

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 861**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/01** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2005 E 10174465 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2281829**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas para PCV2 para uso en un método de prevenir una infección por PCV2**

30 Prioridad:

**30.12.2004 US 640510 P**

**13.01.2005 US 34797**

**29.12.2005 US 319975**

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

**01.04.2015**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**  
**(100.0%)**

**2621 North Belt Highway**  
**St. Joseph MO 64506-2002, US**

72 Inventor/es:

**EICHMEYER, MARC ALLAN;**  
**SCHAEFFER, MERRILL LYNN y**  
**NITZEL, GREG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 532 861 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunogénicas para PCV2 para uso en un método de prevenir una infección por PCV2

## 5 LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato papel y en formato legible por ordenador.

La presente invención proporciona:

- 10 [1] Una vacuna que comprende 4 a 400 µg/dosis de proteína ORF2 del PCV2 recombinante para uso en un método de prevenir una infección por PCV2 en un cerdo, en donde dicho método consiste en la administración de una dosis de dicha vacuna a dicho cerdo.
- [2] La vacuna de [1] para uso de acuerdo con [1], en donde dicha vacuna comprende un adyuvante.
- 15 [3] La vacuna de [1] o [2] para uso de acuerdo con [1] o [2], en donde dicho adyuvante se selecciona del grupo que consiste en polímeros de ácido acrílico o polímeros de ácido metacrílico.
- [4] La vacuna de [2] o [3] para uso de acuerdo con [2] o [3], en donde dicho adyuvante es un carbómero, preferiblemente un Carbopol.
- [5] La vacuna de uno cualquiera de [2] a [4] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [4], en donde dicho adyuvante comprende aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg de Carbopol por dosis.
- 20 [6] La vacuna de uno cualquiera de [1] a [5] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde dicha vacuna comprende 4 µg a 200 µg de proteína ORF2 del PCV2 recombinante.
- [7] Uso de una vacuna que comprende 4 a 400 µg/dosis de proteína ORF2 del PCV2 recombinante para la fabricación de un medicamento para uso en un método de prevenir una infección por PCV2 en un cerdo, en donde dicho método consiste en la administración de una dosis de dicha vacuna a dicho cerdo.
- 25 [8] El uso de [7], en donde dicha vacuna comprende un adyuvante.
- [9] El uso de [7] u [8], en donde dicho adyuvante se selecciona del grupo que consiste en polímeros de ácido acrílico o polímeros de ácido metacrílico.
- [10] El uso de [8] o [9], en donde dicho adyuvante es un carbómero, preferiblemente un Carbopol.
- 30 [11] El uso de uno cualquiera de [8] a [10], en donde dicho adyuvante comprende aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg de Carbopol por dosis.
- [12] El uso de uno cualquiera de [7] a [11], en donde dicha vacuna comprende 4 µg a 200 µg de proteína ORF2 del PCV2 recombinante.

35 Un aspecto de la presente divulgación se relaciona con la recuperación de una proteína expresada por el marco de lectura abierto 2 (ORF2) del circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Más particularmente, la proteína es una proteína recombinante expresada por un virus transfectado que contiene secuencias de codificación recombinantes del circovirus porcino tipo 2, el marco de lectura abierto 2. Aún más particularmente, se deja que el virus transfectado infecte células en un medio de crecimiento y la proteína expresada por el marco de lectura abierto 2 se recupera en el sobrenadante, y no del interior de las células. Más particularmente aún, el método comprende los pasos de

40 amplificar el gen del marco de lectura abierto 2 del circovirus porcino tipo 2, clonar esta porción amplificada en un primer vector, recortar la porción del marco de lectura abierto 2 de este primer vector y clonarla en un vector de transferencia, cotransfectar el vector de transferencia con un vector viral en células en un medio de crecimiento, lograr la infección de las células por el vector viral y de esa manera expresar el marco de lectura abierto 2 y recuperar la proteína recombinante expresada codificada por el marco de lectura abierto 2 en el sobrenadante.

45 En otro aspecto, la presente divulgación se relaciona con una composición inmunogénica eficaz para inducir una respuesta inmune contra PCV2 y con métodos para producir dicha composiciones inmunogénicas. Más particularmente, la presente divulgación se relaciona con una composición inmunológica eficaz para proveer una respuesta inmune que proteja a un animal que recibe la composición y reducir, o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2. Aún más particularmente, la presente divulgación se relaciona con una composición inmunológica basada en proteínas que confiera una protección eficaz contra una

50 infección por PCV2. Aún más particularmente, la presente divulgación se relaciona con una composición inmunológica que comprende el ORF2 de PCV2, en donde la administración de PCV2-ORF2 da como resultado la protección contra una infección por PCV2. Más particularmente, la presente divulgación se relaciona con una

55 composición inmunológica eficaz para conferir una inmunidad eficaz a porcinos que reciban la composición inmunológica y donde la composición comprende la proteína expresada por el ORF2 de PCV2.

Descripción de la Técnica Anterior

60 El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus a ADN pequeño (17-22 nm de diámetro), icosaédrico, desnudo o sin envoltura, que contiene un genoma circular de cadena simple. El PCV2 comparte un 80% de identidad de secuencia aproximadamente con el circovirus porcino de tipo 1 (PCV1). Sin embargo, a diferencia del PCV1, que en general no es virulento, los porcinos infectados con PCV2 presentan un síndrome conocido comúnmente como síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS). El PMWS se caracteriza clínicamente por desmedro o debilidad,

65 palidez de la piel, letargia, dificultad respiratoria, diarrea, ictericia e ictericia ligera. En algunos cerdos afectados, se evidencia una combinación de todos los síntomas, en tanto otros cerdos solamente presentan uno o dos de estos

síntomas. Durante la necropsia, también lesiones microscópicas y macroscópicas en diversos tejidos y órganos, siendo los órganos linfoides el sitio más común de las lesiones. Se ha observado una fuerte correlación entre la cantidad de antígeno o ácido nucleico PCV2 y la gravedad de las lesiones linfoides microscópicas. Los índices de mortalidad en los cerdos infectados con PCV2 pueden acercarse a tanto como un 80%. Además del PMWS, el PCV2 se ha asociado con otras diversas infecciones incluyendo pseudotuberculosis, síndrome reproductor y respiratorio de porcinos (PRRS), enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis de post-destete, hepatitis dietética y bronconeumonía supurante.

En el pasado, se ha utilizado la proteína del marco de lectura abierto 2 (ORF2) del PCV2, con un peso molecular aproximado de 30 kDa cuando se corre sobre un gel SDS-PAGE, como un componente antigénico en vacunas para PCV2. Los métodos típicos para obtener el ORF2 para su uso en dichas vacunas comprende en general amplificar el ADN que codifica el ORF2 del PCV2, transfectar un vector viral con el ADN del ORF2, infectar células con dicho vector viral que contiene el ADN del ORF2, permitir que el virus exprese la proteína ORF2 dentro de la célula y extraer la proteína ORF2 de la célula mediante lisis celular. Estos procedimientos generalmente demoran hasta cuatro días después de la infección de las células por el vector viral. Sin embargo, estos procedimientos tienen la desventaja que los procedimientos de extracción son costosos y también demoran mucho tiempo. Además, no se recupera una gran cantidad de ORF2 de las células; en consecuencia, es necesario infectar una gran cantidad de células con una gran cantidad de vectores virales con el fin de obtener cantidades suficientes de la proteína expresada recombinante para su uso en vacunas y semejantes.

Los enfoques actuales sobre inmunización contra PCV2 incluyen vacunas basadas en ADN, tales como las que se describen en la Patente de EEUU N° 6.703.023. Sin embargo, dichas vacunas han resultado ineficaces para conferir una inmunidad protectora contra una infección por PCV2 y los signos clínicos asociados con la misma.

Por consiguiente, persiste en la técnica la necesidad de un método para obtener una proteína ORF2, que no requiera extracción de la proteína ORF2 desde el interior de las células infectadas. También se necesitan métodos de obtención de la proteína ORF2 recombinante en cantidades suficientes como para preparar eficazmente composiciones de vacunas. Se necesitan asimismo métodos para obtener la proteína ORF2 que no comprendan los complicados y trabajosos métodos requeridos por los protocolos actuales de extracción de la proteína ORF2. Finalmente, con respecto a las composiciones, en la técnica se necesita una composición inmunogénica que confiera una inmunidad protectora contra una infección por PCV2 y que disminuya la severidad o permita prevenir los signos clínicos asociados con la misma.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención supera los problemas inherentes de la técnica anterior y provee un avance distintivo en el estado de la técnica. Específicamente, en esta memoria se describen métodos mejorados de producción y/o recuperación de la proteína ORF2 PCV2 recombinante, que **i)** permiten infectar de células susceptibles en cultivo con un vector viral recombinante que contiene secuencias de ADN codificantes de ORF2 PCV2, donde la proteína ORF2 es expresada por el vector viral recombinante, y **ii)** luego recuperar el ORF2 en el sobrenadante. Se ha descubierto inesperadamente que el ORF2 es liberado hacia el sobrenadante en grandes cantidades si se permite que la infección y subsiguiente incubación de las células infectadas avancen más allá del típico proceso de recuperación de ORF2 PCV2, que extrae al ORF2 PCV2 desde el interior de las células. También se ha encontrado sorprendentemente que la proteína ORF2 PCV es robusta frente a la degradación prototípica fuera de las células productoras. Ambos hallazgos juntos permiten recuperar grandes cantidades de proteína ORF2 del PCV2 del sobrenadante de cultivos celulares infectados con vectores virales recombinantes que contienen un ADN del ORF2 del PCV2 y expresan la proteína ORF2 del PCV2. Las grandes cantidades de proteína ORF2 del PCV2 mencionadas significan más de aproximadamente 20 µg/ml de sobrenadante, preferentemente más de aproximadamente 25 µg/ml, con mayor preferencia aún más de aproximadamente 30 µg/ml, con mayor preferencia aún más de aproximadamente 40 µg/ml, con mayor preferencia aún más de aproximadamente 50 µg/ml, con mayor preferencia aún más de aproximadamente 60 µg/ml, con mayor preferencia aún más de aproximadamente 80 µg/ml, con mayor preferencia aún más de aproximadamente 100 µg/ml, con mayor preferencia aún más de aproximadamente 150 µg/ml, más preferentemente más de 190 µg/ml aproximadamente. Dichos índices de expresión también se pueden lograr por ejemplo con los métodos descritos en los Ejemplos 1 a 3.

Cultivos celulares preferidos tienen una cuenta celular entre aproximadamente  $0,3-2,0 \times 10^6$  células/mL, más preferentemente entre aproximadamente  $0,35-1,9 \times 10^6$  células/mL, más preferentemente aún entre aproximadamente  $0,4-1,8 \times 10^6$  células/mL, aún más preferentemente entre aproximadamente  $0,45-1,7 \times 10^6$  células/mL y con mayor preferencia entre aproximadamente  $0,5-1,5 \times 10^6$  células/mL. Las células preferidas pueden ser determinadas por los especialistas en la técnica. Las células preferidas son aquellas que son susceptibles a una infección por un vector viral recombinante apropiado, que contiene el ADN de ORF2 del PCV2 y que expresa a la proteína ORF2 del PCV2. Preferentemente las células son células de insecto y más preferentemente incluyen las células de insecto comercializadas bajo el nombre comercial células de insecto Sf+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT).

El medio de crecimiento apropiado también será determinado por los especialistas en la técnica, siendo un medio de

crecimiento preferido un medio para células de insecto sin suero tal como Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) y semejantes. Vectores virales preferidos incluyen baculovirus, tal como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), en particular si la células productoras son células de insecto. Aunque se prefiere el sistema de expresión en baculovirus, los especialistas en la técnica comprenderán que existen otros sistemas de expresión que funcionarán a efectos de la presente invención, es decir, la expresión de ORF2 del PCV2 en el sobrenadante de un cultivo celular. Dichos otros sistemas de expresión pueden requerir el uso de una secuencia señal con el fin de lograr la expresión de ORF2 hacia el medio. Se ha descubierto sorprendentemente que cuando el ORF2 es producido por un sistema de expresión en baculovirus, no requiere de ninguna secuencia señal o modificación adicional para lograr la expresión de ORF2 hacia el medio. Se cree que esta proteína puede formar independientemente partículas de tipo virus (Journal of General Virology, Vol. 81, págs. 2281-2287 (2000) y ser secretada hacia el sobrenadante del cultivo. El vector viral recombinante que contiene las secuencias de ADN de ORF2 del PCV2 tiene una multiplicidad de infección (MOI) preferida que comprende entre 0,03-1,5 aproximadamente, más preferentemente entre 0,05-1,3 aproximadamente, más preferentemente aún entre 0,09-1,1 aproximadamente y con mayor preferencia entre 0,1-1,0 aproximadamente, cuando se usa para la infección de células susceptibles. Preferentemente, los valores de MOI mencionados precedentemente están relacionados con un mL de líquido de cultivo celular. Preferentemente, el método descrito en la presente comprende la infección de  $0,35-1,9 \times 10^6$  células/mL, más preferentemente aún de  $0,4-1,8 \times 10^6$  células/mL aproximadamente, aún más preferentemente de  $0,45-1,7 \times 10^6$  células/mL aproximadamente y con mayor preferencia de  $0,5-1,5 \times 10^6$  células/mL aproximadamente con un vector viral recombinante que contiene el ADN de ORF2 del PCV2 y que expresa la proteína ORF del PCV2 con una MOI (multiplicidad de infección) de 0,03-1,5 aproximadamente, más preferentemente de 0,05-1,3 aproximadamente, más preferentemente aún de 0,09-1,1 aproximadamente y con mayor preferencia de 0,1-1,0 aproximadamente.

Las células infectadas se incuban luego a lo largo de un período de hasta diez días, más preferentemente entre aproximadamente dos días y aproximadamente diez días, más preferentemente aún entre aproximadamente cuatro días y aproximadamente nueve días y con mayor preferencia entre aproximadamente cinco días y aproximadamente ocho días. Las condiciones de incubación preferidas incluyen una temperatura de 22-32°C aproximadamente, más preferentemente de 24-30°C aproximadamente, más preferentemente aún de 25-29°C aproximadamente, aún más preferentemente de 26-28°C aproximadamente y con mayor preferencia de 27°C aproximadamente. Preferentemente, las células Sf+ son observadas después de la inoculación por los cambios característicos inducidos por el baculovirus. Dicha observación puede incluir el monitoreo de la tendencia de la densidad celular y la disminución de la viabilidad durante el período de post-infección. Se encontró que se observa un pico del título viral 3-5 días después de la infección y se obtiene una liberación pico de ORF2 de las células hacia el sobrenadante entre los días 5 y 8 y/o cuando la viabilidad celular disminuye a menos de un 10%.

Por lo tanto, se describe en esta memoria un método mejorado para producir y/o recuperar una proteína ORF2 del PCV2 recombinante, preferentemente en las cantidades descritas precedentemente, que i) permiten infectar numerosas células susceptibles (véase antes) en cultivo con un vector viral recombinante con la MOI definida precedentemente, ii) expresar la proteína ORF2 del PCV2 por el vector viral recombinante y iii) a continuación recuperar el ORF2 del PCV2 en el sobrenadante de las células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o cuando la viabilidad celular disminuye a menos del 10%. Preferentemente, el vector viral recombinante es un baculovirus recombinante que contiene secuencias de ADN codificantes de ORF2 del PCV2 y las células son células Sf+. Además, se prefiere examinar periódicamente el cultivo por evidencia macroscópica y microscópica de contaminación o por cambios atípicos en la morfología celular durante el período de post-infección. Todo cultivo que exhiba alguna clase de contaminación debe ser descartado. Preferentemente, la proteína ORF2 recombinante expresada es secretada por las células hacia el medio de crecimiento circundante que mantiene la viabilidad celular. La ORF2 es recuperada luego en el sobrenadante que rodea a las células en lugar de las propias células.

El proceso de recuperación comienza preferentemente con la separación de los desechos celulares de la ORF2 expresada en el medio mediante un paso de separación. Etapas de separación preferidas incluyen filtración, centrifugación a velocidades de hasta 20.000 xg aproximadamente, centrifugación de flujo continuo, separación cromatográfica usando métodos convencionales de intercambio iónico o filtración a través de gel e inmunoafinidad. Dichos métodos son conocidos por los especialistas en la técnica p.ej. según (Harris y Angel (eds.), Protein purification methods-a practical approach, IRL press Oxford 1995). Los métodos de separación más preferidos incluyen centrifugación a velocidades de hasta 20.000 xg aproximadamente y filtración. Los métodos de filtración preferidos incluyen microfiltración frontal o de flujo perpendicular y filtración de flujo tangencial (o de flujo cruzado) incluyendo filtración con membranas de fibras huecas, microfiltración frontal. Entre los métodos mencionados, se prefiere la microfiltración frontal. Los tamaños de poro preferidos para la microfiltración frontal son de 0,30-1,35  $\mu\text{m}$  aproximadamente, más preferentemente de 0,35-1,25  $\mu\text{m}$  aproximadamente, más preferentemente aún de 0,40-1,10  $\mu\text{m}$  aproximadamente y con mayor preferencia de 0,45-1,0  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Se cree que cualquier membrana de filtración convencional funcionará a los efectos de la presente invención y se prefieren las membranas de poliétersulfona. Se elimina todo ácido nucleico de bajo peso durante la etapa de filtración.

Por lo tanto, se describe en esta memoria un método mejorado para producir y/o recuperar proteína ORF2 del PCV2 recombinante, preferentemente en las cantidades descritas precedentemente, que i) permiten infectar numerosas células susceptibles (véase antes) en cultivo con un vector viral recombinante con la MOI definida precedentemente,

- 5 **ii)** expresar la proteína ORF2 del PCV por el vector viral recombinante, **iii)** recuperar la ORF2 del PCV2 en el sobrenadante de células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o cuando la viabilidad celular disminuye a menos del 10% y **iv)** separar los desechos celulares de la ORF2 del PCV2 expresado a través de una etapa de separación. Preferentemente, el vector viral recombinante es un baculovirus que contiene las secuencias de ADN codificantes de la ORF2 y las células son células Sf+. Las etapas de separación preferidas son las que se describieron precedentemente. Más preferida es la microfiltración frontal usando una membrana con un tamaño de poro de 0,30-1,35  $\mu\text{m}$  aproximadamente, más preferentemente de 0,35-1,25  $\mu\text{m}$  aproximadamente, más preferentemente aún de 0,40-1,10  $\mu\text{m}$  aproximadamente y con mayor preferencia de 0,45-1,0  $\mu\text{m}$  aproximadamente.
- 10 Para recuperar la ORF2 del PCV2 que se usará en una composición inmunogénica o inmunológica tal como una vacuna, se prefiere incluir un paso de inactivación con el fin de inactivar el vector viral. Una "composición inmunogénica o inmunológica" se refiere a una composición de materia que comprende al menos un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunológica en el huésped celular y/o una respuesta inmune mediada por un anticuerpo contra la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmunológica" incluye, a modo de
- 15 ejemplo, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T yd, dirigidos específicamente contra uno o más antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el huésped expresará ya sea una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de modo tal que mejora la resistencia a una nueva infección y/o se reduce la severidad clínica de la enfermedad. Dicha protección quedará demostrada ya sea por una reducción o
- 20 falta de los síntomas normalmente expresados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un menor título viral en el huésped infectado. Por lo tanto, también se describe en esta memoria un método para producir y/o recuperar la proteína ORF2 del PCV2 recombinante, preferentemente en las cantidades descritas precedentemente, que **i)** permiten infectar numerosas células susceptibles (véase antes) en cultivo con un vector viral recombinante con la MOI definida precedentemente, **ii)** expresar la proteína ORF2 del PCV por el vector viral recombinante, **iii)** recuperar la ORF2 del PCV2 en el sobrenadante de las células obtenidas entre los días 5 y 8
- 25 después de la infección y/o cuando la viabilidad celular disminuye a menos del 10%, **iv)** separar los desechos celulares de la ORF2 del PCV2 expresado a través de una etapa de separación y **v)** inactivar el vector viral recombinante.
- 30 Preferentemente, esta inactivación tiene lugar justo antes o justo después de la etapa de filtración, donde el momento de inactivación preferido es después de la etapa de filtración. Se puede usar cualquier método de inactivación convencional a los efectos de la presente invención. Por consiguiente, la inactivación se puede efectuar mediante tratamientos químicos y/o físicos. En las formas preferidas, se determina el volumen de los líquidos de cosecha y la temperatura se lleva a un valor de 32-42°C aproximadamente, más preferentemente de 34-40°C
- 35 aproximadamente y con mayor preferencia de 35-39°C aproximadamente. Los métodos de inactivación preferidos incluyen la adición de etilenimina binaria ciclada (BEI), preferentemente a una concentración entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mM, preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mM, más preferentemente aún entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 mM, más preferentemente aún entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7 mM, con mayor preferencia de aproximadamente 5 mM. Por ejemplo, la inactivación incluye la adición de una solución de bromhidrato de 2-bromoetilenamina, preferentemente a 0,4 M
- 40 aproximadamente, que ha sido ciclada a etilenimina binaria (BEI) 0,2 M en NaOH 0,3N, a los líquidos para obtener una concentración final de BEI de 5 mM aproximadamente. Preferentemente, los líquidos se agitan luego de forma continua durante 72-96 horas y los líquidos de cosecha inactivados se pueden guardar congelados a -40°C o menos o a 1-7°C aproximadamente. Una vez completada la inactivación se agrega una solución de tiosulfato de sodio, preferentemente a 1,0 M, para neutralizar toda la BEI residual. Preferentemente, el tiosulfato de sodio se agrega en una cantidad equivalente en comparación con la cantidad de BEI que se agregó antes para la inactivación. Por
- 45 ejemplo, en el caso de agregar BEI a una concentración final de 5 mM, se agrega una solución de tiosulfato de sodio 1,0 M para obtener una concentración mínima final 5 mM para neutralizar todo BEI residual.
- 50 Por lo tanto, también se describe en esta memoria un método para producir una proteína ORF2 del PCV2 recombinante, preferentemente en las cantidades descritas precedentemente, que **i)** permite infectar numerosas células susceptibles (véase antes) en cultivo con un vector viral recombinante con la MOI definida precedentemente, **ii)** expresar la proteína ORF2 del PCV por el vector viral recombinante, **iii)** recuperar la ORF2 del PCV2 en el sobrenadante de células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o cuando la viabilidad celular
- 55 disminuye a menos del 10%, **iv)** separar los desechos celulares de la ORF2 del PCV2 expresado mediante una etapa de separación y **v)** inactivar el vector viral recombinante. Preferentemente, el vector viral recombinante es un baculovirus que contiene secuencias de ADN codificantes de la ORF2 y las células son células Sf+. Las etapas de separación preferidas son las que se describieron precedentemente, siendo más preferida la etapa de filtración. Las etapas de inactivación preferidas son las descritas precedentemente. Preferentemente, la inactivación se efectúa
- 60 entre 35-39 °C aproximadamente y en presencia de BEI 2 a 8 mM, con mayor preferencia aún en presencia de BEI 5 mM aproximadamente. Se ha encontrado, sorprendentemente, que concentraciones mayores de BEI afectan negativamente a la proteína ORF2 del PCV2.
- 65 El método descrito precedentemente también puede incluir una etapa de neutralización después de la etapa **v)**. Esta etapa **vi)** comprende la adición de una cantidad equivalente de un agente capaz de neutralizar al agente de inactivación en la solución. Preferentemente, si el agente de inactivación es BEI, se prefiere la adición de una

cantidad equivalente de tiosulfato de sodio. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la etapa **vi**) comprende la adición de una solución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mM, preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mM, más preferentemente aún entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 mM, más preferentemente aún entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7 mM, con mayor preferencia de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI.

En realizaciones preferidas y especialmente en las realizaciones que emplearán a la proteína ORF2 del PCV2 recombinante en una composición inmunogénica tal como una vacuna, se evaluará la inactivación de cada lote de ORF2 cosechado mediante pasajes en las células Sf+ susceptibles a baculovirus, dependiente de anclaje. En una realización preferida de esta evaluación, se inocula 150 cm<sup>2</sup> de una monocapa de cultivo celular apropiado con 1,0 mL de líquidos de PCV2 inactivados y se mantiene a 25-29°C durante 14 días con al menos dos pasajes. A final del período de mantenimiento, se examinan las monocapas de células por los efectos citopatogénicos (CPE) típicos de baculovirus de ORF2 del PCV2. Preferentemente, también se utilizan controles virales positivos. Dichos controles pueden consistir en un cultivo de células Sf+ inoculadas con un baculovirus de ORF2 del PCV2 no inactivado de referencia y un frasco de células Sf+ sinocular. Después de la incubación y el pasaje, la ausencia de células infectadas con virus para los líquidos virales tratados con BEI constituye una prueba de inactivación satisfactoria. Las células control inoculadas con el virus de referencia deberían exhibir los CPE típicos del baculovirus de ORF2 del PCV2 y el frasco no inoculado no debería mostrar evidencia alguna de CPE de baculovirus de ORF2 del PCV2. Como alternativa, al final del período de mantenimiento, se podrían recolectar muestras de sobrenadante e inocularlas sobre una placa de 96 cavidades Sf+, que fue cargada con células Sf+, y luego mantenerlas a 25-29°C por 5-6 días. A continuación, la placa se fija y se tiñe con anticuerpo anti-ORF2 del PCV2 conjugado con FITC. La ausencia de CPE y la expresión de ORF2, detectados por microscopía IFA, en los líquidos virales tratados con BEI constituye una prueba de inactivación satisfactoria. Las células control inoculadas con el virus de referencia debería exhibir CPE y actividad IFA y el frasco no inoculado no debería presentar evidencia alguna de los CPE de baculovirus de ORF2 del PCV2 ni actividad IFA.

Por lo tanto, también se describe en esta memoria una prueba de inactivación para determinar la eficacia de la inactivación del vector viral recombinante, que comprende las etapas de: **i**) poner al menos una porción del líquido de cultivo que contiene al vector viral recombinante en contacto con un agente de inactivación, preferentemente el descrito precedentemente, **ii**) agregar un agente de neutralización para neutralizar al agente de inactivación, preferentemente el descrito precedentemente y **iii**) determinar la infectividad residual con los ensayos descritos precedentemente.

Después de la inactivación, se puede determinar la cantidad relativa de proteína ORF2 del PCV2 recombinante en una muestra de numerosas maneras. Métodos de cuantificación preferidos incluyen densitometría por SDS-PAGE, ELISA y estudios de vacunación en animales que correlacionan cantidades conocidas de vacuna con los resultados clínicos (serología, etc.). Cuando se utiliza SDS-PAGE para la cuantificación, el material de muestra que contiene una cantidad desconocida de proteína ORF2 del PCV2 recombinante se corre sobre un gel, junto con muestras que contienen diferentes cantidades conocidas de proteína ORF2 del PCV2 recombinante. Luego se puede trazar una curva estándar basado en las muestras conocidas y determinar la cantidad de ORF2 del PCV2 recombinante en la muestra desconocida por comparación con esta curva estándar. Dado que los ELISA son reconocidos en general como el estándar de la industria para la cuantificación de antígeno, constituyen los métodos preferidos para la cuantificación.

Por lo tanto, también se describe en esta memoria un ELISA para la cuantificación de la proteína ORF2 del PCV2 recombinante. El ELISA preferido provisto en la presente generalmente comienza con una dilución 1:6000 del anticuerpo de captura o una dilución de trabajo apropiada en solución amortiguadora de recubrimiento. El anticuerpo de captura preferido es el anti-PAb Prot. G PCV2 de cerdo purificado y la solución amortiguadora de recubrimiento preferida es una solución amortiguadora de carbonato 0,05 M, que se puede elaborar combinando 2,93 g de NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, N° Cat. S-6014 o su equivalente) y 1,59 g de NaCO<sub>3</sub> (Sigma, N° Cat. S-6139 o su equivalente). La mezcla se combina con agua destilada, o su equivalente, para obtener un litro a un pH de 9,6 ± 0,1. A continuación, el anticuerpo de captura se diluye 1:6000, o cualquier otra dilución de trabajo apropiada, en solución amortiguadora de recubrimiento. Por ejemplo, para cuatro placas, se necesitarán 42 mL de solución amortiguadora de recubrimiento y siete µL de anticuerpo de captura. Con el método de pipeteo inverso, se agregan 100 µL de anticuerpo de captura diluido a todos los pocillos. Con el fin de obtener un recubrimiento homogéneo, se deben golpear suavemente los lados de cada placa. Las placas se sellan luego con selladores de placa, antes de apilar las placas y terminar la pila con una placa de 96 pocillos vacía. Las placas se incuban luego durante la noche (14-24 horas) a 35-39°C. Después, cada placa se lava tres veces con solución amortiguadora de lavado usando el lavador de placas para microtitulación UltraWash Plus definido en 250 µL/lavado con tres lavado y sin tiempo de remojo. Después del último lavado, las placas se golpean suavemente sobre una toalla de papel. Nuevamente, usando la técnica de pipeteo inverso, se deberían agregar 250 µL de solución de bloqueo a todos los pocillos. Las placas de prueba se sellan y se incuban durante una hora aproximadamente (± cinco minutos) a 35-37°C. Preferentemente, las placas no se apilarán después de esta etapa. Durante la etapa de bloqueo se deben extraer todas las muestras de prueba y descongelarlas a temperatura ambiente. A continuación, se deben preparar cuatro placas de dilución separadas por adición de 200 µL de solución de diluyente a todos los pocillos restantes, excepto la fila A y la fila H,

columnas 1-3. A continuación, se rotularán seis tubos de ensayo de la siguiente manera, título bajo, título medio, título alto, inactivado/filtrado (1:240), inactivado/filtrado (1:480) y control interno. En los tubos indicados, se debe preparar la dilución apropiada para las siguientes muestras de prueba. Las muestras de prueba descongeladas deben ser agitadas por vortexeo antes del uso. Para cuatro placas, se efectuarán las siguientes diluciones: A) el título bajo no será pre-diluido: 3,0 mL de título bajo; B) control negativo a una dilución 1:30 (células SF+): 3,77 mL de diluyente + 130  $\mu$ L de control negativo; C) título medio a una dilución 1:30 (8  $\mu$ g/mL): 3,77 mL de diluyente + 130  $\mu$ L de título medio; D) título alto a una dilución 1:90 (16  $\mu$ g/mL): 2,967 mL de diluyente + 33  $\mu$ L de título alto; E) inactivado/filtrado a una dilución 1:240: 2,39 mL de diluyente + 10  $\mu$ L de muestra inactivada/filtrada; F) inactivado/filtrado a una dilución 1:480: 1,0 mL de diluyente + 1,0 mL de inactivado/filtrado (1:240) preparada con una muestra de E anterior; G) control interno a una dilución 1:30: 3,77 mL de diluyente + 130  $\mu$ L de control interno. A continuación, se agregan 300  $\mu$ L de las muestras preparadas a los correspondientes pocillos vacíos en las placas de dilución para las placas 1 a 4. Luego se define el pipeteador automático de múltiples canales en 100  $\mu$ L y el contenido de la fila A se mezcla mediante pipeteo hacia arriba y abajo al menos 5 veces y luego se transfieren 100  $\mu$ L a la fila B usando la técnica de pipeteo inverso. Se deben cambiar las puntas y avanzar por la placa utilizando este mismo procedimiento hasta la fila G. Ahora las muestras en estas placas de dilución están listas para su transferencia a las placas de prueba una vez lavadas dichas placas de prueba 3 veces con solución amortiguadora de lavado usando el lavador de placas para microtitulación UltraWash Plus (ajustes en 250  $\mu$ L/lavado, 3 lavados, sin tiempo de remojo). Después del último lavado, las placas se golpearán suavemente sobre una toalla de papel. A continuación, se transfiere el contenido de la placa de dilución a la placa de prueba usando un procedimiento de transferencia simple. Más específicamente, comenzando por la fila H, se transfieren 100  $\mu$ L/pocillo de la(s) placa(s) de dilución a los correspondientes pocillos de la(s) placa(s) de prueba usando la técnica de pipeteo inverso. Se deben cambiar las puntas de pipeta después de cada transferencia. De la fila G, se transfieren 100  $\mu$ L/pocillo de la(s) placa(s) de dilución a los correspondientes pocillos de la(s) placa(s) de prueba usando la técnica de pipeteo inverso. Se puede emplear el mismo juego de puntas de pipeta para las transferencias restantes. Para asegurar una solución homogénea para la transferencia, la solución debe pipetearse hacia arriba y abajo al menos 3 veces antes de la transferencia. A continuación, las(s) placa(s) de prueba se sella(n) y se incuba(n) durante 1,0 hora  $\pm$  5 minutos a 37 °C  $\pm$  2,0°C. Nuevamente, es preferible no apilar las placas. Las placas se lavan luego 3 veces con solución amortiguadora de lavado usando el lavador de placas para microtitulación UltraWash Plus (ajustes en 250  $\mu$ L/lavado, 3 lavados y sin tiempo de remojo). Después del último lavado, las placas se golpean suavemente sobre una toalla de papel. Con la técnica de pipeteo inverso, se agregan 100  $\mu$ L de anticuerpo de detección diluido 1:300, o una dilución de trabajo apropiada, en solución diluyente a todas las cavidades de la(s) placa(s) de prueba. Por ejemplo, para cuatro placas, se necesitarán 42 mL de solución diluyente con 140  $\mu$ L de anticuerpo de captura. La(s) placa(s) de prueba se sella(n) y se incuba(n) durante 1,0 hora  $\pm$  5 minutos a 37°C  $\pm$  2,0°C. Nuevamente, las placas se lavan 3 veces con solución amortiguadora de lavado usando el lavador de placas para microtitulación UltraWash Plus (ajustes en 250  $\mu$ L/lavado, 3 lavados y sin tiempo de remojo). Después del último lavado, las placas se golpean suavemente sobre una toalla de papel. A continuación, se prepara el diluyente de conjugación por adición de suero de conejo normal 1% al diluyente. Por ejemplo, para cuatro placas, se agregan 420  $\mu$ L de suero de conejo normal a 42 mL de diluyente. El anticuerpo conjugado es diluido a 1:10.000, o cualquier otra dilución de trabajo apropiada, en una solución diluyente de conjugación recién preparada para todos los pocillos de la(s) placa(s) de prueba. Con la técnica de pipeteo inverso, se agregan 100  $\mu$ L de este anticuerpo conjugado diluido a todos los pocillos. La(s) placa(s) de prueba se sella(n) y se incuba(n) durante 45  $\pm$  5 minutos a 37°C  $\pm$  2,0°C. Preferentemente, no se apilan las placas. Las placas se lavan luego 3 veces con solución amortiguadora de lavado usando el lavador de placas para microtitulación UltraWash Plus (ajustes en 250  $\mu$ L/lavado, 3 lavados y sin tiempo de remojo). Después del último lavado, las placas se golpean suavemente sobre una toalla de papel. A continuación, se mezclan volúmenes iguales de sustrato de peroxidasa TMB (reactivo A) con solución de peroxidasa B (reactivo B) inmediatamente antes del uso. La cantidad mezclada varía según la cantidad de placas, pero cada placa necesitará 10 mL/placa  $\pm$  2 mL. Por ello, para 4 placas, serán 21 mL de reactivo A + 21 mL de reactivo B. Con la técnica de pipeteo inverso, se agregan 100  $\mu$ L de sustrato a todas las cavidades de la(s) placa(s) de prueba. Las placas se incuban luego a temperatura ambiente durante 15 minutos  $\pm$  15 segundos. La reacción se detiene por la adición de 100  $\mu$ L de solución de HCl 1 N a todas los pocillos usando la técnica de pipeteo inverso. Luego se enciende el lector de placas de ELISA y se deja que proceda por las fases de diagnóstico y evaluación de manera convencional.

También se describe en esta memoria un método para construir un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 del PCV2 y expresar la proteína ORF2 del PCV2 en grandes cantidades, cuando infectan células susceptibles. Se ha encontrado sorprendentemente que el vector viral recombinante provisto en la presente expresa grandes cantidades, definidas precedentemente, de ORF2 del PCV2 después de infectar células susceptibles. Por lo tanto, también se describe en esta memoria un método mejorado para producir y/o recuperar la proteína ORF2 del PCV2, que preferentemente comprende la etapa de: construir un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 del PCV2 y expresar la proteína ORF2 del PCV2. Preferentemente, el vector viral es un baculovirus recombinante. A continuación se describirán los detalles del método para construir vectores virales recombinantes que contienen ADN de ORF2 del PCV2 y para expresar la proteína ORF2 del PCV2, provista en la presente: En realizaciones preferidas, el vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 del PCV2 y expresa la proteína ORF2 del PCV2 usado para infectar las células es generado por transfección de un vector de transferencia, que contiene un gen ORF2 clonado en el mismo, en un vector viral. Preferentemente, solamente se transfecta al vector viral la porción del vector de transferencia que contiene ADN de ORF2. La expresión "transfectado en un vector viral" significa, y se usa como sinónimo de, "introducir" o "clonar" un ADN heterólogo en un vector viral, tal como por

ejemplo en un vector de baculovirus. El vector viral es preferentemente, aunque no necesariamente un baculovirus.

Por lo tanto, el vector viral recombinante puede ser generado por recombinación entre un vector de transferencia que contiene ADN heterólogo de ORF2 del PCV2 y un vector viral, preferentemente un baculovirus, aún más preferentemente un baculovirus linearizado de replicación deficiente (tal como BaculoGold DNA). Un “vector de transferencia” se refiere a una molécula de ADN, que incluye al menos un origen de replicación, el gen heterólogo, en este caso la ORF2 del PCV2, y secuencias de ADN que permiten la clonación de dicho gen heterólogo en el vector viral. Preferentemente, las secuencias que permiten clonar un gen heterólogo en el vector viral flanquean al gen heterólogo. Aún más preferentemente, dichas secuencias flanqueadoras son homólogas, al menos en parte, de secuencias del vector viral. La homología de secuencia permite entonces la recombinación de ambas moléculas, el vector viral y el vector de transferencia, para generar un vector viral recombinante que contiene al gen heterólogo. Un vector de transferencia preferido es el vector pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen), diseñado para la cotransfección con el BaculoGold DNA en la línea de células Sf+ preferida. Preferentemente, dicho vector de transferencia comprende ADN de ORF2 del PCV2. La construcción cotransfectada es de 10.387 pares de bases aproximadamente de longitud.

En realizaciones más preferidas, los métodos descritos en esta memoria comienzan con el aislamiento de ADN de ORF2 del PCV2. Generalmente, este puede provenir de una cepa conocida o desconocida ya que el ADN de ORF2 parece estar altamente conservado, con al menos un 95% de identidad de secuencia aproximadamente entre las diferentes formas aisladas. Se puede utilizar cualquier gen ORF2 PCV2 conocido en la técnica a los efectos de la presente invención, ya que cada uno se expresará en el sobrenadante. El ADN de ORF2 del PCV se amplifica empleando preferentemente métodos de PCR, con mayor preferencia aún junto con la introducción de la secuencia consenso de Kozak flanqueadora 5' (CCGCCAUG) (SEQ ID N°: 1) y/o un sitio EcoR1 flanqueador 3' (GAATTC) (SEQ ID N°: 2). Dicha introducción del consenso de Kozak 5' elimina preferentemente el codón de inicio natural AUG de ORF2 del PCV2. El sitio EcoR1 3' se introduce preferentemente 3' con respecto al codón de terminación de ORF2 del PCV2. Más preferentemente, se introduce 3' con respecto a una secuencia de terminación de la transcripción poli A, donde dicha secuencia está ubicada 3' con respecto al codón de terminación de ORF2 del PCV2. Se ha encontrado que el uso de la secuencia consenso de Kozak, en particular la que se describió precedentemente, incrementa el nivel de expresión de la subsiguiente proteína ORF2 del PCV2. El ADN de ORF2 del PCV2 amplificado, con estas secuencias adicionales, es clonado en un vector. Un vector preferido para este paso de clonación inicial es el vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). El ADN de ORF2 del PCV2 que incluye algunas secuencias del vector pGEM (SEQ ID N°: 7) se recorta preferentemente del vector en el sitio de restricción Not1. El ADN resultante se clona luego en el vector de transferencia.

Por lo tanto, se describe en esta memoria un método para construir un vector viral recombinante que contiene al ADN del ORF2 PCV2. Este método comprende las etapas de: **i)** clonar un ORF2 PCV2 recombinante en un vector de transferencia; y **ii)** transfectar la porción del vector de transferencia que contiene a ORF2 del PCV2 recombinante en un vector viral, para generar el vector viral recombinante. Preferentemente, el vector de transferencia es el que se describió precedentemente o se construye como se describió precedentemente o como se muestra a modo de ejemplo en la figura 1. Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto adicional, el vector de transferencia, usado para la construcción del vector viral recombinante descrito en la presente, contiene la secuencia de la SEQ ID N°: 7.

De acuerdo con un aspecto adicional, este método comprende además antes de la etapa **i)** la siguiente etapa: amplificar el ADN de ORF2 del PCV2 *in vitro*, donde las secuencias flanqueadoras del ADN de ORF2 del PCV2 fueron modificadas como se describió precedentemente. Los métodos *in vitro* para amplificar el ADN de ORF2 del PCV2 y modificar las secuencias flanqueadoras, clonar *in vitro* el ADN de ORF2 del PCV2 amplificado en un vector de transferencia y los vectores de transferencia adecuados se describieron precedentemente, se muestran a modo de ejemplo en la figura 1, o son conocidos por los especialistas en la técnica. Por lo tanto, se describe además en esta memoria un método para construir un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 del PCV2 y expresar la proteína ORF2 del PCV2 que comprende las etapas de: **i)** amplificar ADN de ORF2 del PCV2 *in vitro*, donde las secuencias flanqueadoras de dicho ADN de ORF2 del PCV2 están modificadas, **ii)** clonar el ADN de ORF2 del PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y **iii)** transfectar el vector de transferencia, o una porción del mismo que contiene al ADN de ORF2 del PCV2 recombinante, en un vector viral para generar el vector viral recombinante. Preferentemente, la modificación de las secuencias flanqueadoras del ADN de ORF2 del PCV2 se efectúa como se describió precedentemente, por ejemplo introduciendo una secuencia Kozak 5' y/o un sitio EcoR1, preferentemente como se describió precedentemente.

De acuerdo con un aspecto adicional, se provee un método para producir y/o recuperar la proteína recombinante expresada por el marco de lectura abierto 2 del PCV2. El método comprende en general las etapas de: **i)** clonar un ORF2 del PCV2 recombinante en un vector de transferencia; **ii)** transfectar la porción del vector de transferencia que contiene al ORF2 del PCV2 recombinante en un virus; **iii)** infectar células en un medio con el virus transfectado; **iv)** lograr que el virus transfectado exprese la proteína recombinante de la ORF2 del PCV2; **v)** separar las células del sobrenadante; y **vi)** recuperar la proteína ORF2 del PCV2 expresada del sobrenadante.

Los métodos de cómo clonar un ADN de ORF2 del PCV2 recombinante en un vector de transferencia fueron descritos precedentemente. Preferentemente, el vector de transferencia contiene a la secuencia de las SEQ ID N°:3,

SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:7. Sin embargo, el vector de transferencia puede contener cualquier ADN de ORF2 del PCV2, modificado o no modificado, siempre que el ADN de ORF2 del PCV2, cuando es transfectado en un vector viral recombinante, sea expresado en un cultivo celular. Preferentemente, el vector viral recombinante comprende la secuencia de la SEQ ID N°:8. Más aún, los métodos para infectar linfocitos T, preferentemente para infectar linfocitos T de insecto con un número definido de baculovirus recombinantes que contienen ADN de ORF2 del PCV2 y para expresar la proteína ORF2 del PCV2 se describieron precedentemente con mayor detalle. Más aún, las etapas de separación de las células del sobrenadante así como las etapas de recuperación de la proteína ORF2 del PCV2 expresada también se describieron precedentemente con detalle. Todas estas etapas de proceso específicas, descritas en la presente, forman parte del método para producir y/o recuperar la proteína recombinante expresada por el marco de lectura abierto 2 de PCV2 según se describió precedentemente. Preferentemente, las células son células Sf+. Más preferentemente aún, los cultivos celulares presentan un recuento celular de  $0,3-2,0 \times 10^6$  células/mL aproximadamente, más preferentemente de  $0,35-1,9 \times 10^6$  células/mL aproximadamente, más preferentemente aún de  $0,4-1,8 \times 10^6$  células/mL aproximadamente, aún más preferentemente de  $0,45-1,7 \times 10^6$  células/mL aproximadamente y con mayor preferencia de  $0,5-1,5 \times 10^6$  células/mL aproximadamente. Preferentemente, el vector viral recombinante que contiene al ADN de ORF2 del PCV2 tiene una multiplicidad de infección (MOI) preferida de 0,03-1,5 aproximadamente, más preferentemente de 0,05-1,3 aproximadamente, más preferentemente aún 0,09-1,1 aproximadamente, más preferentemente aún de 0,1-1,0 aproximadamente y con mayor preferencia de 0,5 aproximadamente, cuando se usa para la infección de las células susceptibles. Preferentemente, la proteína ORF2 del PCV2 se recupera del sobrenadante celular obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o cuando la viabilidad celular disminuye a menos del 10%. Preferentemente, para producir la proteína ORF2 del PCV2, las células se cultivan a 25-29°C. Preferentemente, la etapa de separación es una etapa de centrifugación o de filtración.

Opcionalmente, este método puede incluir la etapa de amplificar el ADN de ORF2 del PCV2 a partir de una cepa de PCV2 antes de clonar el ADN de ORF2 del PCV2 en el vector de transferencia. En realizaciones preferidas, también se puede agregar una secuencia de Kozak 5', un sitio EcoR1 3' y combinaciones de los mismos, a la secuencia amplificada, preferentemente antes o durante la amplificación. La secuencia de Kozak 5' preferida comprende la SEQ ID N°: 1. El sitio EcoR1 3' preferido comprende la SEQ ID N°: 2. El ADN de ORF2 del PCV2 preferido comprende la secuencia de nucleótidos de Genbank, N° Acceso AF086834 (SEQ ID N°: 3) y SEQ ID N°: 4. La proteína ORF2 del PCV2 recombinante preferida comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5, que es la proteína codificada por la SEQ ID N°: 3 (Genbank, N° Acceso AF086834) y la SEQ ID N°: 6, que es la proteína codificada por la SEQ ID N°: 4. El medio preferido comprende medio para células de insecto sin suero, más preferentemente aún el medio Excell 420. Cuando se efectúa la etapa de amplificación opcional, se prefiere clonar primero el marco de lectura abierto 2 amplificado en un primer vector, recortar el marco de lectura abierto 2 de dicho primer vector y usar el marco de lectura abierto recortado para su clonación en el vector de transferencia. La línea celular preferida para la cotransfección es la línea celular SF+. El virus preferido para la cotransfección es el baculovirus. En realizaciones preferidas de este método, la porción transfectada del vector de transferencia comprende la SEQ ID N°: 8. Finalmente, para este método, se prefiere recuperar la proteína del marco de lectura abierto 2 (ORF2) del PCV2 en el sobrenadante del cultivo celular al menos 5 días después de infectar las células con el virus.

Por lo tanto, se describe además en esta memoria un método para producir y/o recuperar el marco de lectura abierto 2 del PCV2, que comprende las etapas de: **i)** amplificar el ADN de ORF2 del PCV2 *in vitro*, preferentemente por adición de una secuencia Kozak 5' y/o por adición de un sitio de restricción EcoR1 3', **ii)** clonar la ORF2 del PCV2 amplificado en un vector de transferencia; **iii)** transfectar la porción del vector de transferencia que contiene ORF2 del PCV2 recombinante en un virus; **iv)** infectar células en un medio con el virus transfectado; **v)** lograr que el virus transfectado exprese la proteína recombinante ORF2 del PCV2; **vi)** separar las células del sobrenadante; y **vii)** recuperar la proteína ORF2 del PCV2 expresada del sobrenadante.

Se describe además en esta memoria un método para preparar una composición que comprende la proteína ORF2 del PCV2 y un vector viral inactivado. Este método comprende las etapas de: **i)** clonar ORF2 del PCV2 amplificado en un vector de transferencia; **ii)** transfectar la porción del vector de transferencia que contiene ORF2 del PCV2 recombinante en un virus; **iii)** infectar las células en el medio con el vector viral transfectado; **iv)** lograr que el vector viral transfectado exprese la proteína recombinante de ORF2 del PCV2; **v)** separar las células del sobrenadante; **vi)** recuperar la proteína ORF2 del PCV2 expresada del sobrenadante; y **vii)** inactivar el vector viral recombinante. Preferentemente, el vector viral recombinante es un baculovirus que contiene secuencias de ADN codificantes de ORF2 y las células son células Sf+. Las etapas de separación preferidas son las que se describieron precedentemente, siendo más preferida la etapa de filtración. Las etapas de inactivación preferidas son las que se describieron precedentemente. Preferentemente, la inactivación se realiza a 35-39 °C aproximadamente y en presencia de BEI 2 a 8 mM, aún más preferentemente en presencia de BEI 5 mM aproximadamente. Se ha encontrado sorprendentemente que concentraciones más altas de BEI afectan negativamente la proteína ORF2 del PCV2 y que concentraciones más bajas no son eficaces para inactivar el vector viral dentro de las 24 a 72 horas de inactivación. Preferentemente, la inactivación se realiza durante al menos 24 horas, con mayor preferencia aún durante 24 a 72 horas.

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

del PCV2, y el vector viral inactivado, descrito precedentemente, también incluye una etapa de neutralización después de la etapa **vii**). Esta etapa **viii**) comprende la adición de una cantidad equivalente de un agente que neutraliza al agente de inactivación a la solución. Preferentemente, si el agente de inactivación es BEI, se prefiere agregar una cantidad equivalente de tiosulfato de sodio. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la etapa **viii**) comprende la adición de una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mM, preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mM, más preferentemente aún entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 mM, más preferentemente aún entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7 mM, con mayor preferencia de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI.

De acuerdo con un aspecto adicional, el método para preparar una composición que comprende la proteína ORF2 del PCV2 y el vector viral inactivado, descrito precedentemente, comprende antes de la etapa **i**) la siguiente etapa: amplificar el ADN de ORF2 del PCV2 *in vitro*, donde las secuencias flanqueadoras del ADN de ORF2 del PCV2 están modificadas según se describió precedentemente. Los métodos *in vitro* para amplificar el ADN de ORF2 del PCV2 y para modificar las secuencias flanqueadoras, clonar *in vitro* el ADN de ORF2 del PCV2 amplificado en un vector de transferencia y los vectores de transferencia adecuados fueron descritos precedentemente, se muestran a modo de ejemplo en la figura 1 o son conocidos por los especialistas en la técnica. Entonces, de acuerdo con un aspecto adicional, este método comprende las etapas de: **i**) amplificar el ADN de ORF2 del PCV2 *in vitro*, donde las secuencias flanqueadoras de dicho ADN de ORF2 del PCV2 están modificadas, **ii**) clonar el ADN de ORF2 del PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y **iii**) transfectar el vector de transferencia, o una porción del mismo que contiene al ADN de ORF2 del PCV2 recombinante, en un vector viral para generar el vector viral recombinante, **iv**) infectar células en un medio con el virus transfectado; **v**) lograr que el virus transfectado exprese la proteína recombinante de ORF2 del PCV2; **vi**) separar las células del sobrenadante; **vii**) recuperar la proteína ORF2 del PCV2 expresada del sobrenadante; **viii**) inactivar el vector viral recombinante, preferentemente, en presencia de BEI entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mM, con mayor preferencia en presencia de BEI 5 mM aproximadamente; y **ix**) agregar una cantidad equivalente de un agente capaz de neutralizar el agente de inactivación en la solución, preferentemente, agregar una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mM, preferentemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI.

También se describe en esta memoria un método para preparar una composición, preferentemente una composición antigénica, tal como, por ejemplo, una vacuna, para generar una respuesta inmune contra PCV2. En general, este método incluye las etapas de transfectar una construcción en un virus, donde dicha construcción comprende **i**) ADN recombinante de ORF2 del PCV2, **ii**) infectar células en un medio de crecimiento con el virus transfectado, **iii**) lograr que el virus exprese la proteína recombinante ORF2 del PCV2, **iv**) recuperar la proteína ORF2 expresada del sobrenadante y **v**) preparar la composición combinando la proteína recuperada con un adyuvante adecuado y/u otro vehículo aceptable para uso farmacéutico.

"Adyuvantes", tal como se definen en la presente, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas como por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge, MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), una emulsión de agua-en-aceite, una emulsión de aceite-en-agua, una emulsión de agua-en-aceite-en-agua. La emulsión se puede basar particularmente en aceite parafínico líquido liviano (tipo Farmacopea Europea); aceite de isoprenoides tal como escualano o escualeno; aceite obtenido por 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 o alcoholes grasos ramificados, en particular ésteres del ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferentemente agentes 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, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, que están opcionalmente etoxilados, y bloques de copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, en especial L121. Véase Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997).

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

Otros casos de adyuvantes comprenden un compuesto seleccionado entre polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivados alqueno. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico entrecruzados, en especial con éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el término de carbómeros (Pharmeuropa Vol. 8, Nº 2, junio de 1996). Los especialistas en la técnica también pueden consultar la Patente de EE.UU. Nº: 2.909.462 en la que se describen dichos polímeros de acrílico entrecruzados con un compuesto polihidroxilado que contiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente no más que 8, donde los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos están sustituidos por radicales alifáticos insaturados de al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los

que contienen entre 2 y 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener ellos mismos otros sustituyentes, tal como metilo. Los productos comercializados con el nombre Carbopol (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son particularmente apropiados. Están entrecruzados con una sacarosa de alilo o con alilo pentaeritritol. Entre ellos, se puede mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Más preferido es el uso de Carbopol 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivados alquenilo, los copolímeros EMA (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua permite obtener una solución ácida que será neutralizada, preferentemente hasta un pH fisiológico, con el fin de obtener la solución adyuvante en la cual se incorporará la propia composición inmunogénica, inmunológica o vacuna.

Otros adyuvantes adecuados incluyen, a modo de ejemplo, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), copolímeros de bloques (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lípido A, adyuvante de avridina lípido-amina, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (recombinante u otro), toxina de cólera, IMS 1314 o dipéptido muramilo entre muchos otros.

Preferentemente, la cantidad de adyuvante añadida comprende entre aproximadamente 100 µg y aproximadamente 10 mg por dosis. Con mayor preferencia aún, la cantidad de adyuvante añadida comprende entre aproximadamente 100 µg y aproximadamente 10 mg por dosis. Con mayor preferencia aún, la cantidad de adyuvante añadida comprende entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 5 mg por dosis. Con mayor preferencia aún, la cantidad de adyuvante añadida comprende entre aproximadamente 750 µg y aproximadamente 2,5 mg por dosis. Con mayor preferencia, la cantidad de adyuvante añadida es de aproximadamente 1 mg por dosis.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, el método para preparar la composición antigénica, tal como por ejemplo una vacuna, para generar una respuesta inmune contra PCV2 comprende **i)** preparar y recuperar la proteína ORF2 del PCV2 y **ii)** mezclarla con un adyuvante adecuado. Preferentemente, el adyuvante es Carbopol 971P. Con mayor preferencia aún, se agrega una cantidad de Carbopol 971P que comprende entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 5 mg por dosis, con mayor preferencia aún una cantidad que comprende entre aproximadamente 750 µg y aproximadamente 2,5 mg por dosis y con mayor preferencia una cantidad que comprende aproximadamente 1 mg por dosis. Preferentemente, el paso de proceso **i)** incluye las etapas de proceso descritas para la preparación y recuperación de la ORF2 del PCV2. Por ejemplo, en realizaciones preferidas de este método, la construcción que comprende el ADN de la ORF2 del PCV2 se obtiene en un vector de transferencia. Los vectores de transferencia adecuados y los métodos para prepararlos fueron descritos precedentemente. Opcionalmente, el método puede incluir el paso de amplificar la ORF2 a partir de una cepa de PCV2 mediante PCR antes de clonar la ORF2 en el vector de transferencia. Las secuencias de marco de lectura abierto, secuencias de Kozak, secuencias del sitio EcoR1 3', secuencias de proteínas recombinantes, secuencias de construcciones transfectadas, medios, células y virus preferidos son como se describieron para los métodos precedentes. Otra etapa opcional para este método incluye clonar el ADN de la ORF2 del PCV2 amplificado en un primer vector, recortar el ADN de la ORF2 de este primer vector y usar este ADN de la ORF2 del PCV2 recortado para clonarlo en el vector de transferencia. Al igual que con los otros métodos, se prefiere esperar durante al menos 5 días después de la infección de las células por el baculovirus transfectado antes de recuperar la proteína ORF2 recombinante del sobrenadante. Preferentemente, la etapa de recuperación de este método también incluye la etapa de separar el medio de las células y de los desechos celulares. Esto se puede realizar de diversas maneras, pero para mayor facilidad y conveniencia, se prefiere filtrar las células, los desechos celulares y el medio de crecimiento a través de un filtro cuyos poros varían en un intervalo de tamaños entre aproximadamente 0,45 µm y aproximadamente 1,0 µm. Finalmente, para este método, se prefiere incluir una etapa de inactivación del virus antes de combinar la proteína ORF2 del PCV2 recombinante recuperada en una composición. Esto se puede realizar de diversas maneras, pero para la práctica de la presente invención se prefiere usar BEI.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, este método comprende las etapas de: **i)** amplificar el ADN de la ORF2 del PCV2 *in vitro*, donde las secuencias flanqueadoras de dicho ADN de la ORF2 del PCV2 están modificadas, **ii)** clonar el ADN de la ORF2 del PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y **iii)** transfectar el vector de transferencia, o una porción del mismo que contiene al ADN de la ORF2 del PCV2 recombinante, en un vector viral para generar el vector viral recombinante, **iv)** infectar las células en un medio con el virus transfectado; **v)** lograr que el virus transfectado exprese la proteína recombinante de la ORF2 del PCV2; **vi)** separar las células del sobrenadante; **vii)** recuperar la proteína ORF2 del PCV2 expresada del sobrenadante; **viii)** inactivar el vector viral recombinante, preferentemente en presencia de BEI entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mM, con mayor preferencia en presencia de BEI aproximadamente 5 mM; **ix)** agregar una cantidad equivalente de un agente capaz de neutralizar al agente de inactivación en la solución, preferentemente por adición de una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mM, preferentemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI, y **x)** agregar una cantidad adecuada de un adyuvante, preferentemente agregar Carbopol, más preferentemente Carbopol 971P, con mayor preferencia aún en las cantidades descritas precedentemente (por ejemplo entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 5 mg por dosis, con mayor preferencia aún una cantidad entre aproximadamente 750 µg y aproximadamente 2,5 mg por dosis y con mayor preferencia una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis).

Además, la composición puede incluir uno o más vehículos aceptables para uso farmacéutico. Tal como se utiliza en

la presente, "un vehículo aceptable para uso farmacéutico" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la absorción y semejantes. Con mayor preferencia, la composición provista en la presente, contiene a la proteína ORF2 del PCV2 recuperada del sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, donde dichas células fueron infectadas con un vector viral recombinante que contiene ADN de la ORF2 del PCV2 y expresan la proteína ORF2 del PCV2, y donde dicho cultivo celular fue tratado con BEI entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 mM, preferentemente con BEI aproximadamente 5 mM para inactivar el vector viral, y una concentración equivalente de un agente de neutralización, preferentemente una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 mM, preferentemente de aproximadamente 5 mM; Carbopol, más preferentemente Carbopol 971P, preferentemente en cantidades que comprenden entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 5 mg por dosis, con mayor preferencia aún una cantidad entre aproximadamente 750 µg y aproximadamente 2,5 mg por dosis y con mayor preferencia una cantidad entre aproximadamente 1 mg por dosis; y salina fisiológica, preferentemente en una cantidad que comprende entre aproximadamente 50 y aproximadamente 90% (v/v), más preferentemente entre aproximadamente 60 y 80% (v/v), más preferentemente aún de aproximadamente 70% (v/v).

Por lo tanto, también se describe en esta memoria un método para preparar una composición antigénica, tal como por ejemplo una vacuna, para generar una respuesta inmune contra el PCV2 que comprende las etapas de: **i)** amplificar el ADN de la ORF2 del PCV2 *in vitro*, donde las secuencias flanqueadoras de dicho ADN de la ORF2 del PCV2 están modificadas; **ii)** clonar el ADN de la ORF2 del PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y **iii)** transfectar el vector de transferencia, o una porción del mismo que contiene al ADN de la ORF2 del PCV2 recombinante, en un vector viral para generar el vector viral recombinante; **iv)** infectar células en un medio con el virus transfectado; **v)** lograr que el virus transfectado exprese la proteína recombinante de la ORF2 del PCV2; **vi)** separar las células del sobrenadante; **vii)** recuperar la proteína ORF2 del PCV2 expresada del sobrenadante; **viii)** inactivar el vector viral recombinante, preferentemente, en presencia de BEI entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 mM, con mayor preferencia en presencia de BEI aproximadamente 5 mM; **ix)** agregar una cantidad equivalente de un agente capaz de neutralizar al agente de inactivación en la solución, preferentemente, con la adición de una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 20 mM, preferentemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de inactivación es BEI; **x)** agregar una cantidad adecuada de un adyuvante, preferentemente agregar Carbopol, más preferentemente Carbopol 971P, con mayor preferencia en las cantidades descritas precedentemente (por ejemplo, entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 5 mg por dosis, con mayor preferencia aún en cantidades entre aproximadamente 750 µg y aproximadamente 2,5 mg por dosis y con mayor preferencia en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis); y **xi)** agregar salina fisiológica, preferentemente una cantidad entre aproximadamente 50 y aproximadamente 90% (v/v), más preferentemente entre aproximadamente 60 y 80% (v/v), más preferentemente aún de aproximadamente 70% (v/v). Opcionalmente, este método también puede incluir la adición de un protector. Un protector, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un agente anti-microbiológico activo, tal como por ejemplo Gentamicina, Mertiolate y semejantes. En particular, se prefiere agregar un protector en la preparación de una composición de múltiples dosis. Dichos agentes anti-microbiológicos activos se agregan a concentraciones eficaces para prevenir toda contaminación microbiológica de la composición de interés o para inhibir todo crecimiento microbiológico en la composición de interés.

Más aún, este método también puede comprender la adición de un agente estabilizante, tal como p.ej. sacáridos, trehalosa, manitol, sacarosa y semejantes, para incrementar y/o mantener la vida en estante del producto. Sin embargo, se ha encontrado sorpresivamente que la formulación resultante es inmunológicamente eficaz sobre un período de al menos 24 meses, sin agregar ningún agente estabilizante adicional.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se relaciona con los productos resultantes de los métodos descritos precedentemente. En particular, la presente divulgación se relaciona con una composición de materia que comprende la proteína ORF2 del PCV2 expresada de forma recombinante. Más aún, la presente divulgación también se relaciona con una composición de materia que comprende la proteína ORF2 del PCV2 expresada de forma recombinante, recuperada del sobrenadante de un cultivo de células de insecto. Más aún, la presente divulgación también se relaciona con una composición de materia que comprende la proteína ORF2 del PCV2 expresada de forma recombinante, recuperada del sobrenadante de un cultivo de células de insecto. Preferentemente, esta composición de materia también comprende un agente adecuado para la inactivación de vectores virales. Preferentemente, dicho agente de inactivación es BEI. Más aún, la presente invención también se relaciona con una composición de materia que comprende la proteína ORF2 del PCV2 expresada de forma recombinante, recuperada del sobrenadante de un cultivo de células de insecto y que comprende un agente adecuado para la inactivación de vectores virales, preferentemente BEI, y un agente de neutralización para neutralizar el agente de inactivación. Preferentemente, dicho agente de neutralización es tiosulfato de sodio, cuando se usa BEI como agente de inactivación.

Se describe en esta memoria una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune y, más preferentemente, confiere inmunidad protectora contra los signos clínicos de una infección por PCV2. La composición comprende generalmente el polipéptido, o un fragmento del mismo, expresado por el marco de lectura abierto 2 (ORF2) de PCV2, como componente antigénico de la composición.

El ADN y la proteína ORF2 del PCV2, tal como se utiliza en la presente para la preparación de las composiciones y también en los procesos provistos aquí comprende un dominio altamente conservado en las formas aisladas de PCV2 y por ello cualquier ORF2 del PCV2 sería eficaz como fuente del ADN y/o polipéptido de la ORF2 del PCV tal como se utiliza en la presente. Una proteína ORF2 del PCV2 preferida es la que se muestra en la SEQ ID N° 11. El polipéptido de la ORF2 del PCV preferido se provee aquí en la SEQ ID N° 5, pero los especialistas en la técnica comprenderán que esta podría variar en tanto como un 6-10% en cuanto a homología de secuencia y aún retener las características antigénicas que los vuelve útiles en las composiciones inmunogénicas. Las características antigénicas de la composición inmunológica se pueden estimar, por ejemplo, mediante un experimento de exposición como el que se provee en el ejemplo 4. Más aún, la característica antigénica del antígeno modificado es retenido, cuando el antígeno modificado confiere al menos un 70%, preferentemente un 80%, más preferentemente un 90% de inmunidad protectora en comparación con la proteína ORF2 del PCV2, codificada por la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID N°:3 o de la SEQ ID N°:4. Una "composición inmunogénica", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína ORF2 del PCV2 que genera una "respuesta inmunológica" en el huésped que comprende una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la proteína ORF2 del PCV2. Preferentemente, esta composición inmunogénica puede conferir inmunidad protectora contra una infección por PCV2 y los signos clínicos asociados con la misma. En algunas realizaciones, se usan las porciones inmunogénicas de la proteína ORF2 del PCV2 como componente antigénico en la composición. El término "porción inmunogénica", tal como se utiliza en la presente, se refiere a formas truncadas y/o sustituidas, o fragmentos de la proteína y/o del polinucleótido ORF2 del PCV2, respectivamente. Preferentemente, dichas formas truncadas y/o sustituidas, o fragmentos, comprenderán al menos 6 aminoácidos contiguos del polipéptido ORF2 de longitud completa. Más preferentemente, las formas truncadas o sustituidas, o fragmentos, comprenden al menos 10, más preferentemente al menos 15 y más preferentemente aún al menos 19 aminoácidos contiguos del polipéptido ORF2 de longitud completa. En la presente se proveen dos secuencias preferidas en este respecto como las SEQ ID N°: 9 y 10. Se considera además que dichas secuencias pueden formar parte de fragmentos o formas truncadas más grandes. Otro polipéptido ORF2 del PCV2 preferido provisto en la presente es codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 3 o de la SEQ ID N°: 4. Pero los especialistas en la técnica comprenderán que esta secuencia podría variar en tanto como un 6-20% en cuanto a homología de secuencia y aún retener las características antigénicas que lo vuelven útil en las composiciones inmunogénicas. En algunas realizaciones, se usa una forma truncada o sustituida, o un fragmento, de la ORF2 como componente antigénico en la composición. Preferentemente, dichas formas truncadas o sustituidas, o fragmentos, comprenderán al menos 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos ORF2 de longitud completa, por ejemplo de la SEQ ID N° 3 o la SEQ ID N° 4. Más preferentemente, las formas truncadas o sustituidas, o fragmentos, tendrán al menos 30, más preferentemente al menos 45 y más preferentemente aún al menos 57 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de longitud completa del ORF2, por ejemplo la SEQ ID N° 3 o la SEQ ID N° 4.

La "identidad de secuencia", tal como se conoce en la técnica, se refiere a la 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 será comparada con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina por comparación de la secuencia dada con la secuencia de referencia después de alinear las secuencias de forma óptima con el objeto de obtener el mayor grado de similitud de secuencia, determinado por la coincidencia entre las cadenas de dichas secuencias. Dicha alineación permite establecer la identidad de secuencia sobre una base de posición-por-posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si en dicha posición los nucleótidos o residuos de aminoácidos son idénticos. La cantidad total de dichas identidades de posición se divide entonces por el número total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para obtener el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede calcularse fácilmente utilizando métodos conocidos, incluyendo en un sentido no limitativo, los que se describen en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Parte I*, Griffin, A.M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequences Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia están diseñadas para lograr la mayor coincidencia entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia están codificados en programas para computadora disponibles al público que determinan la identidad de secuencia entre las secuencias dadas. Los ejemplos de tales programas incluyen, a modo de ejemplo, el 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 se encuentra disponible al público de 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)). Estos programas alinean de forma óptima las secuencias usando los pesos de hueco predeterminados con el fin de obtener el mayor nivel de identidad de secuencia entre la secuencia dada y la secuencia de referencia. A modo ilustrativo, cuando se dice que un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene al menos, por ejemplo, un 85%, preferentemente un 90%, aún más preferentemente un 95% de "identidad de secuencia" con la secuencia de nucleótidos de referencia, se considera que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos dada puede incluir hasta 15, preferentemente hasta 10, aún más preferentemente hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85%, preferentemente un 90%, aún más

preferentemente un 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 15%, preferentemente un 10%, aún más preferentemente un 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden ser suprimidos o sustituidos por otro nucleótido, o se puede insertar una cantidad de nucleótidos de hasta el 15%, preferentemente el 10%, aún más preferentemente el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia.

Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden tener lugar en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier ubicación entre dichas posiciones terminales, dispersas ya sea individualmente entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. De manera análoga, un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos dada tiene al menos, por ejemplo, un 85%, preferentemente un 90%, aún más preferentemente un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, significa que la secuencia de aminoácidos dada del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que dicha secuencia de polipéptidos dada puede incluir hasta 15, preferentemente hasta 10, aún más preferentemente hasta 5 alteraciones de aminoácido por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptidos dada que tiene al menos un 85%, preferentemente un 90%, aún más preferentemente un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia, se puede suprimir o sustituir hasta un 15%, preferentemente hasta un 10%, aún más preferentemente hasta un 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia por otro aminoácido, o se puede insertar un número de aminoácidos hasta un 15%, preferentemente hasta un 10%, aún más preferentemente hasta un 5% del número total de residuos de aminoácidos de la secuencia de referencia en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden tener lugar en las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier ubicación entre dichas posiciones terminales, dispersas ya sea individualmente entre los residuos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Sin embargo, las sustituciones conservadoras no se incluyen como una coincidencia al determinar la identidad de secuencia.

La "homología de secuencia", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un método para determinar la relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, se alinean de forma óptima dos o más secuencias y se introducen huecos si fuera necesario. Sin embargo, a diferencia de la "identidad de secuencia", las sustituciones de aminoácidos conservadoras se cuentan como coincidencias al determinar la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido con un 95% de homología de secuencia con la secuencia de referencia, un 85%, preferentemente un 90%, aún más preferentemente un 95% de los residuos de aminoácidos o nucleótidos de la secuencia de referencia deben coincidir o comprender una sustitución conservadora con otro aminoácido o nucleótido, o se puede insertar en la secuencia de referencia un número de aminoácidos o nucleótidos que comprende hasta un 15%, preferentemente hasta un 10%, aún más preferentemente hasta un 5% de los residuos de aminoácidos o nucleótidos totales, sin incluir las sustituciones conservadoras, en la secuencia de referencia. Preferentemente, la secuencia homóloga comprende al menos una extensión de 50, con mayor preferencia aún de 100, con mayor preferencia aún de 250, con mayor preferencia aún de 500 nucleótidos.

Una "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido o nucleótido por otro residuo de aminoácido o nucleótido de características o propiedades similares, incluyendo tamaño, hidrofobicidad, etc., de modo tal que la funcionalidad general no cambia significativamente.

El término "aislado" significa alterado "por la mano del hombre" con respecto a su estado natural, es decir, si tiene lugar en la naturaleza, ha sido cambiado o eliminado de su entorno original o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido naturalmente presente en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", según el término se emplea en la presente.

Por lo tanto, se describe además una composición inmunogénica eficaz para disminuir la severidad de los síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2 que comprende a la proteína ORF2 del PCV2. Preferentemente, la proteína ORF2 del PCV2 es cualquiera de las que se describieron precedentemente. Preferentemente, dicha proteína ORF2 del PCV2 es

- i) un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10 o SEQ ID N°: 11;
- ii) cualquier polipéptido que es al menos un 80% homólogo del polipéptido de i),
- iii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos de i) y/o ii)
- iv) la porción inmunogénica de iii), que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos incluidos en la secuencia de la SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10 o SEQ ID N°: 11,
- v) un polipéptido codificado por un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 3 o SEQ ID N°: 4,
- vi) cualquier polipéptido codificado por un polinucleótido que es al menos un 80% homólogo del 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), donde el polinucleótido que codifica dicha porción inmunogénica comprende al menos 30 nucleótidos contiguos incluidos en la secuencia de la SEQ ID N°: 3, o SEQ ID N°: 4.

Preferentemente cualquiera de dichas porciones inmunogénicas poseen las características inmunogénicas de la proteína ORF2 PCV2 codificada por la secuencia de la SEQ ID N°: 3 o SEQ ID N°: 4.

5 De acuerdo con un aspecto adicional, la proteína ORF2 del PCV2 se provee en la composición inmunológica a un nivel de inclusión de antígeno eficaz para inducir la respuesta inmune deseada, a saber, la reducción de la incidencia o disminución de la severidad de los signos clínicos resultantes de una infección por PCV2. Preferentemente, el nivel de inclusión de la proteína ORF2 del PCV2 es de al menos 0,2 µg de antígeno/ml de la composición inmunogénica final (µg/ml), más preferentemente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 400 µg/ml, más preferentemente aún entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 200 µg/ml, aún más preferentemente entre aproximadamente 0,35 y aproximadamente 100 µg/ml, más preferentemente aún entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 50 µg/ml, más preferentemente aún entre aproximadamente 0,45 y aproximadamente 30 µg/ml, más preferentemente aún entre aproximadamente 0,6 y aproximadamente 15 µg/ml, aún más preferentemente entre aproximadamente 0,75 y aproximadamente 8 µg/ml, aún más preferentemente entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 6 µg/ml, más preferentemente aún entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 3,0 µg/ml, aún más preferentemente entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 2,5 µg/ml, aún más preferentemente entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,0 µg/ml y con mayor preferencia es de 1,6 µg/ml aproximadamente.

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

35 El polipéptido ORF2 del PCV2 usado en la composición inmunogénica acorde con la presente invención puede ser derivado de cualquier manera incluyendo aislamiento y purificación de la ORF2 del PCV2, síntesis estándar de proteínas y metodología recombinante. Los métodos preferidos para obtener el polipéptido ORF2 del PCV2 se describieron ya en la presente y también se proveen en la Solicitud de Patente de EE.UU. N°: 11/034.797. Brevemente, se infectan células susceptibles con un vector viral recombinante que contiene las secuencias de ADN codificantes de ORF2 del PCV2, el polipéptido ORF2 del PCV2 es expresado por el virus recombinante y el polipéptido ORF2 del PCV2 expresado se recupera del sobrenadante por filtración y es inactivado mediante cualquier método convencional, preferentemente usando etilenimina binaria, que luego es neutralizado para detener el proceso de inactivación.

45 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 del PCV2 descritas precedentemente, preferentemente a las concentraciones descritas precedentemente, y **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 del PCV2, preferentemente de un baculovirus recombinante. Más aún, de acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 del PCV2 descritas precedentemente, preferentemente a las concentraciones descritas precedentemente, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 del PCV2, preferentemente de un baculovirus recombinante, y **iii) una** porción del sobrenadante del cultivo celular.

50 En el proceso de producción y recuperación para la proteína ORF2 del PCV2, el sobrenadante del cultivo celular puede ser filtrado a través de una membrana que tiene un tamaño de poro que comprende preferentemente entre aproximadamente 0,45 y 1 µm. Por consiguiente, un aspecto adicional se relaciona con una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 del PCV2 descritas precedentemente, preferentemente a las concentraciones descritas precedentemente, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 del PCV2, preferentemente de un baculovirus recombinante, y **iii) una** porción del cultivo celular; donde aproximadamente un 90% de los componentes tiene un tamaño menor que 1 µm.

60 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación se relaciona con una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 del PCV2 descritas precedentemente, preferentemente a las concentraciones descritas precedentemente, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 del PCV2, **iii)** una porción del cultivo celular y **iv)** un agente de inactivación para inactivar el vector viral recombinante que preferentemente es BEI, donde aproximadamente un 90% de los componentes **i)** a **iii)** son de un tamaño menor que 1 µm. Preferentemente, BEI está presente a concentraciones eficaces para inactivar el baculovirus. Las concentraciones eficaces se describieron precedentemente.

65

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación se relaciona con una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 del PCV2 descritas precedentemente, preferentemente a las concentraciones descritas precedentemente, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 del PCV2, **iii)** una porción del cultivo celular, **iv)** un agente de inactivación para inactivar el vector viral recombinante que preferentemente es BEI y **v)** un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente de inactivación, donde aproximadamente un 90% de los componentes i) a iii) son de un tamaño menor que 1 µm. Preferentemente, si el agente de inactivación es BEI, dicha composición comprende tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI.

El polipéptido es incorporado en una composición que puede ser administrada a un animal susceptible a una infección por PCV2. En realizaciones preferidas, la composición también puede incluir componentes adicionales conocidos por los especialistas en la técnica (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences, (1990), 18ª ed. Mack Publ., Easton). Además, la composición puede incluir uno o más vehículos aceptables para uso veterinario. Tal como se utiliza en la presente, un "vehículo aceptable para uso veterinario" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la absorción y semejantes.

La composición inmunogénica puede comprender la proteína ORF2 del PCV2 provista en la presente, preferentemente a las concentraciones descritas precedentemente, como un componente antigénico, mezclado con un adyuvante, preferentemente Carbopol, y salina fisiológica.

Los especialistas en la técnica comprenderán que la presente composición puede incorporar soluciones estériles inyectables conocidas, aceptables para uso fisiológico. Para preparar una solución lista para usar como una inyección o infusión parenteral, hay soluciones isotónicas acuosas, tal como por ejemplo salina, o las correspondientes soluciones con proteínas plasmáticas. Además, las composiciones inmunogénicas y vacunas según se describen en esta memoria pueden incluir diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes. Los diluyentes pueden incluir agua, salina, dextrosa, etanol, glicerol y semejantes. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas del ácido etilendiamintetracético, entre otros. Los adyuvantes adecuados son los que se describieron precedentemente. Más preferido es el uso de Carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferentemente en las cantidades descritas precedentemente (por ejemplo entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 5 mg por dosis, con mayor preferencia aún entre aproximadamente 750 µg y aproximadamente 2,5 mg por dosis y más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis).

Por lo tanto, la presente divulgación también se relaciona con una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 del PCV2 descritas precedentemente, preferentemente a las concentraciones descritas precedentemente, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 del PCV2, **iii)** una porción del cultivo celular, **iv)** un agente de inactivación para inactivar el vector viral recombinante, preferentemente es BEI, y **v)** un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente de inactivación, preferentemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; y **vi)** un adyuvante adecuado, preferentemente Carbopol 971 en las cantidades descritas precedentemente; donde aproximadamente un 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm. De acuerdo con un aspecto adicional, esta composición inmunogénica comprende además una sal aceptable para uso farmacéutico, preferentemente una sal de fosfato a concentraciones aceptables para uso fisiológico. Preferentemente, el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a un pH fisiológico, o sea entre 6,5 y 7,5 aproximadamente.

Por lo tanto, la presente divulgación también se relaciona con una composición inmunogénica que comprende por cada ml **i)** al menos 1,6 µg de la proteína ORF2 del PCV2 descrita precedentemente, **ii)** al menos una porción de baculovirus que expresa dicha proteína ORF2 del PCV2, **iii)** una porción del cultivo celular, **iv)** BEI entre 2 y 8 mM aproximadamente, **v)** tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; y **vi)** aproximadamente 1 mg de Carbopol 971, y **vii)** sal de fosfato a una concentración aceptable para uso fisiológico; donde aproximadamente un 90% de los componentes i) a iii) son de un tamaño menor que 1 µm y el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta en 6,5 a 7,5 aproximadamente.

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir además uno o más agentes inmunomoduladores adicionales tales como, por ejemplo, interleuquinas, interferones u otras citoquinas. Las composiciones inmunogénicas también pueden incluir Gentamicina y Mertiolate. Aunque las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y aditivos que son de utilidad en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por el especialista, la presente divulgación contempla composiciones que comprenden entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 2000 µg de adyuvante y preferentemente una dosis de 250 µg/ml aproximadamente de la composición de vacuna. La presente divulgación contempla composiciones de vacuna que comprenden entre aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferentemente menos que 30 µg/ml aproximadamente de antibióticos.

Por lo tanto, la presente divulgación también se relaciona con una composición inmunogénica que comprende **i)** cualquiera de las proteínas ORF2 del PCV2 descritas precedentemente, preferentemente a las concentraciones

descritas precedentemente, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 del PCV2, **iii)** una porción del cultivo celular, **iv)** un agente de inactivación para inactivar el vector viral recombinante, preferentemente es BEI, y **v)** un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente de inactivación, preferentemente es tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; **vi)** un adyuvante adecuado, preferentemente es Carbopol 971 en las cantidades descritas precedentemente; **vii)** una concentración aceptable para uso farmacéutico de una solución amortiguadora salina, preferentemente de una sal de fosfato, y **viii)** un agente anti-microbiológico activo; donde aproximadamente un 90% de los componentes i) a iii) son de un tamaño menor que 1 µm.

Se ha encontrado sorprendentemente que la composición inmunogénica provista en la presente era muy estable sobre un período de 24 meses. También se ha encontrado que las composiciones inmunogénicas provistas en la presente, que comprenden la proteína ORF2 del PCV2 recombinante, expresada en el baculovirus, provista en la presente son muy eficaces para reducir los síntomas clínicos asociados con las infecciones por PCV2. Se ha encontrado sorpresivamente que las composiciones inmunogénicas que comprenden la proteína ORF2 del PCV2 recombinante expresada en el baculovirus provista en la presente, son más eficaces que una composición inmunogénica que comprende al virus PCV2 completo en una forma inactivada o un antígeno ORF2 del PCV2 viral aislado. En particular, se ha encontrado sorpresivamente que la proteína ORF2 del PCV2 recombinante expresada en el baculovirus es eficaz a concentraciones muy bajas, lo que significa concentraciones de hasta 0,25 µg/dosis. Este potencial inmunogénico inesperadamente alto de la proteína ORF2 del PCV2 podría incrementarse con la adición de Carbopol.

Un aspecto adicional se relaciona con un envase que comprende al menos una dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 del PCV2 provista en la presente, donde una dosis comprende al menos 2 µg de la proteína ORF2 del PCV2, preferentemente entre 2 y 16 µg de proteína ORF2 del PCV2. Dicho envase puede comprender entre 1 y 250 dosis de la composición inmunogénica, preferentemente contiene 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ó 250 dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 del PCV2. Preferentemente, cada uno de los envases que comprende más de una dosis de la composición inmunogénica de proteína ORF2 del PCV2 comprende además un agente anti-microbiológico activo. Dichos agentes son, p.ej., antibióticos incluyendo Gentamicina y Mertiolate y semejantes. Por lo tanto, se describe en esta memoria un envase que comprende entre 1 y 250 dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 del PCV2, donde una dosis comprende al menos 2 µg de proteína ORF2 del PCV2, y Gentamicina y/o Mertiolate, preferentemente entre aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos y más preferentemente menos que 30 µg/ml aproximadamente.

Un aspecto adicional se relaciona con un kit que comprende cualquiera de los envases, descritos precedentemente, y un manual de instrucciones, incluyendo la información para la aplicación intramuscular de al menos una dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 del PCV2 a lechones para disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2. Más aún, de acuerdo con un aspecto adicional, dicho manual de instrucciones comprende la información de una segunda o más administración(es) de al menos una dosis de la composición inmunogénica de ORF2 del PCV2, donde dicha segunda administración o cualquiera administración adicional es al menos 14 días posterior a la administración inicial o anterior. Preferentemente, dicho manual de instrucciones también incluye la información para administrar un estimulante inmunológico. Preferentemente, dicho estimulante inmunológico será administrado al menos dos veces. Preferentemente, hay al menos 3, más preferentemente al menos 5, aún más preferentemente al menos 7 días entre la primera y la segunda administración o cualquier administración adicional del estimulante inmunológico. Preferentemente, el estimulante inmunológico es administrado al menos 10 días, preferentemente 15, aún más preferentemente 20, aún más preferentemente al menos 22 días después de la administración inicial de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 del PCV2. Un estimulante inmunológico preferido es, por ejemplo, hemocianina de lapa (KLH), preferentemente emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA). Sin embargo, se debe tener en cuenta que también se puede usar cualquier otro estimulante inmunológico conocido por los especialistas en la técnica. Un "estimulante inmunológico", tal como se lo utiliza en la presente, significa cualquier agente o composición que pueda desencadenar la respuesta inmune, preferentemente sin iniciar o incrementar una respuesta inmune específica, p.ej. la respuesta inmune contra un patógeno específico. Se indica además administrar el estimulante inmunológico a una dosis adecuada. Más aún, el conjunto de elementos también puede comprender un envase, que incluye al menos una dosis del estimulante inmunológico, preferentemente una dosis de KLH o KLH/ICFA.

Más aún, también se ha encontrado sorprendentemente que el potencial inmunogénico de las composiciones inmunogénicas que comprenden la proteína ORF2 del PCV2 recombinante expresada en el baculovirus, preferentemente en combinación con Carbopol, puede ser mejorado aún más mediante la administración de la vacuna IngelVac PRRS MLV (véase el Ejemplo 5). Los signos clínicos de PCV2 y las manifestaciones de enfermedad se magnifican cuando hay una infección por PRRS. Sin embargo, las composiciones inmunogénicas y las estrategias de vacunación provistas en la presente disminuye este efecto en gran parte y más de lo esperado. En otras palabras, se observó un efecto sinérgico inesperado cuando los animales, preferentemente cerdos, son tratados con cualquiera de las composiciones inmunogénicas con ORF2 PCV2, provistas en la presente, y la vacuna Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

Por lo tanto, también se describe en esta memoria un kit descrito precedentemente, que comprende la composición

5 inmunogénica de ORF2 del PCV2 provista en la presente y el manual de instrucciones, donde dicho manual de instrucciones incluye además la información para administrar la composición inmunogénica de ORF2 del PCV2 junto con una composición inmunogénica que comprende un antígeno PRRS, preferentemente un antígeno PRRS con adyuvante. Preferentemente, el adyuvante para el antígeno PRRS es Carbopol. Preferentemente, el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

10 Además, también se describe en esta memoria un kit que comprende **i)** un envase que contiene al menos una dosis de la composición inmunogénica de ORF2 del PCV2 provista en la presente, y **ii)** un envase que contiene una composición inmunogénica que comprende un antígeno PRRS, preferentemente un antígeno PRRS con adyuvante. Preferentemente, el adyuvante para el antígeno PRRS es Carbopol. Preferentemente el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Más preferentemente, el kit comprende además un manual de instrucciones, incluyendo la información para administrar ambas composiciones farmacéuticas. Preferentemente, provee la información que la composición que contiene ORF2 del PCV2 es administrada temporalmente antes que la composición que contiene PRRS.

15 Un aspecto adicional se relaciona con el uso de cualquiera de las composiciones provistas en la presente como un medicamento, preferentemente como un medicamento veterinario, con mayor preferencia aún como una vacuna. Más aún, también se describe en esta memoria el uso de cualquiera de las composiciones descritas en la presente, para preparar un medicamento para disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2. Preferentemente, el medicamento es para prevenir una infección por PCV2, aún más preferentemente en lechones.

20 También se describe en esta memoria un método para **(i)** prevenir una infección, o una reinfección, con PCV2 o **(ii)** reducir o eliminar los síntomas clínicos causados por PCV2 en un sujeto, que comprende administrar cualquiera de las composiciones inmunogénicas provistas en la presente a un sujeto que lo necesita. Preferentemente, el sujeto es un cerdo. Preferentemente, la composición inmunogénica se administra por vía intramuscular. Preferentemente, se administra una dosis o dos dosis de la composición inmunogénica, donde una dosis comprende preferentemente al menos 2 µg de proteína ORF2 del PCV2 aproximadamente, aún más preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 16 µg y al menos entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg de Carbopol, con preferencia 1 mg de Carbopol aproximadamente. También se describe en esta memoria un método de tratamiento descrito precedentemente, donde se administra una segunda aplicación de la composición inmunogénica. Preferentemente, la segunda administración es con la misma composición inmunogénica, que preferentemente contiene la misma cantidad de proteína ORF2 del PCV2. Preferentemente, la segunda administración también es por vía intramuscular. Preferentemente, la segunda administración tiene lugar al menos 14 días después de la administración inicial, aún más preferentemente al menos 4 semanas después de la administración inicial.

25 El método de tratamiento también puede comprender la administración de un estimulante inmunológico. Preferentemente, dicho estimulante inmunológico es administrado al menos dos veces. Preferentemente, hay al menos 3, más preferentemente al menos 5 días, aún más preferentemente al menos 7 días entre la primera y la segunda administración del estimulante inmunológico. Preferentemente, el estimulante inmunológico es administrado al menos 10 días, preferentemente 15, aún más preferentemente 20, aún más preferentemente al menos 22 días después de la administración inicial de la composición inmunogénica ORF2 del PCV2. Un estimulante inmunológico preferido es, por ejemplo, hemocianina de lapa (KLH), preferentemente en una emulsión con adyuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA). Sin embargo, se debe tener en cuenta que también se puede usar cualquier otro estimulante inmunológico conocido por los especialistas en la técnica. Es propio del conocimiento general de los especialistas en la técnica administrar el estimulante inmunológico a una dosis adecuada.

30 El método de tratamiento descrito precedentemente también puede comprender la administración del antígeno PRRS. Preferentemente, el antígeno PRRS se formula con el adyuvante Carbopol. Preferentemente el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Preferentemente, dicho antígeno PRRS es administrado temporalmente después de administrar la composición inmunogénica de la proteína ORF2 PCV2.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

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

40 las figuras 2a y 2b son diagramas de flujo esquemáticos de cómo producir una composición para uso acorde con la presente invención.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

45 En los siguientes ejemplos se describen los materiales y procedimientos preferidos para uso de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se comprenderá que estos ejemplos solamente se ofrecen a efectos ilustrativos y ningún contenido en los mismos debe considerarse como una limitación del alcance general de la invención.

## EJEMPLO 1 (Para ilustración)

Este ejemplo compara los rendimientos relativos de ORF2 usando los métodos según se describen en esta memoria junto con métodos que son conocidos en la técnica anterior. Se sembraron cada uno de cuatro frascos rotatorios de 1000 ml con aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células Sf+/ml en 300 mL de medio de insecto libre de suero, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). El cultivo celular maestro se identifica como solución madre de células maestras SF+ (*Spodoptera frugiperda*), pasaje 19, Lote N° N112-095W. Las células usadas para generar la solución madre de células maestras SF+ se obtuvieron de Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. La línea celular SF+ para este ejemplo se confinó entre los pasajes 19 y 59. Otros pasajes también funcionan bien a los efectos de la presente invención, pero con el fin de llevar el proceso a una escala de producción mayor, probablemente sean necesarios al menos 19 pasajes y los pasajes posteriores a 59 pueden tener efectos sobre la expresión, aunque esto no se investigó. Con mayor detalle, los cultivos celulares iniciales de SF+ luego del almacenamiento en nitrógeno líquido se cultivaron en medio Excell 420 en suspensión en frascos rotatorios estériles bajo agitación constante. Los cultivos crecieron en frascos rotatorios de 100 mL a 250 mL con 25 a 150 mL de medio Excell 420 sin suero. Cuando las células se habían multiplicado hasta una densidad celular de  $1,0-8,0 \times 10^6$  células/mL, se repartieron en nuevos recipientes con una densidad de siembra de  $0,5-1,5 \times 10^6$  células/mL. Los subsiguientes cultivos de expansión se cultivaron en frascos rotatorios cuyo tamaño era de hasta 36 litros o en biorreactores de acero inoxidable de hasta 300 litros por un período de 2-7 días a 25-29°C.

Después de la siembra, los frascos fueron incubados a 27°C por cuatro horas. A continuación, en cada frasco se sembró baculovirus recombinante que contiene el gen de la ORF2 del PCV2 (SEQ ID N°: 4). El baculovirus recombinante que contiene el gen de la ORF2 del PCV2 fue generado de la siguiente manera: el gen de la ORF2 del PCV2 de una cepa de PCV2 de EE.UU. fue amplificado por PCR para contener una secuencia de Kozak 5' (SEQ ID N°: 1) y un sitio EcoR1 3' (SEQ ID N°: 2), clonado en el vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Después, se recortó y subclonó en el vector de transferencia pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). La porción subclonada está representada aquí en la SEQ ID N°: 7. El plásmido pVL1392 que contiene al gen de ORF2 del PCV2 se denominó N47-064Y y luego se cotransfectó con el ADN del baculovirus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) en células de insecto Sf+ (Protein Sciences, Meriden, CT) para generar el baculovirus recombinante que contiene al gen de ORF2 del PCV2. La nueva construcción se provee aquí en la SEQ ID N°: 8. El baculovirus recombinante que contiene al gen de ORF2 del PCV2 se purificó en placa y se propagó un virus semilla maestro [*Master Seed Virus*] (MSV) sobre la línea celular SF+, se tomaron alícuotas y se guardaron a -70 °C. El MSV se identificó positivamente como baculovirus ORF2 del PCV2 por PCR-RFLP usando cebadores específicos del baculovirus. Las células de insecto infectadas con el baculovirus ORF2 del PCV2 para generar el MSV o virus semilla de trabajo [*Working Seed Virus*] expresan al antígeno ORF2 del PCV2 según se detectó con anticuerpos policlonales séricas o monoclonales en un ensayo con anticuerpos fluorescentes indirecto. Además, la identidad del baculovirus ORF2 del PCV2 se confirmó por secuenciación de los aminoácidos N-terminales. El baculovirus ORF2 del PCV2 MSV también fue evaluado por su pureza de acuerdo con 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28 y 113.55. Cada baculovirus recombinante sembrado en los frascos rotatorios tenían multiplicidades de infección (MOI) variables. En el Frasco 1 se sembraron 7,52 mL de semilla 0,088 MOI; en el frasco 2 se sembraron 3,01 mL de semilla 0,36 MOI; en el frasco 3 se sembraron 1,5 mL de semilla 0,18 MOI; y en el frasco 4 se sembraron 0,75 mL de semilla 0,09 MOI. En la figura 1 se provee un diagrama de flujo esquemático que ilustra los pasos básicos usados para la construcción de un baculovirus ORF2 del PCV2 recombinante.

Después de sembrar los baculovirus, los frascos se incubaron a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días y también se agitaron a 100 rpm durante dicho tiempo. Los frascos estaban equipados con tapas ventiladas para permitir el flujo de aire. Se tomaron muestras de cada frasco cada 24 horas durante los 7 días siguientes. Después de la extracción, cada muestra se centrifugó, se separó el sedimento del sobrenadante y luego se microfiltró a través de una membrana cuyo tamaño de poro era de 0,45-1,0  $\mu\text{m}$ .

A continuación, se determinó la cantidad de ORF2 presente en las muestras resultantes mediante un ensayo de ELISA. El ensayo de ELISA se realizó con el anticuerpo de captura anti-PCV2 Pab IgG Prot. G de porcinos purificado (diluido 1:250 en PBS) diluido a 1:6000 en solución tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6). Luego se introdujeron 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo en los pocillos de la placa de microtitulación, se sellaron las placas y se incubaron durante la noche a 37°C. La placa se lavó después tres veces con una solución de lavado que comprendía 0,5 mL de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100 mL de D-PBS 10X (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) y 899,5 mL de agua destilada. A continuación, se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de una solución de bloqueo (5 g de leche en polvo descremada Carnation (Nestle, Glendale, CA) en 10 mL de D-PBS y cantidad necesario hasta llevar a 100 mL de agua destilada) a cada uno de los pocillos. La siguiente etapa comprendía lavar la placa de prueba y luego agregar el antígeno diluido previamente. El antígeno pre-diluido se obtuvo por adición de 200  $\mu\text{L}$  de solución diluyente (0,5 mL de Tween 20 en 999,5 mL de D-PBS) a cada uno de los pocillos sobre una placa de dilución. A continuación, la muestra se diluyó a una relación de 1:240 y a una relación de 1:480 y luego se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de cada una de estas muestras diluidas a uno de los pocillos superiores de la placa de dilución (es decir, un pocillo superior recibió 100  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:240 y la otra recibió 100  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:480). Después se efectuaron diluciones en serie para el resto de la placa retirando 100  $\mu\text{L}$  de cada pocillo sucesivo y transfiriéndolos al siguiente pocillo de la placa. Se mezcló el contenido de cada pocillo antes de efectuar la transferencia siguiente. El lavado de la placa de prueba incluyó tres lavados de la placa con la solución tampón de lavado. La placa se selló luego y se incubó durante una

hora a 37°C antes de lavarla otras tres veces con la solución tampón de lavado. El anticuerpo de detección usado era un anticuerpo monoclonal contra PCV ORF2. Se diluyó a 1:300 en solución diluyente y luego se agregaron 100 µL de anticuerpo de detección diluido a los pocillos. A continuación, se selló la placa y se incubó durante una hora a 37°C antes de lavarla tres veces con la solución tampón de lavado. Luego se preparó diluyente de conjugación por adición de suero de conejo normal (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) a la solución diluyente hasta una concentración del 1%. El anticuerpo conjugado anti-(H+I) de ratón de cabra-HRP (Jackson Immunoresearch) se diluyó en el diluyente de conjugación hasta 1:10.000. Después se agregaron 100 µL del anticuerpo conjugado diluido a cada uno de los pocillos. La placa se selló y se incubó durante 45 minutos a 37°C antes de lavarla tres veces con la solución tampón de lavado. Se agregaron 100 µL de sustrato (sustrato de peroxidasa TMB, Kirkgaard y Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), mezclado con un volumen igual de sustrato de peroxidasa B (KPL) a cada uno de los pocillos. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se agregaron 100 µL de solución de HCl 1 N a todos los pocillos para detener la reacción. La placa se pasó luego por un lector para ELISA. Los resultados de este ensayo se muestran en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

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

Estos resultados indican que cuando se prolonga el tiempo de incubación, la expresión de ORF2 hacia el sobrenadante de las células y medio centrifugados es mayor que la expresión en el sedimento de las células y medio centrifugados. Por consiguiente, si se deja que la expresión de ORF2 avance durante al menos 5 días y se lo recupera en el sobrenadante en lugar de dejar que la expresión avance por menos de 5 días y recuperar el ORF2 de las células, provee un gran incremento en los rendimientos de ORF2 y una mejora significativa con respecto a los métodos anteriores.

#### EJEMPLO 2 (Para ilustración)

En este ejemplo se proveen datos sobre la eficacia de las vacunas descritas en esta memoria. En un frasco rotatorio de 1000 mL se sembraron aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células Sf+/ml en 300 mL de medio Excell 420. El frasco se incubó luego a 27°C y se agitó a 100 rpm. A continuación, en el frasco se sembraron 10 mL de virus semilla ORF2 PCV2/Bac p+6 (el baculovirus recombinante que contiene al gen de la ORF2 del PCV2 de 6 pasajes adicionales en las células de insecto Sf9) con 0,1 MOI después de 24 horas de incubación.

El frasco se incubó luego a 27°C durante un total de 6 días. Después de la incubación, el frasco se centrifugó y se cosecharon tres muestras del sobrenadante resultante y se inactivaron. El sobrenadante se inactivó llevando su temperatura a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para la primera muestra, se agregó una solución 0,4 M de bromhidrato de 2-bromoetilenamina que había sido ciclado en etilenimina binaria 0,2 M (BEI) en NaOH 0,3 N al sobrenadante para obtener una concentración final de BEI de 5 mM. Para la segunda muestra, se agregó BEI 10 mM al sobrenadante. Para la tercera muestra, no se agregó BEI al sobrenadante. Las muestras se agitaron luego de forma continua durante 48 h. Se agregó una solución 1,0 M de tiosulfato de sodio para obtener una concentración mínima final de 5 mM con el fin de neutralizar toda BEI residual. Después se determinó la cantidad de ORF2 en cada muestra usando el mismo procedimiento de ensayo ELISA que se describió en el ejemplo 1. Los resultados se pueden observar en la siguiente Tabla 2:

**Tabla 2**

Muestra	ORF2 en sobrenadante ( $\mu\text{g}$ )
1	78,71
2	68,75
3	83,33

Este ejemplo demuestra que la neutralización con BEI no elimina o degrada cantidades significativas de producto de proteína ORF2 del PCV2 recombinante. Esto queda evidenciado por el hecho que no hay una gran pérdida de ORF2 en el sobrenadante del BEI o temperaturas elevadas. Los especialistas en la técnica comprenderán que el ORF2 recuperados es un producto proteico estable.

**EJEMPLO 3 (Para ilustración)**

Este ejemplo demuestra que el método descrito en esta memoria puede llevarse a escala desde una producción a pequeña escala de ORF2 del PCV2 recombinante a una producción a gran escala de ORF2 del PCV2 recombinante. Se introdujeron  $5,0 \times 10^5$  células/ml de células SF+/ml en 7000 mL de medio ExCell 420 en un Biorreactor Applikon de 20000 mL. El medio y las células se incubaron luego a 27°C y se agitaron a 100 RPM durante las siguientes 68 horas. A la hora 68, se agregaron 41,3 mL de ORF2 de PCV2 Baculovirus MSV+3 a 7000 mL de medio ExCell 420. La mezcla resultante se introdujo luego en el biorreactor. Durante los siguientes siete días, la mezcla se incubó a 27°C y se agitó a 100 RPM. Se extrajeron muestras del biorreactor cada 24 horas comenzando el día 4, después de la infección, y se centrifugó cada muestra. Se conservó el sobrenadante de las muestras y se cuantificó la cantidad de ORF2 usando densitometría con SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 3:

**Tabla 3**

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

**EJEMPLO 4**

En este ejemplo se evalúa la eficacia de siete candidatos de vacunas contra PCV2 y además se definen los parámetros de eficacia después de exposición a una cepa virulenta de PCV2. Se dividieron aleatoriamente ciento ocho (108) lechones, nacidos por cesárea, privados de calostro (CDCD), de 9-14 días de vida, en 9 grupos de igual tamaño. En la Tabla 4 se muestra el diseño general del estudio para este ejemplo.

**Tabla 4. Diseño general del estudio**

Grupo	Nº de cerdos	Tratamiento	Día de tratamiento	KLH/ICF A el día 21 y día 27	Expuestos a PCV2 virulento el día 24	Necropsia el día 49
1	12	Vacuna PCV2 N° 1-(vORF2 16 $\mu\text{g}$ )	0	+	+	+
2	12	Vacuna PCV2 N° 2-(vORF2 8 $\mu\text{g}$ )	0	+	+	+
3	12	Vacuna PCV2 N° 3-(vORF2 4 $\mu\text{g}$ )	0	+	+	+
4	12	Vacuna PCV2 N° 4-(rORF2 16 $\mu\text{g}$ )	0	+	+	+
5	12	Vacuna PCV2 N° 5-(rORF2 8 $\mu\text{g}$ )	0	+	+	+
6	12	Vacuna PCV2 N° 6-(rORF2 4 $\mu\text{g}$ )	0	+	+	+
7	12	Vacuna PCV2 N° 7-(Virus completos muertos)	0	+	+	+
8	12	Controles no expuestos	N/D	+	+	+
9	12	Grupo control negativo no estricto	N/D	+	-	+

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; virus completos muertos =

virus PCV2 cultivados en un cultivo celular adecuado

Siete de los grupos (Grupos 1-7) recibieron dosis del polipéptido ORF2 PCV2, uno de los grupos actuó como un control de prueba y no recibió ORF2 PCV2 y otro grupo actuó como grupo control negativo estricto y tampoco recibió ORF2 PCV2. El día 0, los grupos 1 a 7 fueron tratados con las vacunas asignadas. Los lechones en el grupo 7 recibieron un tratamiento de refuerzo el día 14. Se observó la aparición de efectos adversos en los lechones, así como reacciones en el sitio de inyección después de la vacunación y el día 19 los lechones fueron trasladados al segundo sitio de estudio. En el segundo sitio de estudio, los grupos 1-8 fueron albergados en una instalación, en tanto el grupo 9 fue albergado en una instalación separada. Todos los cerdos recibieron hemocianina de lapa (KLH)/adyuvante incompleto de Freund (ICFA) los días 21 y 27 y el día 24, los grupos 1-8 fueron expuestos a un PCV2 virulento.

Se recolectaron muestras de sangre antes y después de la exposición para determinar la serología de PCV2. Después de la exposición, se recolectaron los datos de peso corporal para determinar la ganancia de peso diario promedio (ADWG), y los síntomas clínicos, así como muestras de hisopados nasales para determinar el exudado nasal de PCV2. El día 49, se realizó la necropsia de los 15 cerdos que sobrevivieron, se calificaron las lesiones de los pulmones y se conservaron algunos tejidos selectos en formalina para efectuar posteriormente las pruebas de inmunohistoquímica (IHC).

## 20 Materiales y métodos

Este era un estudio de viabilidad frente a una exposición a vacunación parcialmente ciego realizado con cerdos CDCD, de 9 a 14 días de vida el día 0. Para su inclusión en el estudio, los títulos de IFA PCV2 de cerdas eran = 1:1000. Además, el estado serológico de las cerdas era de una piara negativa para PRRS conocida. Se evaluó el estado serológico de PCV2 de veintiocho (28) cerdas. Catorce (14) cerdas tenía un título de PCV2 = 1000 y fueron transferidas al primer sitio de estudio. Ciento diez (110) lechones nacieron mediante cirugía cesárea y estaban disponibles para este estudio el día -4. El día -3, se pesaron 108 cerdos CDCD en el primer sitio de estudio, se identificaron mediante rótulos de oreja, bloqueados por el peso y luego fueron asignados aleatoriamente a 1 de 9 grupos, como se mostró anteriormente en la tabla 4. Si alguno de los animales de prueba que había cumplido con los criterios de inclusión era enrolado en el estudio y posteriormente excluido del mismo por cualquier motivo, se notificaba al Investigador y Monitor con el fin de determinar el uso de los datos recolectados del animal en el análisis final. Se registró la fecha en que los lechones enrolados eran excluidos y la razón de dicha exclusión. Inicialmente, no se excluyó ninguna cerda. Un total de 108 de los 110 cerdos disponibles fueron asignados aleatoriamente a uno de los 9 grupos el día -3. Los dos cerdos más pequeños (Nº 17 y 19) no fueron asignados a ningún grupo y quedaron a disposición en caso de necesitarlos. Durante el transcurso del estudio, se retiraron varios animales. Cada uno de los siguientes cerdos fueron encontrados muertos antes de la exposición: el cerdo 82 (grupo 9) el día -1, el cerdo Nº 56 (grupo 6) el día 3, el cerdo Nº 53 (grupo 9) el día 4, el cerdo Nº 28 (grupo 8) el día 8, el cerdo Nº 69 (grupo 8) el día 7 y el cerdo Nº 93 (grupo 4) el día 9. Estos seis cerdos no se incluyeron en los resultados finales del estudio. El cerdo no 17 (uno de los cerdos disponibles) fue asignado al Grupo 9. El cerdo disponible restante, Nº 19, se excluyó del estudio.

Las formulaciones administradas a cada uno los grupos fueron: el grupo 1 fue asignado para recibir 1 ml de ORF2 viral (vORF2) que contiene 16 µg de ORF2/ml. Esto se obtuvo mezclando 10,24 ml de ORF2 viral (256 µg/25 µg/ml = 10,24 ml vORF2) con 3,2 ml de Carbopol al 0,5% y 2,56 ml de solución tampón fosfato salina a un pH de 7,4. Esto permitió obtener 16 ml de formulación para el grupo 1. El grupo 2 fue asignado para recibir 1 ml de vORF2 que contiene 8 µg de vORF2/ml. Esto se obtuvo mezclando 5,12 ml de vORF2 (128 µg/25 µg/ml = 5,12 ml vORF2) con 3,2 ml de Carbopol al 0,5% y 7,68 ml de solución tampón fosfato salina a un pH de 7,4. Esto permitió obtener 16 ml de formulación para el grupo 2. El grupo 3 fue asignado para recibir 1 ml de vORF2 que contiene 4 µg de vORF2/ml. Esto se obtuvo mezclando 2,56 ml de vORF2 (64 µg/25 µg/ml = 2,56 ml vORF2) con 3,2 ml de Carbopol al 0,5% y 10,24 ml de solución tampón fosfato salina a un pH de 7,4. Esto permitió obtener 16 ml de formulación para el grupo 3. El grupo 4 fue asignado para recibir 1 ml de ORF2 recombinante (rORF2) que contiene 16 µg de rORF2/ml. Esto se obtuvo mezclando 2,23 ml de rORF2 (512 µg/230 µg/ml = 2,23 ml rORF2) con 6,4 ml de Carbopol al 0,5% y 23,37 ml de solución tampón fosfato salina a un pH de 7,4. Esto permitió obtener 32 ml de formulación para el grupo 4. El grupo 5 fue asignado para recibir 1 ml de rORF2 que contiene 8 µg de rORF2/ml. Esto se obtuvo mezclando 1,11 ml de rORF2 (256 µg/230 µg/ml = 1,11 ml rORF2) con 6,4 ml de Carbopol al 0,5% y 24,49 ml de solución tampón fosfato salina a un pH de 7,4. Esto permitió obtener 32 ml de formulación para el grupo 5. El grupo 6 fue asignado para recibir 1 ml de rORF2 que contiene 8 µg de rORF2/ml. Esto se obtuvo mezclando 0,56 ml de rORF2 (128 µg/230 µg/ml = 0,56 ml rORF2) con 6,4 ml de Carbopol al 0,5% y 25,04 ml de solución tampón fosfato salina a un pH de 7,4. Esto permitió obtener 32 ml de formulación para el grupo 6. El grupo 7 fue asignado para recibir 2 ml de vacuna de células enteras muertas de PCV2 (PCV2 KV) que contiene al MAX PCV2 KV. Esto se obtuvo mezclando 56 ml de PCV2 KV con 14 ml de Carbopol al 0,5%. Esto permitió obtener 70 ml de formulación para el grupo 7. Finalmente, el grupo 8 fue asignado para recibir KLH a 0,5 µg/ml o 1,0 µg/ml por dosis de 2 ml. Esto se obtuvo mezclando 40,71 ml de KLH (7,0 µg proteína/ml a 0,5 µg/ml = 570 ml (7,0 µg/ml)(x) = (0,5)(570 ml)), 244,29 ml solución tampón fosfato salina a un pH de 7,4 y 285 ml de adyuvante de Freund. En la tabla 5 se describen los tiempos para las principales actividades de este ejemplo.

Tabla 5. Actividades del estudio

Día del estudio	Actividad del estudio
-4, 0 a 49	Observaciones generales sobre el estado de salud general y síntomas clínicos
-3	Peso; asignación aleatoria en grupos; recolección de muestras de sangre de todos los cerdos
0	Examen de salud; administración de IVP N° 1-7 a los grupos 1-7, respectivamente
0-7	Observación de los cerdos por reacciones en el sitio de inyección
14	Grupo 7 reforzado con la vacuna PCV2 N° 7; recolección de muestras de sangre de todos los cerdos
14-21	Observación del grupo 7 por reacciones en el sitio de inyección
16-19	Tratamiento de todos los cerdos con antibióticos (faltan los datos)
19	Transporte de los cerdos desde el primer sitio de prueba al segundo sitio de prueba
21	Tratamiento de los grupos 1-9 con KLH/ICFA
24	Recolección de muestras de sangre y de hisopados nasales de todos los cerdos; peso de todos los cerdos; exposición de los grupos 1-8 con material de exposición de PCV2
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47	Recolección de muestras de hisopados nasales de todos los cerdos
27	Tratamiento de los grupos 1-9 con KLH/ICFA
31	Recolección de muestras de sangre de todos los cerdos
49	Recolección de muestras de sangre y de hisopados nasales de todos los cerdos; peso de todos los cerdos; necropsia de todos los cerdos; registro de lesiones visibles con especial énfasis en ictericia y úlceras gástricas; evaluación de lesiones en los pulmones; reserva de muestras de tejido fresco y fijado en formalina; fase en-vida del estudio completada

Una vez completada la fase en-vida del estudio, se examinaron los tejidos fijados en formalina mediante inmunohistoquímica (IHC) para que el patólogo pudiera detectar el antígeno PCV2, se evaluaron las muestras de sangre por la serología de PCV2, se evaluaron las muestras de hisopados nasales por el exudado de PCV2 y se determinó la ganancia de peso diario promedio (ADWG) entre el día 24 y el día 49.

Los animales fueron albergados en el primer sitio de estudio en jaulas individuales en cinco habitaciones desde el nacimiento y hasta los 11 días de vida aproximadamente (día 0 del estudio aproximadamente). Cada habitación era idéntica en cuanto a disposición y consistía de jaulas de acero inoxidable individuales apiladas con suministro de aire caliente y filtrado por separado para cada unidad de aislamiento. Cada habitación tenía calefacción y ventilación separadas, impidiendo de esa manera la contaminación cruzada de aire entre las habitaciones. Los animales fueron albergados en dos instalaciones diferentes en el segundo sitio de estudio. El grupo 9 (el grupo control negativo estricto) fue albergado por separado en un galpón de engorde convertido y los grupos 1-8 fueron albergados en un galpón de cría convertido. Cada grupo fue albergado en un corral separado (11-12 cerdos por corral) y cada corral proporcionaba aproximadamente 3,0 pies cuadrados por cerdo. Cada corral se encontraba sobre un suelo elevado con pisos de listones de plástico. Un pozo debajo de los corrales servía como tanque de retención para excrementos y desechos. Cada instalación tenía sus propios sistemas de calefacción y ventilación, con poca probabilidad de contaminación cruzada de aire entre las instalaciones.

En el primer sitio de estudio, los lechones recibieron una ración de leche especialmente formulada desde el nacimiento y hasta aproximadamente las 3 semanas de vida. Todos los lechones consumían una ración sólida, mixta especial al día 19 (4 ½ semanas de vida aproximadamente). En el segundo sitio de estudio, todos los lechones recibieron una ración de una mezcla comercial especial sin medicación apropiada para su edad y peso, *ad libitum*. También disponían de agua *ad libitum* en ambos sitios de estudio.

Todos los cerdos de prueba fueron tratados con vitamina E el día -2, con inyecciones de hierro el día -1 y con NAXCEL® (1,0 mL, IM, en flancos alternantes) los días 16, 17, 18 y 19. Además, el cerdo N° 52 (grupo 9) fue tratado con una inyección de hierro el día 3, el cerdo 45 (grupo 6) fue tratado con una inyección de hierro el día 11, el cerdo N° 69 (grupo 8) fue tratado con NAXCEL® el día 6, el cerdo N° 74 (grupo 3) fue tratado con dexametazona y penicilina el día 14 y el cerdo N° 51 (grupo 1) fue tratado con dexametazona y penicilina el día 13 y con NAXCEL® el día 14 por diferentes razones de salud.

Mientras permanecían en ambos sitios de estudio, los cerdos se encontraban bajo control veterinario. Los exámenes de salud de los animales se realizaron el día 0 y se registraron en el formulario de registro del examen de salud. Todos los animales se encontraban en un buen estado de salud y nutrición antes de recibir las vacunas según las observaciones efectuadas el día 0. Todos los animales de prueba se encontraban en un buen estado de salud y nutricional antes de la exposición. Las carcasas y los tejidos fueron eliminados por cremación. La disposición final de

los animales de estudio fue registrada en el registro de baja de animales.

5 El día 0, los cerdos asignados a los grupos 1-6 recibieron 1,0 mL de las vacunas de PCV2 1-6, respectivamente, IM, en la región izquierda del cuello usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja de 20g x ½" estéril. Los cerdos asignados al grupo 7 recibieron 2,0 ml de vacuna PCV2 N° 7 IM, en la región izquierda del cuello usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x ½" estéril. El día 14, los cerdos asignados al grupo 7 recibieron 2,0 mL de vacuna PCV2 N° 7 IM, en la región derecha del cuello usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x ½" estéril.

10 El día 21 todos los cerdos de prueba recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA IM en la región del flanco derecho usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x 1" estéril. El día 27 todos los cerdos de prueba recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA en la región del flanco izquierdo usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x 1" estéril.

15 El día 24, los cerdos asignados a los grupos 1-8 recibieron 1,0 mL de material de exposición de prueba PCV2 ISUVDL (5,11 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL), IM, en la región izquierda del cuello usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x 1" estéril. Se administró 1,0 mL adicional del mismo material IN a cada cerdo (0,5 mL por fosa nasal) usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una cánula nasal.

20 Los cerdos de prueba fueron observados todos los días por su estado de salud general y los efectos adversos el día -4 y desde el día 0 hasta el día 19. Las observaciones fueron registradas en el registro de observación clínica. Todos los cerdos de prueba fueron observados entre el día 0 y el día 7 y el grupo 7 fue monitoreado además entre los días 14 y 21, para monitorear las reacciones en el sitio de inyección. La ganancia de peso diario promedio se determinó pesando cada cerdo sobre una balanza calibrada los días -3, 24 y 49, o el día en que el cerdo aparecía muerto después de la exposición. Los pesos corporales fueron registrados en el formulario de peso corporal. Los pesos corporales del día -3 se utilizaron para bloquear los cerdos antes de la asignación aleatoria. Los datos de los pesos del día 24 y del día 49 se utilizaron para determinar la ganancia de peso diario promedio (ADWG) para cada cerdo y para los tiempos definidos. En el caso de los cerdos que murieron después de la exposición y antes del día 49, se ajustó la ADWG para que representara la ADWG desde el día 24 hasta el día de muerte.

30 Con el fin de determinar la serología de PCV2, se recolectó sangre venosa completa del seno venoso orbital de cada lechón los días -3 y 14. Para cada lechón, se recolectó sangre del seno venoso orbital insertando un tubo capilar estéril en el canto medial de uno de los ojos y drenando aproximadamente 3,0 mL de sangre completa en un tubo separador de suero (SST) de 4,0 mL. Los días 24, 31 y 49, se recolectó sangre venosa completa de la vena cava anterior de cada cerdo usando una aguja Vacutainer 18g x 1 ½" estéril (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey), un soporte de aguja Vacutainer y un SST de 13 mL. La recolección de sangre en cada tiempo se registró en el registro de recolección de muestras. Se dejó que la sangre coagulara en cada SST, a continuación se centrifugó cada SST y se cosechó el suero. El suero cosechado se transfirió a un tubo *Snap* estéril y se guardó a -70 ± 10°C hasta su evaluación en una fecha posterior. Las muestras de suero fueron evaluadas por la presencia de anticuerpos contra PCV2 por el personal de BIVI-R&D.

Los cerdos fueron monitoreados una vez por día entre el día 20 y el día 49 por los síntomas clínicos y se registraron las observaciones clínicas en el registro de observación clínica.

45 Para evaluar el exudado nasal de PCV2, los días 24, 25 y luego cada día impar de por medio del estudio hasta el día 49 inclusive, se insertó un hisopo de Dacrón estéril por vía intranasal en cualquiera de las fosas nasales izquierda o derecha de cada cerdo (un hisopo por cerdo) tan asépticamente como fuera posible, se giró unos pocos segundos y luego se retiró. Cada hisopo se colocó luego en un tubo de tapa roscada estéril individual que contiene 1,0 mL de medio EMEM con IFBS 2%, 500 unidades/mL de penicilina, 500 µg/mL de estreptomina y 2,5 µg/mL de Fungizone. Se partió el hisopo del tubo, y el tubo *Snap* se selló y se rotuló apropiadamente con el número de animal, número de estudio, fecha de recolección, día del estudio e "hisopado nasal". Los tubos *Snap* sellados se guardaron a -40 ± 10°C hasta transportarlos por la noche sobre hielo a BIVI-St. Joseph. Las recolecciones de hisopados nasales fueron registradas en el formulario de recolección de muestras por hisopado nasal. En BIVI-R&D se efectuaron las pruebas de aislamiento cuantitativo del virus (VI) para PCV2 con las muestras de hisopados nasales. Los resultados se expresaron en valores de log<sub>10</sub>. Un valor de 1,3 logs o menos era considerado negativo y cualquier valor superior a 1,3 logs era considerado positivo.

60 Los cerdos que murieron (N° 28, 52, 56, 69, 82 y 93) en el primer sitio de estudio fueron sometidos a necropsia hasta el nivel necesario como para determinar el diagnóstico. Se registraron las lesiones visibles y no se retuvieron tejidos de estos cerdos. En el segundo sitio de estudio, se efectuó necropsia de los cerdos que murieron antes del día 49 (N° 45, 23, 58, 35), los cerdos que aparecieron muertos el día 49 antes de sacrificarlos (N° 2, 43) y los cerdos sacrificados el día 49. Se registraron todas las lesiones visibles y también los porcentajes de lóbulos pulmonares con lesiones en el formulario de informe de necropsia.

65 De cada uno de los 103 cerdos a los que se les había efectuado necropsia en el segundo sitio de estudio, se tomó una muestra de tejido de amígdala, pulmón, corazón, hígado, nódulo linfático mesentérico, riñón y nódulo linfático

inguinal que se colocó en un envase individual con formalina 10% amortiguada; y otra muestra de tejido de los mismos órganos mencionados se colocó en un Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino Unido) y cada Whirl-pak se colocó sobre hielo. Cada envase se rotuló apropiadamente. Las recolecciones de muestras se registraron en el formulario de informe de necropsia. Posteriormente, se enviaron las muestras de tejidos fijados en formalina y un formulario de solicitud de diagnóstico para las pruebas de IHC. Las pruebas de IHC se realizaron de acuerdo con los procedimientos de laboratorio ISU estándar para recibir muestras, preparar muestras y portaobjetos y usar las técnicas de coloración. Los tejidos frescos en los Whirl-pak fueron enviados sobre hielo al Monitor del estudio para su almacenamiento ( $-70^{\circ} \pm 10^{\circ} \text{C}$ ) y posible uso futuro. Los tejidos fijados en formalina fueron examinados por un patólogo para detectar el PCV2 por IHC y se calificaron de acuerdo con el siguiente sistema de puntaje: 0 = ninguno; 1 = escasa coloración positiva, pocos sitios; 2 = coloración positiva moderada, múltiples sitios; y 3 = coloración positiva abundante, difusa en todo el tejido. Debido al hecho que el patólogo no podía diferenciar positivamente el LN inguinal del LN mesentérico, los resultados para estos tejidos se rotularon simplemente como nódulo linfático y el puntaje asignado era el puntaje más alto de cada uno de los dos tejidos por animal.

## 15 Resultados

Los resultados para este ejemplo se muestran más adelante. Cabe destacar que un cerdo del grupo 9 murió antes del día 0 y 5 cerdos más murieron después de la vacunación (1 cerdo del grupo 4; 1 cerdo del grupo 6; 2 cerdos del grupo 8; y 1 cerdo del grupo 9). Los exámenes de post-mortem indicaron que los seis animales murieron debido a infecciones subyacentes que no estaban asociados con la vacunación o con PMWS. Además, no se registraron efectos adversos o reacciones en el sitio de inyección en ninguno de los grupos.

Los resultados de la ganancia de peso diario promedio (ADWG) se muestran a continuación en la tabla 6. El grupo 9, el grupo control negativo estricto, tenía la ADWG más alta ( $1,06 \pm 0,17$  lbs/día), seguido del grupo 5 ( $0,94 \pm 0,22$  lbs/día), que recibieron una dosis de  $8 \mu\text{g}$  de rORF2. El grupo 3, que recibió una dosis de  $4 \mu\text{g}$  de vORF2, tenía la ADWG más baja ( $0,49 \pm 0,21$  lbs/día), seguido del grupo 7 ( $0,50 \pm 0,15$  lbs/día), que recibió 2 dosis de vacuna de células muertas.

**Tabla 6. Resumen de la ganancia de peso diario promedio (ADWG) de los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	ADWG-lbs/día (día 24 al día 49) o ajustado para los cerdos que murieron antes del día 29
1	vORF2-16 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	12	$0,87 \pm 0,29$ lbs/día
2	vORF2-8 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	12	$0,70 \pm 0,32$ lbs/día
3	vORF2-4 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	12	$0,49 \pm 0,21$ lbs/día
4	rORF2-16 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	11	$0,84 \pm 0,30$ lbs/día
5	rORF2-8 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	12	$0,94 \pm 0,22$ lbs/día
6	rORF2-4 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	11	$0,72 \pm 0,25$ lbs/día
7	KV (2 dosis)	12	$0,50 \pm 0,15$ lbs/día
8	Controles de exposición	10	$0,76 \pm 0,19$ lbs/día
9	Control negativo estricto	11	$1,06 \pm 0,17$ lbs/día

30 vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; virus completos muertos = virus PCV2 cultivado en un cultivo celular adecuado

Los resultados de la serología de PCV2 se muestran en la siguiente tabla 7. Los nueve grupos eran seronegativos para PCV2 el día -3. El día 14, los grupos que recibieron vacunas vORF2 tenían los títulos más altos, que variaban en un rango entre 187,5 y 529,2. Los cerdos que recibieron la vacuna de virus muerto tenían los siguientes títulos más altos, seguido de los grupos que recibieron vacunas rORF2. Los grupos 8 y 9 permanecieron seronegativos en ese momento. El día 24 y el día 31, los cerdos que recibieron vacunas vORF2 continuaron mostrando una fuerte respuesta serológica, seguido estrechamente por el grupo que recibió dos dosis de vacuna a virus muerto. Los cerdos que recibieron vacunas rORF2 mostraron una respuesta serológica más lenta y los grupos 8 y 9 continuaron seronegativos. El día 49, los cerdos que recibieron la vacuna vORF2, 2 dosis de la vacuna de virus muerto y la menor dosis de rORF2 mostraron las respuestas serológicas más fuertes. Los cerdos que recibieron  $16 \mu\text{g}$  y  $8 \mu\text{g}$  de vacunas rORF2 tenían títulos IFA ligeramente más altos que los controles de prueba. El grupo 9 demostró el día 49 una fuerte respuesta serológica.

**Tabla 7. Resumen de los títulos de IFA PCV2 de los grupos**

TÍTULO IFA PROMEDIO						
Grupo	Tratamiento	Día -3	Día 14	Día 24	Día 31**	Día 49***
1	vORF2-16 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	50,0	529,2	4400,0	7866,7	11054,5
2	vORF2-8 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	50,0	500,0	3466,7	6800,0	10181,8
3	vORF2-4 $\mu\text{g}$ (1 dosis)	50,0	187,5	1133,3	5733,3	9333,3

4	rORF2-16 µg (1 dosis)	50,0	95,5	1550,0	3090,9	8000,0
5	rORF2-8 µg (1 dosis)	50,0	75,0	887,5	2266,7	7416,7
6	rORF2-4 µg (1 dosis)	50,0	50,0	550,0	3118,2	10570,0
7	KV (2 dosis)	50,0	204,2	3087,5	4620,8	8680,0
8	Controles de prueba	50,0	55,0	50,0	50,0	5433,3
9	Control negativo estricto	50,0	59,1	59,1	54,5	6136,4

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; virus completos muertos = virus de PCV2 cultivados en el cultivo celular adecuado

\*A efectos de los cálculos, un título de IFA =100 se denominó título de "50"; un título IFA =6400 se denominó título de "12.800".

- 5 \*\*Día de la exposición
- \*\*\*Día de la necropsia

Los resultados de las observaciones clínicas después de la exposición se muestran en la siguiente tabla 8. Este resumen de los resultados incluye observaciones de conducta anormal, respiración anormal, tos y diarrea. La tabla 9 incluye los resultados del resumen de la incidencia general de síntomas clínicos de los grupos y la tabla 10 incluye los resultados del resumen de los índices de mortalidad de post-exposición de los grupos. El síntoma clínico más común observado en este estudio fue una conducta anormal, que se calificó como letargia leve a severa. Los cerdos que recibieron las 2 dosis inferiores de vORF2, los cerdos que recibieron 16 µg de rORF2 y los cerdos que recibieron 2 dosis de vacuna KV tenían índices de incidencia de = 27,3%. Los cerdos que recibieron 8 µg de rORF2 y el grupo control negativo estricto no presentaron una conducta anormal. En este estudio ninguno de los cerdos mostró una respiración anormal. La tos era frecuente en los 15 grupos (0 a 25%), así como la diarrea (0-20%). Ninguno de los síntomas clínicos observados era patognómico para PMWS.

La incidencia general de síntomas clínicos variaba según los grupos. Los grupos que recibieron cualquiera de las vacunas vORF2, el grupo que recibió 16 µg de rORF2, el grupo que recibió 2 dosis de vacuna KV y el grupo de control de prueba tenían la mayor incidencia de todos los síntomas clínicos (=36,4%). El grupo control negativo estricto, el grupo que recibió 8 µg de rORF2 y el grupo que recibió 4 µg de rORF2 tenían índices de incidencia general de síntomas clínicos del 0%, 8,3% y 9,1%, respectivamente.

Los índices de mortalidad generales también variaban según los grupos. El grupo que recibió 2 dosis de vacuna KV mostró el mayor índice de mortalidad (16,7%); en tanto los grupos que recibieron 4 µg de vORF2, 16 µg de rORF2 u 8 µg de rORF2 y el grupo control negativo estricto presentaban todos índices de mortalidad del 0%.

**Tabla 8. Resumen de las observaciones de conducta anormal, respiración anormal, tos y diarrea en los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Conducta anormal <sup>1</sup>	Conducta anormal <sup>2</sup>	Tos <sup>3</sup>	Diarrea <sup>4</sup>
1	vORF2-16 µg (1 dosis)	12	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)
2	vORF2-8 µg (1 dosis)	12	4/12 (33,3%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	1/12 (8,3%)
3	vORF2-4 µg (1 dosis)	12	8/12 (66,7%)	0/12 (0%)	2/12 (16,7%)	1/12 (8,3%)
4	rORF2-16 µg (1 dosis)	11	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
5	rORF2-8 µg (1 dosis)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)
6	rORF2-4 µg (1 dosis)	11	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 dosis)	12	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)
8	Control de prueba	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	Control negativo estricto	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; virus completos muertos = virus PCV2 cultivado en cultivo celular adecuado

<sup>1</sup> Número total de cerdos en cada grupo que demostró alguna conducta anormal durante al menos un día

<sup>2</sup> Número total de cerdos en cada grupo que demostró algún tipo de respiración anormal durante al menos un

35 día

<sup>3</sup> Número total de cerdos en cada grupo que demostró tos durante al menos un día

<sup>4</sup> Número total de cerdos en cada grupo que demostró diarrea durante al menos un día

**Tabla 9. Resumen de la incidencia general de síntomas clínicos en los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con síntomas clínicos <sup>1</sup>	Índice de incidencia de
1	vORF2-16 µg (1 dosis)	12	5	41,7%
2	vORF2-8 µg (1 dosis)	12	5	41,7%
3	vORF2-4 µg (1 dosis)	12	8	66,7%
4	rORF2-16 µg (1 dosis)	11	4	36,4%
5	rORF2-8 µg (1 dosis)	12	1	8,3%
6	rORF2-4 µg (1 dosis)	11	1	9,1%
7	KV (2 dosis)	12	7	58,3%
8	Control de prueba	10	4	40%
9	Control negativo estricto	11	0	0%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; virus completos muertos = virus PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

<sup>1</sup> Número total de cerdos en cada grupo que demostró algún síntoma clínico durante al menos un día

5

**Tabla 10. Resumen de los índices de mortalidad de los grupos después de la exposición**

Grupo	Tratamiento	N	Muertos después de la exposición	Índice de mortalidad
1	vORF2-16 µg (1 dosis)	12	1	8,3%
2	vORF2-8 µg (1 dosis)	12	1	8,3%
3	vORF2-4 µg (1 dosis)	12	0	0%
4	rORF2-16 µg (1 dosis)	11	0	0%
5	rORF2-8 µg (1 dosis)	12	0	0%
6	rORF2-4 µg (1 dosis)	11	1	9,1%
7	KV (2 dosis)	12	2	16,7%
8	Control de prueba	10	1	10%
9	Control negativo estricto	11	0	0%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; virus completos muertos = virus PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

10 Los resultados de exudado nasal de PCV2 se muestran en la siguiente tabla 11. Después de la exposición el día 24, 1 cerdo en el grupo 7 comenzó a exudar PCV2 el día 27. Ninguno de los demás grupos experimentó exudado hasta el día 33. La mayor parte de exudados nasales se notó a partir del día 35 y hasta el día 45. Los grupos que recibieron cualquiera de las tres vacunas vORF2 y los grupos que recibieron ya sea 4 ó 8 µg de rORF2 tenían la menor incidencia de exudado nasal de PCV2 (= 9,1%). El grupo control de prueba (grupo 8) tenía el mayor índice de exudado (80%), seguido por el grupo control negativo estricto (grupo 9), que tenía un índice de incidencia del 63,6%.

15

**Tabla 11. Resumen de incidencia de exudado nasal de PCV2 en los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos con exudado durante al menos un día	Índice de incidencia
1	vORF2-16 µg (1 dosis)	12	1	8,3%
2	vORF2-8 µg (1 dosis)	12	1	8,3%
3	vORF2-4 µg (1 dosis)	12	1	8,3%
4	rORF2-16 µg (1 dosis)	11	2	18,2%
5	rORF2-8 µg (1 dosis)	12	1	8,3%
6	rORF2-4 µg (1 dosis)	11	1	9,1%
7	KV (2 dosis)	12	5	41,7%
8	Control de prueba	10	8	80%
9	Control negativo estricto	11	7	63,6%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; virus completos muertos = virus PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

5 Los resúmenes de incidencia de ictericia en los grupos, incidencia de úlceras gástricas en los grupos, puntajes promedio de lesiones pulmonares en los grupos e incidencia de lesiones pulmonares en los grupos se muestran a continuación en la tabla 12. Seis cerdos murieron en el primer sitio de prueba durante la fase de post-vacunación del estudio (grupo 4, N=1; grupo 6, N=1; grupo 8, N=2; grupo 9, N=2). Cuatro de seis cerdos presentaron lesiones fibrosas en una o más cavidades del cuerpo, un cerdo (grupo 6) mostró lesiones coherentes con la enfermedad por clostridia y un cerdo (grupo 9) no presentaba lesiones visibles. Ninguno de los cerdos que murió durante la fase de post-vacunación del estudio tenía lesiones coherentes con PMWS.

15 Los cerdos que murieron después de la exposición y los cerdos sacrificados el día 49 fueron sometidos a necropsia. En la necropsia no se observó ictericia ni úlceras gástricas en ninguno de los grupos. Con respecto al % promedio de lesiones pulmonares, el grupo 9 tenía el menor % promedio de lesiones pulmonares (0%), seguido del grupo 1 con  $0,40 \pm 0,50\%$  y el grupo 5 con  $0,68 \pm 1,15\%$ . Los grupos 2, 3, 7 y 8 tenían el mayor % promedio de lesiones pulmonares ( $= 7,27\%$ ). Cada uno de estos cuatro grupos comprendía un cerdo con un % lesiones pulmonares  $= 71,5\%$ , que sesgó los resultados más altos para estos cuatro grupos. Con excepción del grupo 9 con 0% de lesiones pulmonares, los 8 grupos restantes tenían un  $= 36\%$  de lesiones pulmonares. Casi todas las lesiones pulmonares observadas se describieron como rojas/púrpuras y consolidadas.

20 **Tabla 12. Resumen de incidencia de Ictericia en los grupos, incidencia de úlceras gástricas en los grupos, % promedio de puntajes de lesiones pulmonares en los grupos e incidencia de lesiones pulmonares observadas de los grupos**

Grupo	Tratamiento	Ictericia	Úlceras gástricas	% promedio de lesiones pulmonares	Incidencia de lesiones pulmonares observadas
1	vORF2-16 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$0,40 \pm 0,50\%$	10/12 (83%)
2	vORF2-8 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$7,41 \pm 20,2\%$	10/12 (83%)
3	vORF2-4 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$9,20 \pm 20,9\%$	10/12 (83%)
4	rORF2-16 µg (1 dosis)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	$1,5 \pm 4,74\%$	4/11 (36%)
5	rORF2-8 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$0,68 \pm 1,15\%$	9/12 (75%)
6	rORF2-4 µg (1 dosis)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	$2,95 \pm 5,12\%$	7/11 (64%)
7	KV (2 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$7,27 \pm 22,9\%$	9/12 (75%)
8	Control de prueba	0/10 (0%)	0/10 (0%)	$9,88 \pm 29,2\%$	8/10 (80%)
9	Control negativo estricto	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

25 vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

30 El resumen de los resultados de incidencia positiva de IHC en los grupos se muestra en la tabla 13. El grupo 1 (vORF2-16 µg) y el grupo 5 (rORF2-8 µg) tenían el menor índice de resultados IHC positivos (16,7%). El grupo 8 (Control de prueba) y el grupo 9 (control negativo estricto) tenían el mayor índice de resultados IHC positivos, del 90% y 90,9%, respectivamente.

**Tabla 13. Resumen de la índice de incidencia de IHC Positivo en los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos con al menos un tejido positivo para PCV2	Índice de incidencia de
1	vORF2-16 µg (1 dosis)	12	2	16,7%
2	vORF2-8 µg (1 dosis)	12	3	25,0%
3	vORF2-4 µg (1 dosis)	12	8	66,7%
4	rORF2-16 µg (1 dosis)	11	4	36,3%
5	rORF2-8 µg (1 dosis)	12	2	16,7%
6	rORF2-4 µg (1 dosis)	11	4	36,4%

7	KV (2 dosis)	12	5	41,7%
8	Control de prueba	10	9	90,0%
9	Control negativo estricto	11	10	90,9%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

- 5 Después de la exposición, el grupo 5, que recibió una dosis de 8 µg de antígeno rORF2, superó a los otros 6 grupos de vacunas. El grupo 5 tenía la mayor ADWG ( $0,94 \pm 0,22$  lbs/día), la menor incidencia de conducta anormal (0%), la segunda menor incidencia de tos (8,3%), la menor incidencia de síntomas clínicos generales (8,3%), el menor índice de mortalidad (0%), el menor índice de exudado nasal de PCV2 (8,3%), el segundo menor índice de % promedio de lesiones pulmonares ( $0,68 \pm 1,15\%$ ) y el menor índice de incidencia de tejidos positivos (16,7%). Los grupos que recibieron diversos niveles de antígeno rORF2 en general superaron a los grupos que recibieron diversos niveles de vORF2 y el grupo que recibió 2 dosis de vacuna de células enteras muertas PCV2 tuvieron los peores resultados. Las tablas 14 y 15 contienen resúmenes de los datos para los grupos después de la exposición.

**Tabla 14. Resumen de los datos de post-exposición de los grupos: Parte 1**

Grupo	N	Tratamiento	ADWG (lbs/día)	Conducta anormal	Tos	Incidencia general de síntomas clínicos
1	12	vORF2-16 µg (1 dosis)	$0,87 \pm 0,29$	2/12 (16,7%)	3/12 (25%)	41,7%
2	12	vORF2-8 µg (1 dosis)	$0,70 \pm 0,32$	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)	41,7%
3	12	vORF2-4 µg (1 dosis)	$0,49 \pm 0,21$	8/12 (66,7%)	2/12 (16,7%)	66,7%
4	11	rORF2-16 µg (1 dosis)	$0,84 \pm 0,30$	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	36,4%
5	12	rORF2-8 µg (1 dosis)	$0,94 \pm 0,22$	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	8,3%
6	11	rORF2-4 µg (1 dosis)	$0,72 \pm 0,25$	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	9,1%
7	12	KV (2 dosis)	$0,50 \pm 0,15$	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	58,3%
8	10	Control de prueba	$0,76 \pm 0,19$	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40%
9	11	Control negativo estricto	$1,06 \pm 0,17$	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0%

- 15 vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

**Tabla 15. Resumen de los datos de post-exposición de los grupos: Parte 2**

Grupo	N	Tratamiento	Índice de mortalidad	Exudado nasal	% promedio de lesiones pulm.	Índice de incidencia de al menos un tejido IHC positivo para PCV2
1	12	vORF2-16 µg (1 dosis)	8,3%	8,3%	$0,40 \pm 0,50\%$	16,7%
2	12	vORF2-8 µg (1 dosis)	8,3%	8,3%	$7,41 \pm 20,2\%$	25,0%
3	12	vORF2-4 µg (1 dosis)	0%	8,3%	$9,20 \pm 20,9\%$	66,7%
4	11	rORF2-16 µg (1 dosis)	0%	18,2%	$1,50 \pm 4,74\%$	36,3%
5	12	rORF2-8 µg (1 dosis)	0%	8,3%	$0,68 \pm 1,15\%$	16,7%
6	11	rORF2-4 µg (1 dosis)	9,1%	9,1%	$2,95 \pm 5,12\%$	36,4%
7	12	KV (2 dosis)	16,7%	41,7%	$7,27 \pm 22,9\%$	41,7%
8	10	Control de prueba	10%	80%	$9,88 \pm 29,2\%$	90,0%
9	11	Control negativo estricto	0%	63,6%	0/11 (0%)	90,9%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos

= virus PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

Los resultados de este estudio indican que todos los enfoques de vacuna deberían centrarse en una vacuna rORF2. En general, el exudado nasal de PCV2 se detectó después de la exposición y la vacunación con una vacuna de PCV2 dio como resultado una reducción del exudado. La inmunohistoquímica de tejidos linfoides selectos también sirvió como un buen parámetro para la eficacia de la vacuna, en tanto no se detectaron grandes diferencias en ADWG, síntomas clínicos y lesiones visibles entre los grupos. Este estudio era complicado por el hecho que en algún punto se introdujo un PCV2 extraño durante el estudio, como lo demuestra el exudado nasal de PCV2, la seroconversión de PCV2 y los tejidos IHC positivos en el grupo 9, el grupo control negativo estricto.

#### Discusión

En este estudio se evaluaron siete vacunas de PCV2, que incluyeron tres diferentes niveles de dosis de antígeno vORF2 administrado una vez el día 0, tres diferentes niveles de dosis de antígeno rORF2 administrado una vez el día 0 y un nivel de dosis de vacuna de células enteras muertas de PCV2 administrado el día 0 y el día 14. En general, el grupo 5, que recibió 1 dosis de vacuna que contenía 8 µg de antígeno rORF2, presentaba los mejores resultados. El grupo 5 tenía la mayor ADWG, la menor incidencia de conducta anormal, la menor incidencia de respiración anormal, la segunda menor incidencia de tos, la menor incidencia de síntomas clínicos generales, el menor índice de mortalidad, el menor índice de exudado nasal de PCV2, el segundo menor índice del % promedio de lesiones pulmonares y el menor índice de incidencia para tejidos IHC positivos.

Curiosamente, el grupo 4, que recibió una dosis más alta de antígeno rORF2 que el grupo 5, no se comportó tan bien o mejor que el grupo 5. El grupo 4 tenía una ADWG ligeramente menor, una mayor incidencia de conducta anormal, una mayor incidencia de síntomas clínicos generales, un mayor índice de exudado nasal de PCV2, un mayor % promedio de lesiones pulmonares y un mayor índice para tejidos IHC positivos que el grupo 5. Los análisis estadísticos, que podrían haber indicado que las diferencias entre estos dos grupos no eran estadísticamente significativas, no se efectuaron con estos datos, pero se observó una tendencia que el grupo 4 no presentaba el mismo comportamiento que el grupo 5.

Después de la vacunación, 6 cerdos murieron en el primer sitio de estudio. Cuatro de los seis cerdos eran del grupo 8 o grupo 9, que no recibieron vacuna. Ninguno de los seis cerdos mostraron lesiones coherentes con PMWS, no se informaron efectos adversos y en general, las siete vacunas parecen seguras cuando son administradas a cerdos de 11 días de vida aproximadamente. Durante la fase de post-vacunación del estudio, los cerdos que recibieron ya sea tres niveles de dosis de vacuna vORF2 o una vacuna a células enteras muertas presentaban los niveles más altos de IFAT, en tanto el grupo 5 presentaba los menores niveles de IFAT justo antes de la exposición, entre los grupos de vacunas.

Aunque no se ha demostrado formalmente, se cree que la ruta de transmisión predominante de PCV2 a los cerdos jóvenes poco después del destete es por contacto oronasal directo y entonces una vacuna eficaz que permita reducir el exudado nasal de PCV2 en un establecimiento de producción ayudaría a controlar la dispersión de la infección. Los grupos que recibieron uno de los tres niveles de antígeno vORF2 y el grupo que recibió 8 µg de rORF2 tenían el menor índice de incidencia de exudado nasal de PCV2 (8,3%). Como era de esperar, el grupo control de prueba tenía el mayor índice de incidencia de exudado nasal (80%).

Las lesiones visibles en cerdos con PMWS secundaria a una infección por PCV2 consisten típicamente de una linfadenopatía generalizada en combinación con uno o más de lo siguiente: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis. En el momento de la necropsia, no se observó ictericia, hepatitis, nefritis ni úlceras gástricas en ninguno de los grupos y no se examinó específicamente la linfadenopatía. El % promedio de puntajes de lesiones pulmonares varió según los grupos. El grupo que recibió 16 µg de antígeno vORF2 tenía el menor % promedio de puntaje de lesión pulmonar (0,40 ± 0,50%), seguido por el grupo que recibió 8 µg de rORF2 (0,68 ± 1,15%). Como era de esperar, el grupo control de prueba tenía el mayor % promedio de puntaje de lesión pulmonar (9,88 ± 29,2%). En los cuatro grupos, el % promedio de puntajes de lesiones pulmonares era elevado debido a que un cerdo en cada uno de estos grupos tenía puntajes muy altos de puntaje de lesión pulmonar. La mayoría de las lesiones pulmonares fueron descritas como rojas/púrpuras y consolidadas. Típicamente, las lesiones pulmonares asociados con PMWS se describen como de un color tostado y no colapsable con edema interlobular. Las lesiones pulmonares observadas en este estudio no estaban asociadas con la infección por PCV2 o se debían a la presencia de un segundo agente infeccioso de pulmón. En el contexto de este estudio, el % de puntajes de lesiones pulmonares probablemente no reflejan una medida verdadera de la cantidad de infección de pulmón debido a PCV2.

Otros investigadores han demostrado una correlación directa entre la presencia de antígeno de PCV2 por IHC e histopatología. En este estudio no se empleó histopatología en tejidos selectos. El grupo 1 (16 µg de vORF2) y el grupo 5 (8 µg de rORF2) tenían el menor índice de incidencia de cerdos positivos para el antígeno de PCV2 (8,3%), en tanto el grupo 9 (el grupo control negativo estricto: 90,9%) y el grupo 8 (el grupo control de prueba: 90,0%) tenía el mayor índice de incidencia de cerdos positivos para el antígeno de PCV2. Debido a la naturaleza no subjetiva de esta prueba, los resultados de IHC probablemente sean los mejores parámetros para juzgar la eficacia de la vacuna.

Por lo tanto, se determinó la dosificación protectora mínima (MPD) de una dosis de 1 ml/1 de producto recombinante con el antígeno ORF2 de PCV2 extraído (rORF2) en el modelo de cerdo CDCD frente a una exposición a PCV2. Entre los tres grupos que recibieron niveles variables de antígeno rORF2, el grupo 5 (8 µg de antígeno rORF2) tenía claramente el nivel de protección más alto. El grupo 5 presentaba los mejores resultados o comparables a los resultados más favorable con respecto a todos los parámetros examinados. Cuando se comparaba el grupo 5 con los otros seis grupos de vacuna después de la exposición, el grupo 5 presentaba la mayor ADWG (0,94 ± 0,22 lbs/día), la menor incidencia de conducta anormal (0%), la segunda menor incidencia de tos (8,3%), la menor incidencia de síntomas clínicos generales (8,3%), el menor índice de mortalidad (0%), el menor índice de exudado nasal de PCV2 (8,3%), el segundo menor índice de % promedio de lesiones pulmonares (0,68 ± 1,15%) y el menor índice de incidencia para tejidos IHC positivos (16,7%).

Se determinó la MPD de una dosis de 1 ml/1 de un producto convencional que es el antígeno ORF2 de PCV2 (vORF2) parcialmente purificado en el modelo de cerdo CDCD frente a la exposición a PCV2. De los tres grupos que recibieron niveles variables de antígeno vORF2, el grupo 1 (16 µg de vORF2) presentaba el mayor nivel de protección. El grupo 1 fue mejor que los grupos 2 y 3 con respecto a la ADWG, el % promedio de lesiones pulmonares e IHC. Los grupos 1 y 2 (8 µg de antígeno vORF2) se comportaron igual con respecto a la incidencia general de los síntomas clínicos, el grupo 3 (4 µg de antígeno vORF2) presentaba el menor índice de mortalidad y los tres grupos se comportaron igual con respecto al exudado nasal. En general, las vacunas vORF no se desempeñaron como las vacunas rORF.

Se determinó la eficacia de una dosis máxima de una dosis 2 ml/2 de una vacuna de PCV2 de células muertas convencional en el modelo de cerdo CDCD frente a la exposición a PCV2. Entre las siete vacunas evaluadas en este estudio, la vacuna de células enteras muertas de PCV2 tuvo el peor desempeño. Los lechones que recibieron dos dosis de vacuna de células enteras muertas de PCV2 presentaron la menor ADWG, el segundo mayor índice de conducta anormal (58,3%), la segunda mayor incidencia general de síntomas clínicos (58,3%), el mayor índice de mortalidad (16,7%), la segunda mayor incidencia de exudado nasal (41,7%), el mayor % promedio de lesiones pulmonares (9,88 ± 29,2%), una gran incidencia de lesiones pulmonares observadas (75%) y un moderado índice de incidencia por IHC en tejidos (41,7%). Sin embargo, aún era eficaz para generar una respuesta inmune.

Se evaluó el exudado nasal de PCV2 como un parámetro de eficacia y se reconfirmaron los parámetros de eficacia de PCV2 anteriores obtenidos de estudios previos. Los resultados de este estudio indican que el exudado nasal de PCV2 tiene lugar después de una exposición intranasal y que las vacunas de PCV2 reducen el exudado nasal de PCV2 después de la exposición. Aún más, los resultados de este estudio y los informes en la literatura indican que también se debe continuar con la evaluación por IHC en futuros estudios de vacunas de PCV2.

Algunas conclusiones adicionales que surgen a partir de este estudio son que la linfadenopatía es uno de los elementos distintivos de PMWS. Otro de los elementos distintivos de PMWS es la depleción linfoide y los multinucleados/histiocitos gigantes. Además, no se observaron efectos adversos o reacciones en el sitio de la inyección para ninguna de las 7 vacunas de PCV2 y las 7 vacunas de PCV2 parecen seguras cuando son administradas a cerdos jóvenes.

**EJEMPLO 5**

En este ejemplo se evalúa la eficacia de ocho candidatos de vacunas PCV2 y se reafirman los parámetros de exposición a PCV2 de estudios de exposición previos después de la exposición a una cepa virulenta de PCV2. Se utilizaron ciento cincuenta (150) lechones nacidos por cesárea, privados de calostro (CDCD), de 6-16 días de vida, se bloquearon por peso y se dividieron aleatoriamente en 10 grupos de igual tamaño. En la tabla 16 se muestra el diseño general del estudio de este ejemplo.

**Tabla 16. Diseño general del estudio**

Grupo	Nº cerdos	Tratamiento	Día de tratam.	KLH/ICFA el día 22 y el día 28	Exposición a PCV2 virulento el día 25	PRRSV MLV el día 46	Necropsia el día 50
1	15	Vacuna PVC2 1 16 µg de rORF2-IMS 1314	0 y 14	+	+	+	+
2	15	Vacuna PVC2 2 16 µg de vORF2-Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
3	15	Vacuna PCV2 3 16 µg de rORF2-Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
4	15	Vacuna PCV2 2 16 µg de vORF2-Carbopol	0	+	+	+	+

5	15	Vacuna PVC2 3 4 µg de rORF2- Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
6	15	Vacuna PVC2 3 1 µg de rORF2- Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
7	15	Vacuna PVC2 3 0,25 µg de rORF2- Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
8	15	Vacuna PVC2 4 > 8,0 log KV- Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
9	15	Control de prueba	N/D	+	+	+	+
10	15	Grupo control negativo no estricto	N/D	+	-	+	+

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus de PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

5 La formulación de vacuna administrada a cada grupo fue como sigue. La vacuna PCV2 N° 1, administrada a una  
dosis de 1 x 2 ml al grupo 1, era una dosis alta (dosis de 16 ug/2 ml) de antígeno ORF2 recombinante inactivado con  
adyuvante de IMS 1314 (16 ug de rORF2-IMS 1314). La vacuna PCV2 N° 2, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al  
grupo 2, era una dosis alta (dosis de 16 ug/2 ml) de un antígeno de ORF2 PCV2 generado por VIDO R-1  
parcialmente purificado con adyuvante de Carbopol (16 ug de vORF2-Carbopol). La vacuna PCV2 N° 3,  
10 administrada a una dosis de 1 x 2 ml al grupo 3, era una dosis alta (dosis de 16 ug/2 ml) de antígeno de ORF2  
recombinante inactivado con adyuvante de Carbopol (16 ug de rORF2-Carbopol). La vacuna PCV2 N° 4,  
administrada a una dosis de 1 x 1 ml al grupo 4, era una dosis alta (dosis de 16 ug /1 ml) de un antígeno de ORF2  
PCV2 generado por VIDO R-1 parcialmente purificado con adyuvante de Carbopol (16 ug vORF2-Carbopol). La  
vacuna N° 5, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al grupo 5, era una dosis de 4 ug/2 ml de un antígeno de ORF2  
15 recombinante inactivado con adyuvante de Carbopol (4 ug de rORF2-Carbopol). La vacuna PCV2 N° 6, administrada  
a una dosis de 1 x 2 ml al grupo 6, era una dosis de 1 ug/2 ml de un antígeno de ORF2 recombinante inactivado con  
adyuvante de Carbopol (1 ug de rORF2-Carbopol). La vacuna PCV2 N° 7, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al  
grupo 7, era una dosis baja (dosis de 0,25 ug/2 ml) de antígeno ORF2 recombinante inactivado con adyuvante de  
Carbopol (0,25 ug de rORF2-Carbopol). La vacuna PCV2 N° 8, administrada a una dosis de 1 x 2 ml al grupo 8, era  
20 una dosis alta (título de pre-inactivación > 8,0 log/2 ml dosis) de un antígeno Struve PCV2 generado por VIDO R-1  
inactivado convencional muerto con adyuvante de Carbopol (>8,0 log KV-Carbopol). El día 0, los grupos 1-8 fueron  
tratados con las vacunas asignadas. Los grupos 1-3 y 5-8 recibieron refuerzos de sus respectivas vacunas  
nuevamente el día 14. La eficacia de una sola dosis de 16 µg de vORF2-Carbopol fue evaluada con el grupo 4 que  
no recibió refuerzo el día 14. Los lechones fueron monitoreados por efectos adversos y reacciones en el sitio de  
inyección después de ambas vacunaciones. El día 21 los lechones fueron movidos al segundo sitio de estudio donde  
25 los grupos 1-9 fueron albergados en una instalación y el grupo 10 fue albergado en una instalación separada. Todos  
los cerdos recibieron hemocianina de lapa emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA) los días  
22 y 28. El día 25, los grupos 1-9 fueron expuestos a aproximadamente 4 logs de virus PCV2 virulento. Para el día  
46, se habían producido muy pocas muertes en el grupo control de prueba. En un intento por inmunoestimular a los  
cerdos e incrementar la virulencia del material de exposición de prueba PCV2, todos los grupos fueron tratados con  
30 INGELVAC® PRRSV MLV (vacuna reproductora y respiratoria porcina, virus vivo modificado) el día 46.

Antes y después de la exposición se recolectaron muestras de sangre para la serología de PCV2. Después de la  
exposición, se registraron los datos del peso corporal para determinar la ganancia de peso diario promedio (ADWG)  
y las observaciones de los signos clínicos. El día 50, todos los cerdos que sobrevivieron fueron sacrificados, se  
35 registraron las lesiones visibles, se calificó la patología de los pulmones y algunos tejidos selectos fueron  
conservados en formalina para su examen mediante inmunohistoquímica (IHC) con el fin de detectar el antígeno  
PCV2 en un momento posterior.

#### 40 Materiales y métodos

Este era un estudio de viabilidad frente a la exposición a una vacunación parcialmente ciego realizado con cerdos  
CDCD, de 6 a 16 días de vida el día 0. Para su inclusión en el estudio, los títulos IFA PCV2 de las cerdas eran de =  
1:1000. Además, el estado serológico de las cerdas era de una piara conocida PRRS-negativa. Se evaluaron  
dieciséis (16) cerdas por el estado serológico de PCV2 y las dieciséis (16) tenían un título de PCV2 de = 1000 y  
45 fueron transferidas al primer sitio de estudio. Se emplearon ciento cincuenta (150) lechones nacidos por cirugía  
cesárea y estaban disponibles para este estudio el día -3. El día -3, se pesaron los 150 cerdos CDCD en el primer  
sitio de estudio, se identificaron con rótulos de oreja, fueron bloqueados por peso y asignados aleatoriamente a 1 de  
10 grupos, como se describió previamente en la tabla 16. Se recolectaron muestras de sangre de todos los cerdos.  
Si alguno de los animales de prueba que había cumplido con los criterios de inclusión era enrolado en el estudio y  
50 posteriormente excluido del mismo por cualquier motivo, se notificaba al Investigador y Monitor con el fin de

determinar el uso de los datos recolectados del animal en el análisis final. Se registró la fecha en que los lechones enrolados eran excluidos y la razón de dicha exclusión. No se excluyó ninguna de las cerdas que cumplían con los criterios de inclusión, seleccionadas para el estudio y transportadas al primer sitio de estudio. No se excluyeron lechones del estudio y no se retiraron animales de prueba del estudio antes de terminar el mismo. En la Tabla 17 se describen los tiempos para las actividades más importantes de este ejemplo.

**Tabla 17. Actividades del estudio**

Día del estudio	Fechas reales	Actividad del estudio
-3	4/4/03	Peso de los cerdos; examen salud; asignación aleatoria en grupos; recolección de muestras de sangre
-3, 0-21	4/4/03; 7/4/03 al 27/5/03	Observación del estado de salud general y de efectos adversos de post-vacunación
0	7/4/03	Administración de respectivos IVP a los grupos 1-8
0-7	7/4/03 al 14/4/03	Observación de los cerdos por reacciones en el sitio de inyección
14	21/4/03	Grupos 1-3, 5-8 reforzados con los respectivos IVP; muestreo de sangre de todos los cerdos
14-21	21/4/03 al 28/4/03	Observación de los cerdos por reacciones a la inyección
19-21	26/4/03 al 28/4/03	Tratamiento de todos los cerdos con antibióticos
21	28/04/03	Cerdos transportados de Struve Labs, Inc. a Veterinary Resources, Inc.(VRI)
22-50	28/4/03 al 27/5/03	Observación de los cerdos por signos clínicos después de la exposición
22	4-29-03	Tratamiento de los grupos 1-10 con KLH/ICFA
25	2/5/03	Recolección de muestras de sangre de todos los cerdos; peso de todos los cerdos; exposición de los grupos 1-9 con material de exposición de prueba PCV2
28	5/5/03	Tratamiento de los grupos 1-10 con KLH/ICFA
32	9/5/03	Recolección de muestras de sangre de todos los cerdos
46	23/5/03	Administración de INGELVAC® PRRS MLV a todos los grupos
50	27/5/03	Recolección de muestras de sangre, peso y necropsia de todos los cerdos; registro de lesiones visibles; evaluación de pulmones por lesiones; reserva de muestras de tejidos frescos y fijados en formalina; se completó la fase en-vida del estudio

Una vez completada la fase en-vida del estudio, se examinaron los tejidos fijados en formalina mediante inmunohistoquímica (IHC) para que el patólogo pudiera detectar el antígeno PCV2, se evaluaron las muestras de sangre por la serología de PCV2 y se determinó la ganancia de peso diario promedio (ADWG) entre el día 25 y el día 50.

Los animales fueron albergados en el primer sitio de estudio en jaulas individuales en siete habitaciones desde el nacimiento y hasta los 11 días de vida aproximadamente (día 0 del estudio aproximadamente). Cada habitación era idéntica en cuanto a disposición y consistía de jaulas de acero inoxidable individuales apiladas con suministro de aire caliente y filtrado por separado para cada unidad de aislamiento. Cada habitación tenía calefacción y ventilación separadas, impidiendo de esa manera la contaminación cruzada de aire entre las habitaciones. Los animales fueron albergados en dos instalaciones diferentes en el segundo sitio de estudio. El grupo 10 (el grupo control negativo estricto) fue albergado por separado en un galpón de cría convertido y los grupos 1-9 fueron albergados en un galpón paritorio convertido. Cada grupo fue albergado en un corral separado (14-15 cerdos por corral) y cada corral proporcionaba aproximadamente 2,3 pies cuadrados por cerdo. Los grupos 2, 4 y 8 se ubicaron en tres corrales adyacentes a un lado del pasillo y los grupos 1, 3, 5, 6, 7 y 9 se ubicaron en seis corrales adyacentes en el otro lado del pasillo. La separación de los grupos se debió a la preocupación del Monitor del estudio que las vacunas administradas a los grupos 2, 4 y 8 no estuvieran completamente inactivadas. Cada corral se encontraba sobre un suelo elevado con pisos de listones de plástico. Un pozo debajo de los corrales servía como tanque de retención para excrementos y desechos. Cada instalación tenía sus propios sistemas de calefacción y ventilación, con poca probabilidad de contaminación cruzada de aire entre las instalaciones.

En el primer sitio de estudio, los lechones recibieron una ración de leche especialmente formulada desde el nacimiento y hasta aproximadamente las 3 semanas de vida. Todos los lechones consumían una ración sólida, mixta especial al día 21 (4 ½ semanas de vida aproximadamente). En el segundo sitio de estudio, todos los lechones recibieron una ración de una mezcla comercial especial sin medicación apropiada para su edad y peso, *ad libitum*. También disponían de agua *ad libitum* en ambos sitios de estudio.

Todos los cerdos de prueba fueron tratados con 1,0 mL de NAXCEL®, IM, en flancos alternantes los días 19, 20 y 21. Además, el cerdo N° 11 (grupo 1) fue tratado con 0,5 mL de NAXCEL® IM el día 10, el cerdo N° 13 (grupo 10) fue tratado con 1 mL de penicilina y 1 mL de PREDEF® 2X el día 10, el cerdo N° 4 (grupo 9) fue tratado con 1,0 mL de NAXCEL® IM el día 11 y los cerdos 1 (grupo 1), 4 y 11 recibieron cada uno tratamiento con 1,0 mL de NAXCEL®

el día 14 por diversas razones de salud.

Mientras permanecían en ambos sitios de estudio, los cerdos se encontraban bajo control veterinario. Los exámenes de salud de los animales se realizaron el día -3 y se registraron en el formulario de registro del examen de salud.

5 Todos los animales se encontraban en un buen estado de salud y nutrición antes de recibir las vacunas según las observaciones efectuadas el día 0. Todos los animales de prueba se encontraban en un buen estado de salud y nutricional antes de la exposición. Las carcasas y los tejidos fueron eliminados por cremación. La disposición final de los animales de estudio fue registrada en el registro de baja de animales.

10 Los días 0 y 14, cerdos asignados a los grupos 1-3 y 5-8 recibieron 2,0 mL de las vacunas PCV2 1-4 asignadas, respectivamente, IM en la región derecha e izquierda del cuello, respectivamente, usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x ½" estéril. Los cerdos asignados al grupo 4 recibieron 1,0 mL de la vacuna PCV2 N° 2, IM en la región derecha del cuello usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x ½" estéril el día 0 solamente.

15 El día 22 todos los cerdos de prueba recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA IM en la región izquierda del cuello usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x 1" estéril. El día 28 todos los cerdos de prueba recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA en la región del flanco derecho usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x 1" estéril.

20 El día 25, los cerdos asignados a los grupos 1-9 recibieron 1,0 mL de material de exposición de prueba PCV2 ISUVDL (3,98 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL) por vía IM en la región derecha del cuello usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una aguja 20g x 1" estéril. Se administró 1,0 mL adicional del mismo material IN a cada cerdo (0,5 mL por la fosa nasal) usando una jeringa tipo Luer estéril de 3,0 mL y una cánula nasal.

25 El día 46, todos los cerdos de prueba recibieron 2,0 mL de INGELVAC® PRRS MLV, IM, en la región derecha del cuello usando una jeringa estéril Luer de 3,0 mL y una aguja 20g x 1" estéril. El PRRSV MLV se administró para aumentar la virulencia del material de exposición de prueba de PCV2.

30 Los cerdos de prueba fueron observados todos los días por su estado de salud general y los efectos adversos el día -3 y desde el día 0 hasta el día 21. Cada uno de los cerdos fue calificado por su conducta normal o anormal, respiración o tos. Las observaciones fueron registradas en el registro de observación clínica. Todos los cerdos de prueba fueron monitoreados entre el día 0 y el día 7, y el grupo 7 fue monitoreado además entre los días 14 y 21, por las reacciones en el sitio de inyección. La ganancia de peso diario promedio se determinó pesando cada cerdo sobre una balanza calibrada los días -3, 25 y 50, o el día que el cerdo aparecía muerto después de la exposición.

35 Los pesos corporales fueron registrados en el formulario de peso corporal. Los pesos corporales del día -3 se utilizaron para bloquear los cerdos antes de la asignación aleatoria. El día 25 y el día 50 se utilizaron los datos de los pesos para determinar la ganancia de peso diario promedio (ADWG) para cada cerdo para los tiempos definidos. En el caso de los cerdos que murieron después de la exposición y antes del día 50, se ajustó la ADWG para que representara la ADWG desde el día 25 hasta el día de muerte.

40 Con el fin de determinar la serología de PCV2, se recolectó sangre venosa completa del seno venoso orbital de cada lechón los días -3 y 14. Para cada lechón, se recolectó sangre del seno venoso orbital insertando un tubo capilar estéril en el canto medial de uno de los ojos y drenando aproximadamente 3,0 mL de sangre completa en un Tubo separador de suero (SST) de 4,0 mL. Los días 25, 32 y 50, se recolectó sangre venosa completa de la vena cava anterior de cada cerdo usando una aguja Vacutainer 20g x 1 ½" estéril (Becton Dickinson y Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey), un soporte de aguja Vacutainer y un SST de 13 mL. La recolección de sangre en cada tiempo se registró en el registro de recolección de muestras. Se dejó que la sangre coagulara en cada SST, a continuación se centrifugó cada SST y se cosechó el suero. El suero cosechado se transfirió a un tubo *Snap* estéril y se guardó a

45 -70 ± 10°C hasta su evaluación en una fecha posterior. Las muestras de suero fueron evaluadas por la presencia de anticuerpos contra PCV2 por el personal de BIVI-R&D.

50 Los cerdos fueron monitoreados una vez por día entre el día 22 y el día 50 por los síntomas clínicos y se calificaron según una conducta normal o anormal, respiración o tos. Las observaciones clínicas fueron registradas en el registro de observación clínica.

55 Los cerdos N° 46 (grupo 1) y 98 (grupos 9) murieron en el primer sitio de estudio. Ambas muertes fueron determinadas como muertes por hemorragia y no se efectuaron necropsias en estos dos animales. En el segundo sitio de estudio, se efectuaron necropsias de los cerdos que murieron después de la exposición y antes del día 50, y de los cerdos sacrificados el día 50. Se registraron todas las lesiones visibles y también los porcentajes de lóbulos pulmonares con lesiones en el formulario de informe de necropsia.

60 De cada uno de los cerdos a los que se les había efectuado necropsia en el segundo sitio de estudio, se tomó una muestra de tejido de amígdala, pulmón, corazón y nódulo linfático mesentérico que se colocó en un envase individual con formalina 10% amortiguada; y otra muestra de tejido de los mismos órganos mencionados se colocó en un Whirl-pak Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino Unido) y cada Whirl-pak® se colocó sobre

hielo. Cada envase se rotuló apropiadamente. Las recolecciones de muestras se registraron en el formulario de informe de necropsia. Posteriormente, se enviaron las muestras de tejidos fijados en formalina y un formulario de solicitud de diagnóstico para las pruebas de IHC. Las pruebas de IHC se realizaron de acuerdo con los procedimientos de laboratorio estándar para recibir muestras, preparar muestras y portaobjetos y usar las técnicas de coloración. Los tejidos frescos en los Whirl-paks® fueron enviados sobre hielo al Monitor del estudio para su almacenamiento (-70° ± 10 °C) y posible uso futuro.

Los tejidos fijados en formalina fueron examinados por un patólogo para detectar el PCV2 por IHC y se calificaron de acuerdo con el siguiente sistema de puntaje: 0 = ninguno; 1 = escasa coloración positiva, pocos sitios; 2 = coloración positiva moderada, múltiples sitios; y 3 = coloración positiva abundante, difusa en todo el tejido. A efectos analíticos, un puntaje de 0 se consideró “negativo”, y un puntaje mayor que 0 se consideró “positivo”.

Resultados

Los resultados para este ejemplo se muestran más adelante. Cabe destacar que los cerdos N° 46 y 98 murieron los días 14 y 25, respectivamente. Estas muertes se consideraron como muertes por hemorragia. El cerdo N° 11 (grupo 1) estaba jadeando con respiración rápida el día 15. Por lo demás, todos los cerdos eran normales en cuanto a conducta, respiración y tos durante este período de observación y no se observaron efectos adversos sistémicos en ninguno de los grupos. No se observaron reacciones en el sitio de inyección después de la vacunación el día 0. Después de la vacunación del día 14, siete (7) de catorce (14) cerdos del grupo 1 (50,0%) mostraron hinchazón con un puntaje de “2” el día 15. Cuatro (4) de catorce (14) cerdos del grupo 1 (28,6%) aún mostraban una hinchazón de “2” el día 16. Ninguno de los demás grupos experimentó reacciones en el sitio de inyección después de las vacunaciones.

Los resultados de la ganancia de peso diario promedio (ADWG) se muestran a continuación en la tabla 18. Los cerdos N° 46 y 98 que murieron por hemorragia fueron excluidos de los resultados del grupo. El grupo 4, que recibió una dosis de 16 ug de vORF2-Carbopol, tenía la mayor ADWG (1,16 ± 0,26 lbs/día), seguido de los grupos 1, 2, 3, 5, 6 y 10 cuyas ADWG variaban en un rango entre 1,07 ± 0,23 lbs/día y 1,11 ± 0,26 lbs/día. El grupo 9 tenía la menor ADWG (0,88 ± 0,29 lbs/día), seguido de los grupos 8 y 7, cuyas ADWG eran de 0,93 ± 0,33 lbs/día y 0,99 ± 0,44 lbs/día, respectivamente.

**Tabla 18. Resumen de las ganancias de peso diario promedio (ADWG) de los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	ADWG-lbs/día (día 25 al día 50) o ajustado para los cerdos que murieron antes del día 50
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2 dosis	14	1,08 ± 0,30 lbs/día
2	vORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	1,11 ± 0,16 lbs/día
3	rORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	1,07 ± 0,21 lbs/día
4	vORF2-16 µg-Carbopol 1 dosis	15	1,16 ± 0,26 lbs/día
5	rORF2-4 µg-Carbopol 1 dosis	15	1,07 ± 0,26 lbs/día
6	rORF2-1 µg-Carbopol 2 dosis	15	1,11 ± 0,26 lbs/día
7	rORF2-0,25 µg-Carbopol 2 dosis	15	0,99 ± 0,44 lbs/día
8	KV > 8,0 log-Carbopol 2 dosis	15	0,93 ± 0,33 lbs/día
9	Control de prueba	14	0,88 ± 0,29 lbs/día
10	Control negativo estricto	15	1,07 ± 0,23 lbs/día

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus de PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

Los resultados de la serología de PVC2 se muestran en la siguiente tabla 19. Los diez (10) grupos eran seronegativos para PCV2 el día -3. El día 14, los títulos de PCV2 permanecieron bajos en los diez (10) grupos (rango de 50-113). El día 25, el grupo 8, que recibió la vacuna de células enteras muertas, tenía el título más alto de PCV2 (4617), seguido del grupo 2, que recibió 16 ug de vORF2-Carbopol, el grupo 4, que recibió como dosis única 16 ug de vORF2-Carbopol, y el grupo 3, que recibió 16 ug de rORF2-Carbopol, cuyos títulos eran de 2507, 1920 y 1503, respectivamente. El día 32 (una semana después de la exposición), los títulos para los grupos 1-6 y el grupo 8 variaban en un rango entre 2360 y 7619; en tanto los grupos 7 (0,25 ug de rORF2-Carbopol), 9 (control de prueba) y 10 (control negativo estricto) tenían títulos de 382, 129 y 78, respectivamente. El día 50 (día de la necropsia), los diez (10) grupos mostraron títulos altos de PCV2 (= 1257).

Los días 25, 32 y 50, el grupo 3, que recibió dos dosis de 16 ug de rORF2-Carbopol tenía títulos de anticuerpo más altos que el grupo 1, que recibió dos dosis de 16 ug de rORF2-IMS 1314. Los días 25, 32 y 50, el grupo 2, que recibió dos dosis de 16 ug de vORF2 tenía títulos más altos que el grupo 4, que solamente recibió una dosis de la misma vacuna. Los grupos 3, 5, 6, 7, que recibieron niveles decrecientes de rORF2-Carbopol, de 16, 4, 1 y 0,25 ug, respectivamente, demostraron títulos de anticuerpo correspondientemente decrecientes los días 25 y 32.

**Tabla 19. Resumen de los títulos de IFA PCV2 en los grupos**

Grupo	Tratamiento	Día -3	Día 14**	Día 25***	Día 32	Día 50****
1	rORF2-16 µg -IMS 1314 2 dosis	50	64	646	3326	4314
2	vORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	50	110	2507	5627	400
3	rORF2-16 µg - Carbopol 2 dosis	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2-16 µg - Carbopol 1 dosis	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2-4 µg-Carbopol 1 dosis	50	61	1867	3933	4533
6	rORF2-1 µg-Carbopol 2 dosis	50	70	490	2360	5740
7	rORF2-0,25 µg-Carbopol 2 dosis	50	73	63	382	5819
8	KV > 8,0 log-Carbopol 2 dosis	50	97	4617	7619	10817
9	Control de prueba	50	53	50	129	4288
10	Control negativo estricto	50	50	50	78	11205

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus de PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

5 \*A efectos de los cálculos, un título de IFA =100 se denominó título de "50"; un título de IFA =6400 se denominó título de "12.800".

\*\*Día de la exposición

\*\*\*Día de la necropsia

10 Los resultados de las observaciones clínicas de post-exposición se muestran a continuación. La tabla 20 incluye las observaciones de conducta anormal, respiración anormal, tos y diarrea. La tabla 21 incluye los resultados del resumen de la incidencia general de síntomas clínicos de los grupos y la Tabla 22 incluye los resultados del resumen de los índices de mortalidad de los grupos después de la exposición. La incidencia de conducta anormal, respiración y tos después de la exposición fue baja en los cerdos que recibieron 16 ug de rORF2-IMS 1314 (grupo 1), 16 ug de rORF2-Carbopol (grupo 3), 1 ug de rORF2-Carbopol (grupo 6), 0,25 ug de rORF2-Carbopol (grupo 7) y en los cerdos del grupo control de prueba (grupo 9). La incidencia de conducta anormal, respiración y tos después de la exposición era de cero en los cerdos que recibieron 16 ug de vORF2-Carbopol (grupo 2), una sola dosis de 16 ug de vORF2-Carbopol (grupo 4), 4 ug de rORF2-Carbopol (grupo 5), >8 log KV-Carbopol (grupo 8) y en los cerdos del grupo control negativo estricto (grupo 10).

20 La incidencia general de los síntomas clínicos varió según los grupos. Los cerdos que recibieron 16 ug de vORF2-Carbopol (grupo 2), una sola dosis de 16 ug de vORF2-Carbopol (grupo 4) y los cerdos del grupo control negativo estricto (grupo 10) tenían índices de incidencia del 0%; los cerdos que recibieron 16 ug de rORF2-Carbopol (grupo 3) y 1 ug de rORF2-Carbopol (grupo 6) tenían índices de incidencia del 6,7%; los cerdos que recibieron 16 ug de rORF2-IMS 1314 (grupo 1) tenían un índice de incidencia general del 7,1%; los cerdos que recibieron 4 ug de rORF2-Carbopol (grupo 5), 0,25 ug de rORF2-Carbopol (grupo 7) y >8 log vacuna KV tenían índices de incidencia del 13,3%; y los cerdos del grupo control de prueba (grupo 9) tenían un índice de incidencia del 14,3%.

30 También variaron los índices generales de mortalidad entre grupos. El grupo 8, que recibió 2 dosis de vacuna KV tenía el mayor índice de mortalidad del 20,0%; seguido del grupo 9, el grupo control de prueba, y el grupo 7, que recibió 0,25 ug de rORF2-Carbopol y tenían índices de mortalidad del 14,3% y 13,3%, respectivamente. El grupo 4, que recibió una dosis de 16 ug de vORF2-Carbopol tenía un índice de mortalidad del 6,7%. Todos los demás grupos, 1, 2, 3, 5, 6 y 10 tenían un índice de mortalidad del 0%.

35 **Tabla 20. Resumen de las observaciones de conducta anormal, respiración anormal y tos después de la exposición de los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Conducta anormal <sup>1</sup>	Conducta anormal <sup>2</sup>	Tos <sup>3</sup>
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2 dosis	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7,1%)
2	vORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
4	vORF2-16 µg-Carbopol 1	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

	dosis				
5	rORF2-4 µg-Carbopol 1 dosis	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
6	rORF2-1 µg-Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
7	rORF2-0,25 µg-Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)
8	KV > 8,0 log-Carbopol 2 dosis	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
9	Control de prueba	14	1/14 (7,1%)	1/14 (7,1%)	2/14 (14,3%)
10	Control negativo estricto	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

- 1 Número total de cerdos en cada grupo que demostró alguna conducta anormal durante al menos un día  
 2 Número total de cerdos en cada grupo que demostró respiración anormal durante al menos un día  
 3 Número total de cerdos en cada grupo que demostró tos durante al menos un día

5 **Tabla 21. Resumen de la incidencia general de síntomas clínicos después de la exposición de los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con síntomas clínicos <sup>1</sup>	Índice de incidencia
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2 dosis	14	1	7,1%
2	vORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	0	0,0%
3	rORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	1	6,7%
4	vORF2-16 µg-Carbopol 1 dosis	15	0	0,0%
5	rORF2-4 µg-Carbopol 1 dosis	15	2	13,3%
6	rORF2-1 µg-Carbopol 2 dosis	15	1	6,7%
7	rORF2-0,25 µg-Carbopol 2 dosis	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log-Carbopol 2 dosis	15	2	13,3%
9	Control de prueba	14	2	14,3%
10	Control negativo estricto	15	0	0,0%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus de PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

- 1 Número total de cerdos en cada grupo que demostró algún síntoma clínico durante al menos un día

10

**Tabla 22. Resumen de los índices de mortalidad después de la exposición de los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Muertos después de la exposición	Índice de mortalidad
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2 dosis	14	0	0,0%
2	vORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	0	0,0%
3	rORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	0	0,0%
4	vORF2-16 µg-Carbopol 1 dosis	15	1	6,7%
5	rORF2-4 µg-Carbopol 1 dosis	15	0	0,0%
6	rORF2-1 µg-Carbopol 2 dosis	15	0	0,0%
7	rORF2-0,25 µg-Carbopol 2 dosis	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log-Carbopol 2 dosis	15	3	20,0%
9	Control de prueba	14	2	14,3%
10	Control negativo estricto	15	0	0,0%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus de PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

El resumen de porcentaje medio de lesiones pulmonares y diagnóstico tentativo de los grupos se ofrece a continuación en la tabla 23. El grupo 9, el grupo control de prueba, tenía el porcentaje más alto de lesiones pulmonares con una media de  $10,81 \pm 23,27\%$ , seguido del grupo 7, que recibió 0,25 ug de rORF2–Carbopol y tenía una media de  $6,57 \pm 24,74\%$ , luego el grupo 5, que recibió 4 ug de rORF2–Carbopol y tenía una media de  $2,88 \pm 8,88\%$ , y el grupo 8, que recibió la vacuna KV y tenía una media de  $2,01 \pm 4,98\%$ . Los restantes seis (6) grupos tenían un porcentaje medio más bajo de lesiones pulmonares que variaba en un rango entre  $0,11 \pm 0,38\%$  y  $0,90 \pm 0,15\%$ .

El diagnóstico tentativo de neumonía varió entre los grupos. El grupo 3, que recibió dos dosis de 16 ug de rORF2–Carbopol, presentó el diagnóstico tentativo de pneumonia más bajo, con un 13,3%. El grupo 9, el grupo control de prueba, presentaba un 50% del grupo diagnosticado tentativamente con neumonía, seguido del grupo 10, el grupo control negativo estricto y el grupo 2, que recibió dos dosis de 16 ug de vORF2–Carbopol, con un 46,7% y 40%, respectivamente, de diagnóstico tentativo de neumonía.

Los grupos 1, 2, 3, 5, 9 y 10 presentaban un 0% de diagnóstico tentativo como infectados con PCV2; en tanto el grupo 8, que recibió dos dosis de vacuna KV, presentaba el índice de diagnóstico tentativo más alto de infección por PCV2 de los grupos, que era de un 20%. El grupo 7, que recibió dos dosis de 0,25 ug de rORF2–Carbopol, y el grupo 4, que recibió una dosis de 16 ug de vORF2–Carbopol presentaban diagnósticos tentativos de infección por PCV2 del 13,3% y 6,7% para cada grupo, respectivamente.

Solamente se diagnosticó úlceras gástricas en un cerdo del grupo 7 (6,7%); en tanto los demás 9 grupos permanecieron libres de úlceras gástricas.

**Tabla 23. Resumen del % promedio de lesiones pulmonares y diagnóstico tentativo en los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos con exudado al menos un día	Índice de incidencia
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2 dosis	15	0	0%
2	vORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	1	6,7%
3	rORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	3	20,0%
4	vORF2-16 µg-Carbopol 1 dosis	15	2	13,3%
5	rORF2-4 µg-Carbopol 1 dosis	15	3	20,0%
6	rORF2-1 µg-Carbopol 2 dosis	15	6	40,0%
7	rORF2-0,25 µg-Carbopol 2 dosis	15	7	46,7%
8	KV > 8,0 log-Carbopol 2 dosis	15	12	80%
9	Control de prueba	14	14	100,0%
10	Control negativo estricto	15	14	93,3%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus de PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

El resumen de resultados de incidencia positiva de IHC en los grupos se muestran a continuación en la tabla 24. El grupo 1 (16 ug de rORF2-IMS 1314) tenía el índice de resultados IHC positivos del grupo más bajo con un 0% de cerdos positivos para PCV2, seguido del grupo 2 (16 ug de vORF2-Carbopol) y del grupo 4 (una sola dosis de 16 ug de vORF2-Carbopol), con índices de IHC para los grupos del 6,7% y 13,3%, respectivamente. El grupo 9, el grupo control de prueba, tenía el índice de incidencia positiva por IHC más alto, con el 100% de los cerdos positivos para PCV2, seguido del grupo 10, el grupo control negativo estricto, y del grupo 8 (vacuna KV), con un 93,3% y 80% de los cerdos positivos para PCV2, respectivamente.

**Tabla 24. Resumen del índice de incidencia de positivos por IHC en los grupos**

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos con exudado durante al menos un día	Índice de incidencia
1	rORF2-16 µg-IMS 1314 2 dosis	15	0	0%
2	vORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	1	6,7%
3	rORF2-16 µg-Carbopol 2 dosis	15	3	20,0%
4	vORF2-16 µg-Carbopol 1 dosis	15	2	13,3%
5	rORF2-4 µg-Carbopol 1 dosis	15	3	20,0%
6	rORF2-1 µg-Carbopol 2 dosis	15	6	40,0%
7	rORF2-0,25 µg-Carbopol 2 dosis	15	7	46,7%

8	KV > 8,0 log-Carbopol 2 dosis	15	12	80%
9	Control de prueba	14	14	100,0%
10	Control negativo estricto	15	14	93,3%

vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 de baculovirus recombinante expresado; KV o virus completos muertos = virus de PCV2 cultivado en el cultivo celular adecuado

## Discusión

5

Se evaluaron siete vacunas de PCV2 en este ejemplo, que incluían una dosis alta (16 µg) de antígeno rORF2 con adyuvante de IMS 1314 administrada en dos veces, una dosis alta (16 µg) de antígeno vORF2 con adyuvante de Carbopol administrada una vez a un grupo de cerdos y dos veces a un segundo grupo de cerdos, una dosis alta (16 µg) de antígeno rORF2 con adyuvante de Carbopol administrada dos veces, una dosis de 4 µg de antígeno rORF2 con adyuvante de Carbopol administrada dos veces, una dosis de 1 µg de antígeno rORF2 con adyuvante de Carbopol administrada dos veces, una dosis baja (0,25 µg) de antígeno rORF2 con adyuvante de Carbopol administrada dos veces y una dosis alta (> 8 log) de vacuna de células enteras muertas de PCV2 con adyuvante de Carbopol. En general, el grupo 1, que recibió dos dosis de 16 µg de rORF2-IMS 1314, tuvo un desempeño ligeramente mejor que los grupos 2 a 7, que recibieron vacunas que contienen diversos niveles de ya sea antígeno vORF2 o rORF2 con adyuvante de Carbopol y mucho mejor que el grupo 8, que recibió dos dosis de vacuna de células enteras muertas de PCV2. El grupo 1 tenía la tercera ADWG más alta ( $1,80 \pm 0,30$  lbs/día), la menor incidencia de conducta anormal (0%), la menor incidencia de respiración anormal (0%), una baja incidencia de tos (7,1%), una baja incidencia de síntomas clínicos generales (7,1%), compartía con otros tres grupos el menor índice de mortalidad (0%), el segundo menor índice de % promedio de lesiones pulmonares ( $0,15 \pm 0,34\%$ ), el segundo menor índice de neumonía (21,4%) y el menor índice de incidencia para tejidos IHC positivos (0%). Sin embargo, el grupo 1 era el único grupo en el cual se observaron reacciones en el sitio de inyección, que incluía el 50% de los vacunados 1 día después de la segunda vacunación. Las otras vacunas administradas a los grupos 2 a 7 tuvieron un mejor desempeño que la vacuna muerta y casi tan buena como la vacuna administrada al grupo 1.

El grupo 8, que recibió dos dosis de vacuna muerta de PCV2 con adyuvante de Carbopol, presentaba el peor conjunto de resultados de todos los grupos de vacunas. El grupo 8 tenía la menor ADWG ( $0,93 \pm 0,33$  lbs/día), el segundo mayor índice de conducta anormal (6,7%), el mayor índice de respiración anormal (6,7%), junto con otros tres grupos el mayor índice de incidencia general de síntomas clínicos (13,3%), tenía el mayor índice de mortalidad de todos los grupos (20%) y el mayor índice IHC positivo (80%) de todos los grupos de vacunas. Surgió la duda de si la vacuna de células enteras muertas PCV2 no estuviera completamente inactivada antes de su administración al grupo 8, lo que podría explicar los pobres resultados de este grupo. Desafortunadamente, no había datos definitivos para confirmar esta preocupación. En general, en el contexto de este ejemplo, la vacuna muerta convencional de PCV2 no ayudaba en la reducción de la enfermedad asociada a PCV2.

Como se mencionó previamente, no había efectos adversos asociados con las vacunas de prueba con excepción de la vacuna con adyuvante de IMS 1314. Se observaron reacciones en el sitio de inyección en el 50,0% de los cerdos 1 día después de la segunda vacunación con la vacuna formulada con IMS 1314 y en el 28,6% de los cerdos 2 días después de la segunda vacunación. No se observaron reacciones en ninguno de los cerdos que recibió vacunas con adyuvante de Carbopol. Cualquier estudio futuro que incluyera cerdos vacunados con vacunas con adyuvante IMS 1314 debería continuar monitoreando estrechamente a los cerdos por las reacciones en el sitio de inyección.

Todos los cerdos eran seronegativos para PCV2 el día -3 y solamente el grupo 2 tenía un título superior a 100 el día 14. El día 25 (día de la exposición), el grupo 8 tenía el título de anticuerpo PCV2 más alto (4619), seguido del grupo 2 (2507). Con la excepción de los grupos 7, 9 y 10, todos los grupos demostraron una fuerte respuesta de anticuerpo para el día 32. Al día 50, todos los grupos, incluyendo los grupos 7, 9 y 10, demostraron una fuerte respuesta de anticuerpo.

Uno de los elementos distintivos de una infección por PCV2 en etapa tardía y el subsiguiente desarrollo de PMWS es un atraso en el crecimiento en cerdos destetados y, en casos severos, se observa pérdida de peso. La ganancia de peso diario promedio de los grupos es un método cuantitativo que permite demostrar un atraso en el crecimiento o pérdida de peso. En este ejemplo, no se observaron grandes diferencias en la ADWG entre grupos. El grupo 8 tenía la menor ADWG de  $0,88 \pm 0,29$  lbs/día, en tanto el grupo 4 tenía la mayor ADWG de  $1,16 \pm 0,26$  lb/día. En el contexto de este estudio, no existe suficiente diferencia entre grupos como para basar la eficacia de futuras vacunas en la ADWG.

Además de la pérdida de peso, la disnea, letargia, palidez de la piel y a veces ictericia son síntomas clínicos asociados con PMWS. En este ejemplo, se observó ocasionalmente conducta anormal y respiración anormal y tos en cada grupo. Tal como se demuestra en este estudio, este modelo de exposición y la cepa de exposición no dan como resultado síntomas clínicos abrumadores y este no constituye un parámetro fuerte sobre el cual se pueda basar la eficacia de una vacuna.

En general, los índices de mortalidad no eran altos en este ejemplo y la falta de un alto índice de mortalidad en el grupo control de prueba limita este parámetro para fundamentar la eficacia de la vacuna. Antes del día 46, en los

grupos 4 y 7 murió uno de cada quince cerdos, en el grupo 9 murieron dos de cada catorce cerdos y en el grupo 8 murieron tres de quince cerdos. Debido al hecho que el grupo 9, el grupo control de prueba, no mostraba síntomas clínicos de PCV2 y solamente habían tenido lugar dos decesos en este grupo para el día 46, se administró la vacuna MLV del virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV) a todos los cerdos el día 46. Estudios anteriores han utilizado INGELVAC® PRRS MLV como inmunoestimulante para exasperar la enfermedad PMWS asociada a PCV2 y los índices de mortalidad eran más altos en estos estudios anteriores. Se produjeron dos muertes poco después de administrar la vacuna PRRS el día 46: el grupo 4 con una muerte el día 46 y el grupo 7 con una muerte el día 47, lo cual probablemente no estaba asociado a la administración de la vacuna PRRS. Para el día 50, el grupo 8, que recibió dos dosis de vacuna muerta, tenía el mayor índice de mortalidad (20%), seguido del grupo 9 (control de prueba) y del grupo 7 (0,25 ug de rORF2-Carbopol), con índices de mortalidad del 14,3% y 13,3%, respectivamente. En general, la administración de la vacuna PRRS al modelo de exposición en un momento avanzado después de fase de observación de exposición de este ejemplo no incrementó significativamente los índices de mortalidad.

Las lesiones visibles en cerdos con PMWS secundaria a una infección por PCV2 consisten típicamente de una linfadenopatía generalizada en combinación con uno o más de los siguientes: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis. En el momento de la necropsia (día 50), no se observó ictericia, hepatitis ni nefritis en ninguno de los grupos. Se observó una úlcera gástrica en un cerdo del grupo 7, pero no se examinó específicamente linfadenopatía. Sobre la base de la presencia de lesiones que fueran coherentes con una infección por PCV2, tres grupos presentaban al menos un cerdo con diagnóstico tentativo de PCV2 (PMWS). El grupo 8, que recibió dos dosis de vacuna muerta, presentaba un 20% de diagnóstico tentativo de PCV2, en tanto el grupo 7 y el grupo 4 presentaban un 13,3% y 6,7%, respectivamente, de diagnóstico tentativo de PCV2. El % promedio de puntajes de lesiones pulmonares varió según los grupos en el momento de la necropsia. Los grupos 1, 2, 3, 4, 6 y 10 tenían un bajo % de puntajes de lesiones de pulmón que variaba en un rango entre  $0,11 \pm 0,38\%$  y  $0,90 \pm 0,15\%$ . Como era de esperar, el grupo 9, el grupo control de prueba, presentaba el mayor % promedio de puntaje de lesión pulmonar ( $10,81 \pm 23,27\%$ ). En cuatro grupos, el % promedio de puntajes de lesiones pulmonares era elevado debido a que uno a tres cerdos en cada uno de estos grupos presentaba puntajes muy altos de lesiones de pulmón. Las lesiones pulmonares eran rojas/púrpuras y consolidadas. Típicamente, las lesiones pulmonares asociadas con PMWS se describen como de un color tostado, no colapsables con edema interlobular. Las lesiones pulmonares observadas en este estudio no estaban asociadas con una infección por PCV2 o podrían deberse a la presencia de un segundo agente infeccioso pulmonar. En el contexto de este estudio, el % de puntajes de lesiones de pulmón probablemente no reflejen la medida real de la cantidad de infección de pulmón debido a PCV2. Asimismo, el diagnóstico tentativo de neumonía también pudo haber sido utilizado por demás. Todo cerdo con una lesión pulmonar, alguna tan pequeña como un 0,10%, fue catalogado con un diagnóstico tentativo de neumonía. En este ejemplo, no había suficiente diferencia entre grupos con respecto a lesiones visibles y % de lesiones pulmonares sobre la cual basar la eficacia de la vacuna.

Los resultados de IHC mostraron las mayores diferencias entre grupos. El grupo 1 (16 µg de rORF2-IMS 1314) presentaba los resultados positivos por IHC más bajos para el antígeno PCV2 (0%); en tanto los grupos 9 y 10 presentaban los resultados positivos por IHC más altos con índices de incidencia del 100% y 93,3%, respectivamente. Los grupos 3, 5, 6 y 7, que recibieron 16, 4, 1 ó 0,25 µg de antígeno rORF2, respectivamente, con adyuvante de Carbopol, presentaron índices de IHC positiva del 20%, 20%, 40% y 46,7%, respectivamente. El grupo 2, que recibió dos dosis de 16 µg de vORF2 con adyuvante de Carbopol tenían un índice de IHC positiva del 6,7%, en tanto el grupo 4 que solamente recibió una dosis de la misma vacuna, tenían un índice de IHC positiva del 13,3%. Debido a la naturaleza objetiva de esta prueba y al hecho que los resultados de IHC se correlacionan con los resultados esperados, las pruebas por IHC probablemente constituyan uno de los mejores parámetros sobre los cuales basar la eficacia de la vacuna.

Se determina la dosificación protectora mínima (MPD) del antígeno rORF2 de PCV2 con adyuvante de Carbopol en el modelo de cerdo CDCD frente a una exposición a PCV2. Los grupos 3, 5, 6 y 7 recibieron cada uno dos dosis de antígeno rORF2 con adyuvante de Carbopol, pero el nivel de antígeno rORF2 variaba para cada grupo. Los grupos 3, 5, 6 y 7 recibieron cada uno 16, 4, 1 ó 0,25 µg de antígeno rORF2, respectivamente. En general, la disminución del nivel de antígeno rORF2 disminuyó también los títulos de anticuerpo PCV2, y aumentó el índice de mortalidad, el % promedio de lesiones pulmonares y la incidencia de tejidos positivos por IHC. De los cuatro grupos que recibieron niveles variables de rORF2-Carbopol, los grupos 3 y 5, que recibieron dos dosis de 16 ó 4 µg de antígeno rORF2, respectivamente, tenían cada uno un índice de IHC positiva de tan solo un 20%, y cada uno presentaba títulos de anticuerpo similares. En general, basado en los resultados de IHC positiva, la dosificación protectora mínima de antígeno rORF2 administrada dos veces es de 4 µg aproximadamente.

Se evaluó la antigenicidad de los antígenos recombinantes (rORF2) y VIDO R-1 (vORF2) de PCV2. El grupo 2 recibió dos dosis de 16 µg de vORF2 y el grupo 3 recibió dos dosis de 16 µg de rORF2. Ambas vacunas eran con adyuvante de Carbopol. Se encontró asimismo que ambas vacunas eran seguras y presentaban un índice de mortalidad del 0%. El grupo 2 tenía un título de anticuerpo PCV2 de 2507 el día 25, en tanto el grupo 3 tenía un título de anticuerpo PCV2 de 1503. El grupo 3 presentaba un menor % promedio de puntaje de lesión pulmonar que el grupo 2 ( $0,11 \pm 0,38\%$  vs.  $0,90 \pm 0,15\%$ ), pero el grupo 2 presentaba un menor índice de incidencia de IHC positiva que el grupo 3 (6,7% vs. 20%). En general, ambas vacunas eran de una antigenicidad similar, pero vORF2 estaba

asociado con resultados ligeramente mejores de IHC.

Se determinó la conveniencia de dos adyuvantes diferentes (Carbopol e IMS 1314). Los grupos 1 y 3 recibieron, ambos, dos dosis de vacuna que contiene 16 ug de antígeno rORF2, pero el grupo 1 recibió el antígeno con adyuvante de IMS 1314 en tanto el grupo 3 recibió el antígeno en adyuvante de Carbopol. Ambos grupos presentaban esencialmente la misma ADWG, esencialmente la misma incidencia de signos clínicos después de la exposición, el mismo índice de mortalidad y esencialmente el mismo % promedio de lesiones pulmonares; pero el grupo 1 presentaba un índice de IHC positiva del 0% en tanto el grupo 3 presentaba un índice de IHC positiva del 20%. Sin embargo, el grupo 3, que recibió la vacuna con adyuvante de Carbopol, tenía títulos de IFAT PCV2 más altos los días 25, 32 y 50 que el grupo 1, que recibió la vacuna con adyuvante de IMS 1314. En general, aunque la vacuna PCV2 con adyuvante de IMS 1314 proporcionaba mejores resultados de IHC, no ofrecía una protección abrumadoramente mejor contra una infección por PCV2 e inducía reacciones en el sitio de inyección. Por otro lado, la vacuna PCV2 con adyuvante de Carbopol se comportó casi igual que la vacuna con adyuvante de IMS 1314, pero no está asociada con ningún efecto adverso.

Se determinó la viabilidad de ORF2 PCV2 como un producto de 1 ml, 1 dosis. Los grupos 2 y 4 recibieron ambos 16 µg de vacuna vORF2 con adyuvante de Carbopol el día 0, pero el grupo 2 recibió una segunda dosis el día 14. El grupo 4 tenía una ADWG ligeramente mayor y un menor % promedio de lesiones pulmonares que el grupo 2, pero el grupo 2 presentaba títulos más altos de IFAT PCV2 los días 25, 32 y 50, y un índice de incidencia de tejidos positivos por IHC ligeramente menor. Todos los demás resultados para estos dos grupos fueron similares. En general, una dosis de vORF2 con adyuvante de Carbopol se comportaba de manera similar a dos dosis de la misma vacuna.

La divulgación comprende, además:

Un método (I.) de recuperación de una proteína recombinante expresada por el marco de lectura abierto 2 del PCV2 que comprende las etapas de:

- A) clonar dicho marco de lectura abierto 2 recombinante del PCV2 en un vector de transferencia;
- B) transfectar la porción de dicho vector de transferencia que contiene dicho marco de lectura abierto 2 recombinante en un virus;
- C) infectar células en un medio con dicho virus;
- D) lograr que dicho virus exprese la proteína de dicho marco de lectura abierto 2;
- E) separar las células de dicho vector en el sobrenadante; y
- F) recuperar dicha proteína expresada del marco de lectura abierto 2 en dicho sobrenadante;

y en el que dicho método incluye además, en particular, la etapa de amplificar dicho marco de lectura abierto 2 a partir de una cepa de PCV2 antes de clonar dicho marco de lectura abierto en dicho vector de transferencia.

En el método (I.) antes mencionado, dicho marco de lectura abierto 2 recombinante además comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por una secuencia de Kozak 5', que particularmente comprende SEQ ID NO: 1, un sitio EcoR1 3', que particularmente comprende SEQ ID NO: 2, y combinaciones de los mismos.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (I.) dicho marco de lectura abierto de PCV2 comprende, en particular, la SEQ ID N°: 4, y/o dicho medio comprende, en particular un medio para células de insecto sin suero, o en cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.) dicha proteína recombinante comprende, en particular la SEQ ID N°: 6.

Cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (I.), en particular comprende, además las etapas de:

- i) antes de la etapa A, clonar dicho marco de lectura abierto 2 amplificado en un primer vector;
- ii) recortar dicho marco de lectura abierto 2 de dicho primer vector; y
- iii) utilizar dicho marco de lectura abierto 2 recortado en la etapa A.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (I.) dichas células comprenden, en particular, células SF+.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (I.) dicho virus comprende, en particular, un baculovirus.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (I.) dicha porción transfectada comprende, en particular, la SEQ ID N°: 4.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (I.) dicha proteína del marco de lectura abierto 2 se recupera, en particular, en dicho sobrenadante al menos 5 días después de infectar las células con dicho virus.

La divulgación comprende también:

Un método (II.) de preparar una composición para generar una respuesta inmune contra PCV2, comprendiendo

dicho método las etapas de:

- i) transfectar una construcción en un virus, donde dicha construcción comprende ADN recombinante del marco de lectura abierto 2 del PCV2;
- ii) infectar células con dicho virus transfectado, donde dichas células se encuentran en un medio de crecimiento;
- iii) lograr que dicho virus exprese la proteína recombinante a partir de dicho marco de lectura abierto 2;
- iv) recuperar dicha proteