígenos del PCV2 como se han descrito en la presente memoria, se embotella y se administra de un (1) mL a cinco (5) ml por dosis, preferiblemente a 1 ml por dosis. Por lo tanto, según un aspecto adicional, también se proporciona una composición inmunogénica de 1 ml a 5 ml, preferiblemente de 1 ml, que comprende un antígeno del PCV2 como se ha descrito en la presente memoria, para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2 en un animal o grupo de animales (piara), para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente  
55 con PCV2, para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  y  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, para la reducción de la excreción nasal del virus y la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método  
60



para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración. La presente invención también se refiere a un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2 en un animal o grupo de animales (piara), un método para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar de 1 a 5 ml, preferiblemente 1 ml de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a un animal que necesita dicha administración.

Según un aspecto adicional se da al menos una administración adicional de al menos una dosis de la composición inmunogénica, tal como se ha descrito anteriormente, a un sujeto que lo necesita, en la que la segunda o cualquier administración adicional se da al menos 14 días más tarde de la administración inicial o de cualquier administración anterior. Preferiblemente, la composición inmunogénica se administra con un estimulante inmunológico. Preferiblemente, dicho estimulante inmunológico se administra al menos dos veces. Preferiblemente, hay un espacio de tiempo de al menos 3 días, más preferiblemente al menos 5 días, incluso más preferiblemente al menos 7 días entre las primera y segunda administración o cualquier administración adicional del estimulante inmunológico. Preferiblemente, el estimulante inmunológico se da al menos 10 días, preferiblemente 15 días, incluso más preferiblemente 20, incluso más preferiblemente al menos 22 días más tarde de la administración inicial de la composición inmunogénica proporcionada en la presente memoria. Un estimulante inmunológico preferido es, por ejemplo, la hemocianina de lapa de agujero (KLH), preferiblemente emulsionada con adyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA). Sin embargo, se entiende con la presente que también se puede usar cualquier otro estimulante inmunológico conocido por los expertos en la técnica. La expresión "estimulante inmunológico", tal como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier agente o composición que pueda disparar la respuesta inmunológica, preferiblemente sin iniciar ni aumentar una respuesta inmunológica específica, por ejemplo la respuesta inmunológica contra un agente patógeno específico. Se instruye, además, administrar el estimulante inmunológico en una dosis adecuada.

La presente descripción también se refiere al uso de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 para la preparación de una medicina para la profilaxis y el tratamiento de una infección crónica por PCV2 en un animal o grupo de animales (piara), para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  a  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, para la reducción de la excreción nasal del virus y la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente y un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente. Preferiblemente, el antígeno del PCV2 es un antígeno recombinante, preferiblemente ORF-2 del PCV2, e incluso más preferiblemente Ingelvac® CircoFLEX™.

El "animal", tal como se utiliza en la presente memoria, significa un suido, cerdo o lechón. Por lo tanto, según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la profilaxis y el tratamiento de una infección subclínica por PCV2 en cerdos, un método para aumentar el aumento de peso medio en un animal o un grupo de animales (piara) infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica comprendida entre  $10^4$  y  $10^6$  copias genómicas por ml de suero, un método para la reducción del número de animales con una carga vírica por encima de  $10^6$  copias genómicas por ml de suero en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la excreción nasal del virus, un método para la reducción de la duración de la viremia en animales infectados subclínicamente con PCV2, un método para la reducción de la tasa de morbilidad en una piara infectada subclínicamente, un método para la reducción de la tasa de mortalidad en una piara infectada subclínicamente, comprendiendo todos ellos la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno del PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno del PCV2 a cerdos que necesitan dicha administración. Preferiblemente, el antígeno de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende el antígeno de PCV2 es cualquiera de los descritos anteriormente, más preferiblemente el antígeno de PCV2 es Ingelvac® CircoFLEX™.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN PREFERIDOS

Los siguientes ejemplos recogen materiales y procedimientos preferidos de acuerdo con la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria pueden usarse en la práctica o ensayos de la presente invención, se describen ahora los métodos, mecanismos y materiales preferidos. 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, que se define por las reivindicaciones.

## EJEMPLO 1

Preparación del antígeno ORF-2 del PCV2

Cultivos de células SF+ iniciales que estaban conservados en nitrógeno líquido se cultivaron en medio Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) en suspensión en matraces de centrifugación estériles con agitación constante. Los cultivos se hicieron crecer en matraces de centrifugación de 100 mL a 250 mL con 25 a 150 mL de medio exento de suero Excell 420. Cuando las células se habían multiplicado hasta una densidad de células de  $1,0-8,0 \times 10^6$  células/mL, estos se dividieron en nuevos recipientes con una densidad de siembra de  $0,5-1,5 \times 10^6$  células/mL. Los cultivos por expansión posteriores se hicieron crecer en matraces de centrifugación de hasta 36 litros de capacidad o en biorreactores de acero inoxidable de hasta 300 litros durante un periodo de 2-7 días a 25-29°C.

Después de la siembra, los matraces se incubaron a 27°C durante cuatro horas. Posteriormente, cada matraz se sembró con un baculovirus recombinante que contenía el gen ORF-2 del PCV2 (SEQ ID NO: 4). El baculovirus recombinante que contenía el gen ORF-2 del PCV2 se generó como se describe en el documento WO06/072065. Después de ser sembrados con el baculovirus, los matraces se incubaron luego a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días y se agitaron también a 100 rpm durante ese tiempo. Los matraces utilizaban tapones ventilados para permitir el flujo de aire.

Después de la incubación, se recogió el sobrenadante resultante, se filtró para eliminar los residuos celulares y se inactivó. El sobrenadante se inactivó llevando su temperatura hasta  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , y se añadió etilenimina binaria (BEI) al sobrenadante hasta una concentración final de 5 mM. Las muestras se agitaron entonces continuamente durante 72 a 96 horas. Se añadió una disolución de tiosulfato de sodio 1,0 M para proporcionar una concentración final mínima de 5 mM para neutralizar cualquier BEI residual. Después de la inactivación, se añadió ORF-2 del PCV2 tamponado con tampón fosfato y Caropol a aproximadamente 0,5 a 2,5 mg/dosis. La dosis final comprende aproximadamente 16 µg de antígeno ORF-2 de PCV2.

## EJEMPLO 2

Inmunoensayo anti-PCV2

Se sembraron células PK15 (por ejemplo, ATCC CCL-33) o VIDO R1 descritas en el documento WO 02/07721, en una placa de 96 pocillos (aproximadamente 20.000 a 60.000 células por pocillo). Las células se infectaron con un aislado de PCV2 cuando las monocapas tenían una confluencia de aproximadamente 65% a 85%. Las células infectadas se incubaron durante 48 horas. Se eliminó el medio y los pocillos se lavaron 2 veces con PBS. Se eliminó el tampón de lavado y las células se trataron con fijador de metanol/acetona 50/50 frío (aproximadamente 100 µl/pocillo) durante aproximadamente 15 min a aproximadamente  $-20^\circ\text{C}$ . Se desechó el fijador y las placas se secaron al aire. Se prepararon diluciones en serie de muestras de suero porcino en PBS, se añadieron a las placas y se incubaron para permitir que los anticuerpos, si estaban presentes, se unieran en las muestras de suero durante aproximadamente 1 hora a  $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Además, se ensayaron en paralelo diluciones en serie de una muestra control anti-PCV2 positiva y negativa (muestras de control positivo y muestras de control negativo). Las placas se lavaron entonces tres veces con PBS. Se eliminó el PBS. Las placas se tiñeron entonces con un conjugado comercial anti-suido de cabra FITC diluido 1:100 en PBS y se incubó durante aproximadamente 1 hora a  $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$ , lo que permite la detección de los anticuerpos unidos a las células infectadas. Después de completar la incubación, las microplacas se retiraron del incubador, el conjugado se eliminó y las placas se lavaron dos veces con PBS. Las placas se leyeron utilizando microcopía de UV y los pocillos individuales se registraron como positivos o negativos. Las muestras de control positivo y de control negativo se emplearon para controlar el sistema de ensayo. Si los controles se encuentran dentro de los intervalos esperados, los resultados del ensayo se consideran aceptables con respecto a los parámetros del método de ensayo. Las titulaciones del anticuerpo en suero se calcularon utilizando la dilución más alta que muestra una reactividad IFA específica y se calcula el número de pocillos positivos por dilución o un 50% del punto final utilizando la fórmula de Reed-Muench apropiada.

## EJEMPLO 3

Eficacia de ORF-2 del PCV2 (Ingelvac® CircoFLEX™) en el tratamiento de la infección crónica por PCV2

## OBJETIVO Y DISEÑO DEL ESTUDIO

5 En este estudio se incluyeron lechones convencionales de cinco grupos de semanas consecutivas, comprendiendo cada una de ellas aproximadamente 300 animales. Los animales se distribuyeron igualmente en dos grupos de tratamiento con respecto al peso corporal inicial y asignación de la camada. El día del destete un grupo (n = 775) se vacunó con Ingelvac® CircoFLEX, que contenía la liberación mínima de contenido de antígeno, y el otro grupo (n = 773) recibió un producto de control (disolución salina fisiológica). La vacuna y el producto de control (PC) se dieron como una dosis única de 1 ml intramuscularmente en la región derecha del cuello cuando los lechones tenían aproximadamente 21 días de edad.

10 Se registraron los pesos corporales individuales de todos los animales de estudio. Se realizaron observaciones clínicas respecto a los síntomas asociados con el PCV2 y se registraron las desviaciones del estado de salud general normal en una base de animales individuales.

15 Se analizó cuantitativamente la presencia de PCV2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de suero y de secreciones nasales. Además, se analizaron los títulos de anticuerpos del PCV2 en todos los animales de estudio en el momento de la vacunación y del mismo 5% de los animales de estudio preseleccionados se analizaron por titulación indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Confirmación del estado crónico (subclínico) del sitio de estudio:

25 El primer diagnóstico de la PCVD en la granja se realizó 4 meses antes de la realización del estudio. Se identificó una tasa de mortalidad de 14,1% y la presencia de cerdos retrasados en la unidad de engorde. El rendimiento del crecimiento fue más bien pequeño (644 g/d). La presencia de infecciones por PCV2 se confirmó mediante examen histológico. Las muestras pulmonares mostraron neumonía intersticial y se identificó el PCV2 por IHC entre las lesiones.

30 En la figura 1 se puede observar que la tasa de mortalidad durante el engorde disminuyó considerablemente de 14,1% a 8,1% lo que sugiere una evolución de una infección de PCVD aguda a una infección subclínica.

Confirmación de la infección subclínica de los animales de estudio

35 La evolución a infección subclínica en la granja se confirmó mediante los resultados obtenidos durante el estudio. Los animales de estudio se caracterizaron por una carga vírica subclínica predominante, una tasa de mortalidad baja (por debajo de 10%) y una tasa de morbilidad baja (por debajo de 10%).

## RESULTADOS

40 Viremia

La mayor proporción de animales virémicos se observó en la semana 14 del estudio, con 55,5% de animales virémicos en el grupo tratado con PC y aproximadamente 10% de animales virémicos en el grupo vacunado. Como se muestra en las figuras 4 y 5, la mayoría de los animales en ambos grupos de tratamiento tenían solo cargas víricas subclínicas (definida como  $10^4$ - $10^6$  equivalentes genómicos por ml). La mayor proporción de animales con cargas de PCV2 clínicamente relevantes ( $> 10^6$  equivalentes genómicos por ml) fue de 2,52% para los animales tratados con PC y 0,87% para los animales vacunados.

Mortalidad

50 La tasa de mortalidad antes y después del inicio de la viremia fue más bien baja. Antes del inicio de la viremia, la tasa de mortalidad fue de 1,55% en los animales vacunados y 2,19% en los animales tratados con PC. Después del inicio de la viremia se observó un aumento en la tasa de mortalidad en los animales tratados con PC (de 1,55% a 3,02%) mientras que la tasa de mortalidad en los animales vacunados disminuyó ligeramente en comparación con el tiempo antes del inicio de la viremia (de 2,19% a 1,98%). Las diferencias en la tasa de mortalidad entre ambos grupos de tratamiento antes y después del inicio de la viremia no fueron estadísticamente significativas.

Signos clínicos

Antes del inicio de la viremia, solo se detectaron unos pocos signos clínicos en ambos grupos de tratamiento con incidencias por debajo de 1% para cada uno de los parámetros analizados. El inicio de la viremia se acompañó con

una coinfección con PRRSV y *Mycoplasma hyopneumoniae*. Sin embargo, ni el PCV2 ni ningún otro patógeno coinfeccioso produjo signos clínicos graves. Consecuentemente, la proporción de animales con síntomas respiratorios tales como tos y/o disnea fue de solo 3,9% y 0,7% en el grupo tratado con PC y 3,0% y 0,4% en el grupo vacunado. La frecuencia de otros síntomas clínicos fue siempre inferior a 1% y sin diferencias entre los grupos de tratamiento.

#### Frecuencia de cerdos retrasados

No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de 'cerdos retrasados' entre el grupo vacunado y el grupo tratado con placebo en ninguno de los respectivos momentos de peso. Después del inicio global de la viremia por PCV2, la frecuencia de 'cerdos retrasados' fue baja, en general, en ambos grupos de tratamiento (3,3-4,7%).

Tabla 1: Comparación de la frecuencia de 'cerdos retrasados' (datos reunidos de los tres grupos de semana)

Semana del estudio	Antes de la aparición de viremia			Después de la aparición de viremia	
	0	7	12	17	22
CP	11,51%	11,94%	5,68%	4,72%	4,53%
IVP	10,84%	10,46%	4,78%	3,36%	3,27%
P	0,6874	0,3728	0,4884	0,1898	0,2259

P: valor de p del ensayo de la t para la comparación entre grupos: p > 0,05 no significativo

#### Impacto de la infección subclínica sobre el rendimiento del crecimiento

El aumento de peso corporal hasta la semana 17 del estudio fue 2,36 kg mayor y hasta la semana 19 fue 2,39 kg mayor en el grupo vacunado que en el grupo tratado con PC. Como se muestra en la figura 2, la diferencia en el peso corporal comenzó a aumentar ligeramente en el momento del inicio de la viremia (semana 12 del estudio). En la semana 17 del estudio, la diferencia alcanzó 2,36 kg. Debido al mayor aumento de peso, el tiempo medio entre el destete y el sacrificio fue 1,9 días más corto para los animales vacunados que para los animales tratados con PC.

Tabla 2: Comparación del aumento de peso y ADWG (datos colectivos de los cinco grupos semanales)

	Semana del estudio	Grupo tratado con PC (LS Media)	Grupo vacunado (LS Media)	Diferencia (IVP menos CP)	Valor de p <sup>1)</sup>
Aumento de peso	0-7	20,63 kg	20,71 kg	0,08 kg	0,7166 ns
	0-17	76,73 kg	79,09 kg	2,36 kg	<0,0001 ***
	0-19	86,75 kg	89,14 kg	2,39 kg	<0,0001 ***
	12-17	29,05 kg	30,73 kg	1,68 kg	<0,0001 ***
	7-19	66,07 kg	68,38 kg	2,31 kg	<0,0001 ***
	1) Valor de p del ensayo de la t para la comparación entre grupos, ns: no significativo; * significativo, p ≤ 0,05; *** significativo, p ≤ 0,001				

#### Duración de la viremia en la sangre

Cuando se comparó la duración media total y la duración mediana en los dos grupos de tratamiento, se detectó una duración de la viremia significativamente mayor (p = 0,0003) en los animales tratados con PC. El grupo IVP presentaba una duración de la viremia media de 5,8 días, mientras que el grupo PC presentaba una duración media de 21,8 días. Esto corresponde a una duración de la viremia reducida en un 73% en el grupo IVP.

Tabla 3: Duración de la viremia media y mediana

	Grupo de tratamiento	Número de Cerdos	Media (días)	Mediana (días)	Valor p
<b>Total</b>	CP	76	21,8	14,0	<b>0,0003</b> ***
	IVP	18	5,8	0,0	
	IVP menos CP		<b>-16,0</b>	<b>-14,0</b>	
P: valor de p del ensayo de la t para la comparación entre grupos ns: no significativo, p>0,05; * significativo, p ≤ 0.05					

CONCLUSIÓN

- 5 El estudio ha sido realizado en una granja que evolucionó de un estado agudo a crónico con una infección subclínica muy poco antes de la realización del estudio. La carga vírica de los animales de estudio durante el estudio confirmó esta suposición. Muy pocos animales de estudio (< 2,19%) tenían una carga vírica en el suero por encima del "límite clínico" de 10<sup>6</sup> copias genómicas/ml.
- 10 La vacunación consiguió reducir de forma importante el porcentaje de animales infectados en el grupo vacunado. Por lo tanto, la vacunación permitió la comparación de los animales no infectados (grupo vacunado) con los animales infectados subclínicamente (grupo placebo). Los animales vacunados demostraron que tenían un mejor rendimiento del crecimiento que los animales infectados subclínicamente. En la semana 17 del estudio, la diferencia alcanzó 2,36 kg. Los animales vacunados presentaban una duración de la viremia menor en más de 16 días en comparación con el grupo no vacunado.
- 15 Se puede concluir que aunque los animales infectados permanecían aparentemente saludables, la infección subclínica por PCV2 puede tener un impacto negativo importante en el rendimiento del crecimiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA INC.

<120> PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE PCBVD SUBCLÍNICA

5

<130> P-01-2179

10

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

15

<210> 1  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> Esta es una secuencia de Kozak modificada.

<400> 1  
 ccgccatg 8

25

<210> 2  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Esta es una secuencia de Eco R1 recombinante.

35

<400> 2  
 gaattc 6

40

<210> 3  
 <211> 713  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus Porcino

<400> 3  
 cagctatgac gtatccaagg aggcggttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60  
 ttggccagat cctccgcccgc cgcccctggc tcgtccaacc ccgccaccgc taccggttggg 120  
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccggc tctcccgcac cttcggatat actgtggaga 180  
 aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcgctc tcccgcaact tcggatatac tgtgacgact 240  
 ttgttccccg gggagggggg accaacaanaa tctctataacc ctttgaatac tacagaataa 300  
 gaaaggttaa gglttgaatc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360  
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420  
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480  
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccaactattga ttacttccaa ccaataaaca 540  
 aaaggaatca gctttggctg aggetacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggocctcg 600  
 gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacagacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660  
 tacaattcag agaattttaat cttaaagacc ccccaactaa accctaatg aat 713

45

<210> 4  
 <211> 713  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus Porcino

<400> 4

ES 2 434 117 T3

```

ccgccatgac gtatccaagg aggcggttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc      60
ttggccagat cctccgcccgc cgcacctggc tegtccaccc cggccaccgc tacogttgga      120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccogcc tctccogcac cttcggatat actgtcaagg      180
ctaccacagt cacaacgccc tccctggcggc tggacatgat gagatttaat attgacgact      240
ttgttcccc  gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa      300
gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg      360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg      420
acccataigt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc      480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca      540
aaaggaatca gctttggctg aggtacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggctctg      600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg      660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttga accctaagaa ttc          713

```

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Circovirus Porcino

<400> 5

```

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

```

10

<210> 6

ES 2 434 117 T3

<211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Circovirus Porcino

5 <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  
 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

5 <220>  
 <223> Esta secuencia es del circovirus porcino tipo 2, marco de lectura abierto 2, junto con una porción del vector pGEM T-easy.

<400> 7  
 gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcgttaccg cagaagaaga 60  
 caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcccgc gccctggct cgtccacccc 120  
 cgccaccgct accgttggag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctccgcacc 180  
 ttcggatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgcct cctggggcgg ggacatgatg 240  
 agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc 300  
 tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggccctgctc ccccatcacc 360  
 cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag 420  
 gccacagccc taacctatga cccatatgta aactactcct cccgccatac aatcccccaa 480  
 ccttctcct accactcccg ttacttcaca ccaaactg ttcttgactc cactattgat 540  
 tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttgctga ggctacaaac ctctagaaat 600  
 gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat 660  
 atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagacce cccacttgaa 720  
 ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggccgc 756

10 <210> 8  
 <211> 10387  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Esta es una secuencia del circovirus porcino de tipo 2, constructo ORF-2, que incluye las secuencias codificadoras del baculovirus y pGEM T-easy.

20 <400> 8  
 aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgtttatg agataagatt 60  
 gaaaacacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt 120  
 ataaaagatt ctaatctgat atgttttaa acaccttgc ggcccagatt gtttgctac 180  
 gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt 240  
 ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atgggtgtgca tttttgcgg 300  
 gctggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgc tgaaagcata 360  
 gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccgg catgttggtg 420  
 ggcgtgact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtcag atatttaatg 480  
 cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac 540  
 aaaaatgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcatc 600  
 ttaacaaaat actttatcct atttcaaat tgttgcgctt ctccagcga accaaaacta 660  
 tgcttcgctt gctccgttta gcttgtagcc gatcagtggc gttgttcca tcgacggtag 720  
 gattagccg gatattctcc accacaatgt tggcaacgtt gatgttacgt ttatgctttt 780  
 ggtttccac gtaoigtctt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtccg tcgcgcgtca 840  
 cgcacaacac cggatgtttg cgttgtccg cggggattg aaccgcgcga tccgacaaat 900  
 ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtctt tttctgact atttcgtctt 960  
 tcttttgcct ggtttcctgg aagccggtgt acatgcggt tagatcagtc atgacgcgcg 1020  
 tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgccttgat ggcaacgat cgttcaataa 1080  
 actcttgttt ttaacaagt tcctcggtt tttgcgccac caccgcttg agcgcgtttg 1140  
 tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctccggtt 1200  
 gtttgatcgc gggatcgac ttgcccgtgc agagcaactg aggaattact tcttcaaaa 1260  
 gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc 1320  
 cggatttagt aatgagcact gtatgcccgt gcaaatacag cgggtcgcct cttttcacga 1380  
 cgctgttaga ggtaggccc ccattttgga tggctcgtc aaataacgat ttgtatttat 1440  
 tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaactg tttagcagct 1500  
 ccttggccac gaaccggacc tgttggctgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat 1560  
 ctctccaaa tttaaattct ccaattttaa cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcagat 1620

ES 2 434 117 T3

tttgaacaa	ctattgtttt	ttaacgcaaa	ctaaacttat	tgtggtaagc	aataattaaa	1680
tatgggggaa	catgcccgc	tacaacactc	gtcgttatga	acgcagacgg	cgccggtctc	1740
ggcgcaagcg	gctaaaacgt	gttgccggtt	caacgcggca	aacatcgcaa	aagccaatag	1800
tacagttttg	atlttgacat	taacggcgat	tttttaaat	atcttattta	ataaatagtt	1860
atgacgccta	caactccccg	cccgcgttga	ctcgcctgcac	ctcgcagcagt	tcggttgacgc	1920
cttcctccgt	gtggccgaac	acgtcgcagcg	gggtggtcgat	gaccagcggc	gtgcccgcacg	1980
cgacgcacaa	gtatctgtac	accgaatgat	cgctcgggcca	aggcacgctcg	gcctccaagt	2040
ggcaatattg	gcaaattcga	aaatatatac	agttgggttg	tttgcgcata	tctatcgtgg	2100
cgttgggcat	gtacgtccga	acgttgattt	gcatgcaagc	cgaaattaaa	tcattgcat	2160
tagtgcgatt	aaaacgttgt	acatcctcgc	ttttaatcat	gccgtcgatt	aaatcgcgca	2220
atcgagtcaa	gtgatcaaag	tgtggaataa	tgttttcttt	gtattcccga	gtcaagcgca	2280
gcgcgtat	taacaaacta	gccatcttgt	aagttagttt	catttaatgc	aaacttatcc	2340
aataatata	tatgatcgc	acgtcaagaa	ttaacaatgc	gccggtgtc	gcatctcaac	2400
acgcatatga	tagatcaca	ataaagcgcg	aattaaatag	cttgcgacgc	aacgtgcacg	2460
atctgtgcac	gcgttcocggc	acgagctttg	attgtaataa	gtttttacga	agcgtatgaca	2520
tgacccccgt	agtgacaacg	atcacgcccc	aaagaactgc	cgactacaaa	attaccgagt	2580
atgtcgggta	cgttaaaact	attaagccat	ccaatcgacc	gtagtcgaa	tcaggaccgc	2640
tgggtgcgaga	agcccgcgaag	tatggcgaat	gcatcgtata	acgtgtggag	tcocgtcatt	2700
agagcgtcat	gtttagacaa	gaaagctaca	ttttaattg	atcccgatga	ttttattgat	2760
aaattgaccc	taactccata	cacggtattc	tacaatggcg	gggttttggg	caaaatttcc	2820
ggactgcgat	tgtacatgct	gttaacggct	ccgcccacta	ttaatgaaat	taaaaattcc	2880
aattttaaaa	aacgcagcaa	gagaaacatt	tgtatgaaag	aatgcgtaga	aggaaagaaa	2940
aatgtcgtcg	acatgctgaa	caacaagatt	aatatgcctc	cggtataaaa	aaaaatattg	3000
aacgatttga	aagaaaaaaa	tgtaccgcgc	ggcggatgt	acaggaagag	gtttatacta	3060
aactgtttaca	ttgcaaacgt	ggtttcgtgt	gccaaagtgtg	aaaaccgatg	tttaatcaag	3120
gctctgacgc	atctctacaa	ccacgctcc	aagtgtgtgg	gtgaagtcac	gcatctttta	3180
atcaaatccc	aagatgtgta	taaaccacca	aactgccaaa	aaatgaaaaac	tgtcgcacaag	3240
ctctgtccgt	ttgctggcaa	ctgcaagggt	ctcaatccta	tttgaatta	ttgaataata	3300
aaacaattat	aaatgctaaa	tttgtttttt	attaacgata	caaaccacaa	gcaacaagaa	3360
catttgtagt	attatctata	attgaaaacg	cgtagttata	atcgcgtgag	taatatftaa	3420
aatcattttc	aaatgattca	cagttaat	ggcacaata	aattttattt	tcacataaac	3480
tagacgcctt	gtcgtcttct	tctcgtatt	ccttctcttt	ttcatttttc	tcctcataaa	3540
aattaacata	gtttattatcg	tatccatata	tgtatctatc	gtatagagta	aattttttgt	3600
tgtcataaat	atataatgtct	tttttaatgg	gggtatagt	accgctgcgc	atagtttttc	3660
tgtaatttac	aacagtgtct	ttttctggta	gttctctgga	gtgtgttgct	tttaattatta	3720
aatttatata	atcaatgaal	ttgggatcgt	cggttttgta	caatatgttg	ccggcatagt	3780
acgcagcttc	ttctagtcca	attacaccat	tttttagcag	caccggatta	acataacttt	3840
ccaaaaatgt	gtacgaaccg	ttaaacaaa	acagttcacc	tccttttct	atactattgt	3900
ctgcgagcag	ttgtttgttg	ttaaaaataa	cagcctatgt	aatgagacgc	acaaaactaat	3960
atcacaaact	ggaaatgtct	atcaatata	agttgtctgat	atcatggaga	taattaaaa	4020
gataaccatc	tcgcaataa	ataagtattt	tactgttttc	gtaacagttt	tgtataaaaa	4080
aaacctataa	atattccgga	ttattcatac	cgccccacca	tcgggcgcgg	atcagatctg	4140
cagcggccgc	gggaattcga	tcocccatga	cgatccaag	gaggcgttac	cgcagaagaa	4200
gacaccgccc	ccgcagccat	cttggccaga	tcctccgcgc	ccgcccctgg	ctcgtccacc	4260
cccgccaccg	ctaccgttgg	agaaggaaaa	atggcatctt	caacaccgc	ctctcccga	4320
ccttcggata	tactgtcaag	gtaccacag	tcacaacgcc	ctcctgggcg	gtggacatga	4380
tgagatttaa	tattgacgac	ttgtttcccc	cgggaggggg	gaccaacaaa	atctctatac	4440
cctttgaata	ctacagaata	agaaggtta	aggttgaatt	ctggccctgc	tcocccatca	4500
cccaggggtga	taggggagtg	ggctccactg	ctgttattct	agatgataac	tttgaacaa	4560
aggccacagc	cctaacctat	gacccatag	taaacactc	ctccgcctat	acaatcccc	4620
aaccctctc	ctaccactcc	cgttacttca	caccacaaacc	tgttcttgac	tcactattg	4680
attacttcca	accaaataac	aaaaggaatc	agctttggct	gaggctacaa	acctctagaa	4740
atgtggacca	cgtaggcctc	ggcactgcgt	tcgaaaacag	taaatcgcac	caggactaca	4800
atatccgtgt	aacctatgat	gtacaattca	gagaatttaa	tcttaagac	ccccacttg	4860
aaccctaaga	attctatcct	tagtgaattc	gcggccgcgc	gccgctccag	aattctagaa	4920
ggtaccgggg	atcctttcc	gggaccggc	aagaaccaa	aactcactct	cttcaaggaa	4980
atocgtaatg	ttaaaccctc	cacgatgaag	cttgcgttg	gatggaaagg	aaaagagttc	5040
tacagggaaa	cttgaccgcg	cttcatggaa	gacagcttcc	ccattgttaa	cgaccaagaa	5100
gtgatggatg	ttttccttgt	tgtcaacatg	cgccccacta	gaccaaccg	ttgttcaaaa	5160
ttcctggccc	aacacgctct	cggttgcgac	cccgactatg	tacctcatga	cggtgattag	5220
atcgtcagagc	cttcatgggt	gggcagcaac	aacgagtacc	gcatcagcct	ggctaagaag	5280

ggcggcgctt gcccaataat gaaccttcac tctgagtaca ccaactcgtt ogaacagttc 5340  
 atcgatcgtg tcatctggga gaacttctac aagcccatcg tttacatcgg taccgactct 5400  
 gctgaagagg aggaaattct ccttgaagtt tccctgggtg tcaaagtaaa ggagtttgca 5460  
 ccagacgcac cctcgttcac tggctccggc tattaanaaa cgatacattg ttattagtac 5520  
 atttattaag cgttagattc tgtgcgttgi tgaatlacag acaattgttg tacgtatatt 5580  
 aataattcat taaatttata atctttaggg tggatggtta gagcgaanaa caaatgattt 5640  
 tcagcgtctt tatatctgaa tttaaatatt aaatcctcaa tagattttgta aaataggttt 5700  
 cgattagttt caaacaaggg ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt 5760  
 tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaaact tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc 5820  
 gtttgtgttt tgttttgtaa taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta 5880  
 tttctttcat cactgtcgtt agtgtacaat tgactcagcg taaacacgtt aaataaagct 5940  
 tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattaggcc gattatcgtc gtcgtcccaa 6000  
 ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta 6060  
 attgtgtcgg ctaacacgct cgcgatcaaa tttgtagtgg agctttttgg aattatttct 6120  
 gattgcgggc gtttttgggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttta ttcagacaac 6180  
 acgtagaana gcgatggtgc aggcggtggt aacatttcag acggcaaatc tactaatggc 6240  
 ggcggtggtg gagctgatga taaatctacc atcgggtggag gcgcagcggg ggctggcggc 6300  
 gggagcggag gcggagggtg tggcgggtgag gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct 6360  
 ttaggcaaca cagtccggac ctcaactatt gtactggttt cgggcgcctg ttttggtttg 6420  
 accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag ctccaacaa ttgttgtctg 6480  
 tcgtctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca 6540  
 gacatcgatg tgggtggtgg tgggtggagg gctggaatgt taggcacggg agaaggtggt 6600  
 ggcgcgggtg ccgcgggtat aatttgttct ggtttagttt gttcgcgcac gattgtgggc 6660  
 accgcgcgag gcgcgcgtgg ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcctcagag cagcgtttgg 6720  
 ggtggtggca attcaatatt ataattgtaa tacaatcgtt aaaaatctgc tataagcatt 6780  
 gtaatttgcg tatcgtttac cgtgcogata tttaaacaac gctcaatgta agcaattgta 6840  
 ttgtaaagag attgtctcaa gctcgcgca cgcgataaac aagccttttc atttttacta 6900  
 cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgcagta catgtatgct ttgttgtcaa 6960  
 aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcage accactgtgt 7020  
 tgtcgtaaat gtgttttttg ataatttgcg ctcccgagc atcgcacagt tcaaaaaatt 7080  
 gatgcgcacg aattttgttg ttccctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc 7140  
 tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgtgcanaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200  
 actgcaaaaa cgtcaaaaact cggataaaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta 7260  
 ttttatcgca caagcccact agcaaatgtt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt 7320  
 ttaacgctga cgaaaataaa gttcaccagt taatgagcga ccacccaaat tttataaaaa 7380  
 tctattttaa tcacggttcc atcaacaacc aagtgtcgt gatgcactac attgactgtc 7440  
 ccgatttatt tgaacaacta caaattaaag gcgagcttcc gtaccaactt gtttagcaata 7500  
 ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg 7560  
 acataaaaact cgaaaatgtc ttatatttcg aagcacttga tcgctgtgat gtttgcgatt 7620  
 acggattgtg caaacacgaa aactcactta gcgtgcacga cggcacgctg gattatttta 7680  
 gtcgggaaaa aattcgcac acactatgc acgtttcgtt tgactggtac ggcgctgtt 7740  
 aacatacaag ttgctaacgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 7800  
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 7860  
 atgagtgagc taactccat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 7920  
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagcgg gtttgcgtat 7980  
 tgggcgctct tccgcttccct cgtcactga ctgcgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 8040  
 agcgttatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8100  
 aggaaagaac atgtgagcaa aagggcagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt 8160  
 gctggcgttt ttccatagcc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8220  
 tcagagggtg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8280  
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc 8340  
 ttcgggaage gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtagg 8400  
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagcc gctgcgcctt 8460  
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaaagcac gacttatcgc cactggcagc 8520  
 agccactggt aacaggatta gcagagcag gatgtaggc ggtgctacag agttctttaa 8580  
 gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa 8640  
 gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 8700  
 tagcgggtgt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 8760  
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagttg aacgaaaact cacgttaagg 8820  
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat ctccacctg atccttttaa attaaaaatg 8880  
 aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 8940

```

aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 9000
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcctacca tctggcccca gtgctgcaat 9060
gataccgcga gacccaagct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9120
aagggccgag cgcagaagtg gtccctgaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9180
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9240
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catggttgtc aaaaaagcgg ttagctcctt 9360
cggtcctccg atcgttgta caagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 9540
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 9600
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9660
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac gaaatgttg 9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9840
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 10020
ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag 10080
acaagcccg cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10140
gycalcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg 10200
cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actggtggga 10260
agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 10320
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt tccccagtca cgacgttgta aaacgacggc 10380
cagtgcc

```

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

10 <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

15 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Circovirus porcino

<400> 10

```

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

```

20 Thr Leu Ser

25 <210> 11  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 434 117 T3

<220>

<223> Este es una secuencia de aminoácidos del circovirus porcino tipo 2, marco de lectura abierto 2.

<400> 11

5

```

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

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. Uso de una proteína ORF2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) o una composición inmunogénica que comprende una proteína ORF2 del PCV2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección subclínica por PCV2 en un cerdo, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho medicamento administrada a dicho cerdo reduce la deficiencia en el desarrollo o reduce la excreción nasal del virus y/o la duración de la viremia, y en donde dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza porque la carga vírica en un cerdo subclínicamente infectado es inferior a  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero y porque una muestra de 1 ml de suero o 1 mg de tejido de dicho cerdo comprende una cantidad detectable de equivalentes del genoma de PCV2.
- 10
2. El uso según la reivindicación 1, en donde se reduce la deficiencia en el desarrollo debida a la infección subclínica por PCV2.
- 15 3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde se reduce la excreción nasal del virus y/o la duración de la viremia en un cerdo subclínicamente infectado con PCV2.
- 20 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha proteína ORF2 del PCV2 es una proteína ORF-2 de PCV2 expresada en baculovirus recombinante.
- 25 5. Proteína ORF2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) o una composición inmunogénica que comprende una proteína ORF2 del PCV2 para uso en un método para el tratamiento de una infección subclínica por PCV2, en donde dicha infección subclínica por PCV2 se caracteriza porque la carga vírica en un cerdo subclínicamente infectado es inferior a  $10^6$  copias genómicas de PCV2 por ml de suero y porque una muestra de 1 ml de suero o 1 mg de tejido de dicho cerdo comprende una cantidad detectable de equivalentes del genoma de PCV2, y en donde en dicho uso una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha proteína ORF2 de PCV2 o dicha composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 de PCV2 administrada a dicho cerdo reduce la deficiencia en el desarrollo o reduce la excreción nasal del virus y/o la duración de la viremia
- 30 6. La proteína ORF2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) o composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 del PCV2 para uso en un método según la reivindicación 5, en donde se reduce la deficiencia en el desarrollo debida a infección subclínica por PCV2.
- 35 7. La proteína ORF2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) o composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 del PCV2 para uso en un método según la reivindicación 5 ó 6, en donde se reduce la excreción nasal del virus y/o la duración de la viremia en un cerdo subclínicamente infectado con PCV2.
- 40 8. La proteína ORF2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) o composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 del PCV2 para uso en un método según una cualquiera de las reivindicación 5 a 7, en donde dicha proteína ORF2 de PCV-2 es una proteína ORF-2 de PCV2 expresada en un baculovirus recombinante.

Figura 1:

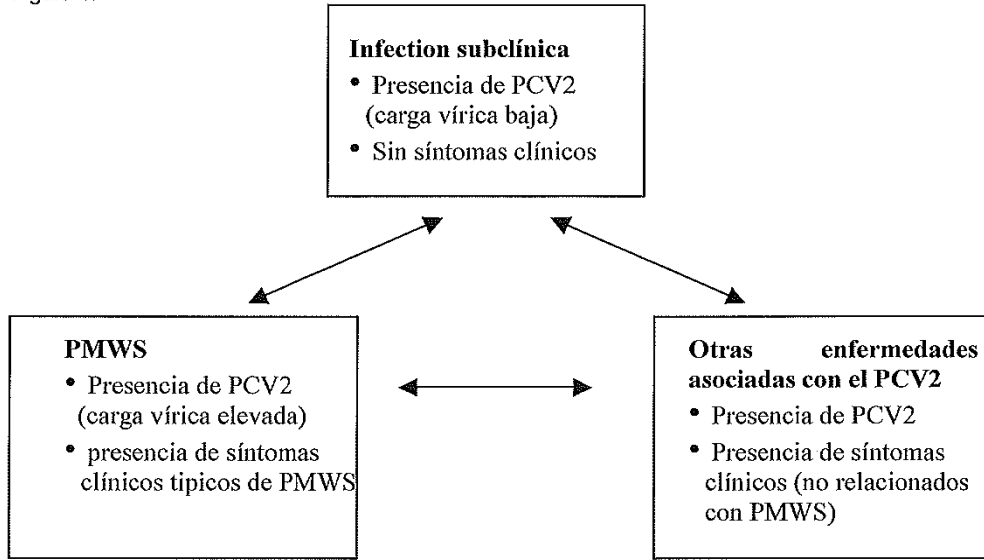


Figura 2:

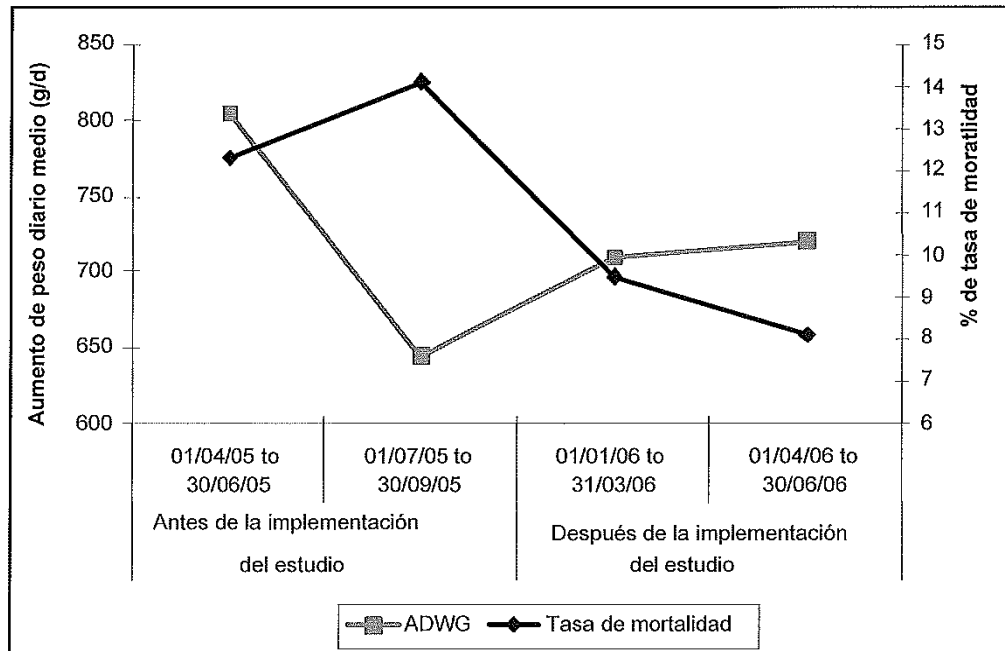


Figura 3:

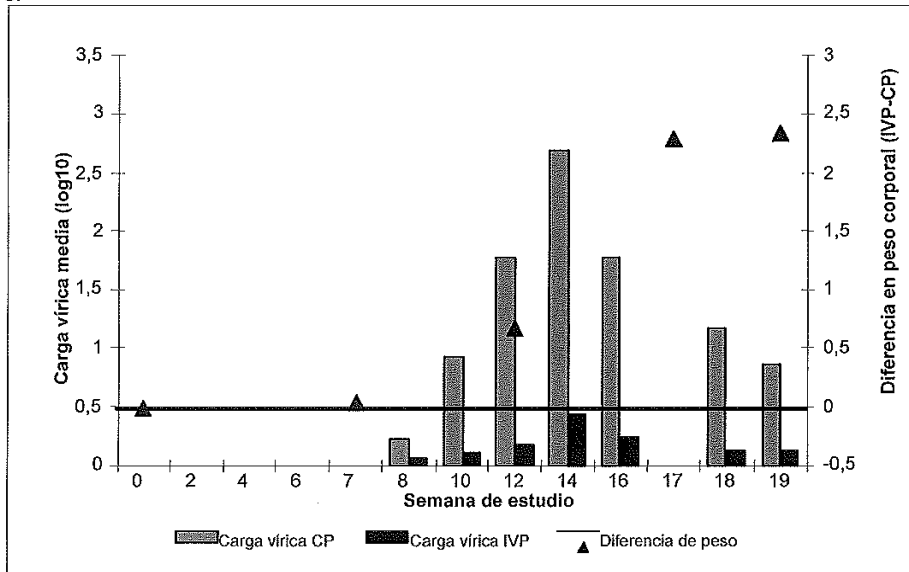


Figura 4:

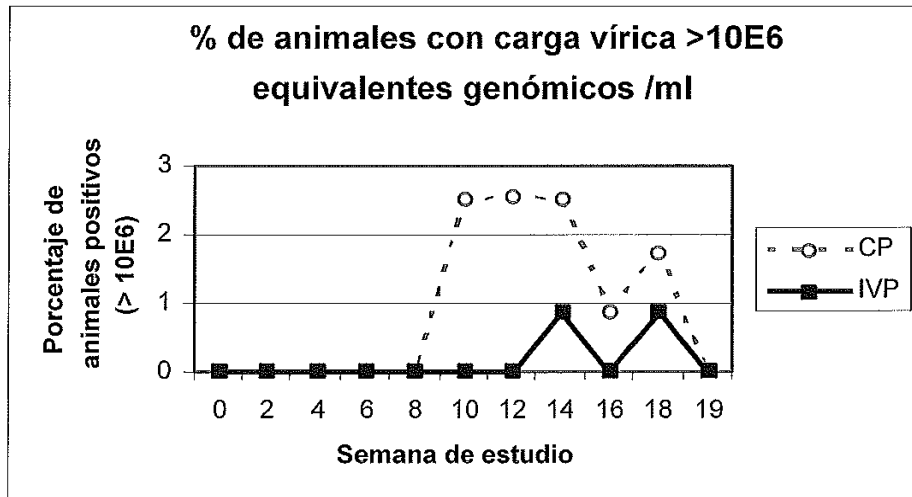




Figura 5:

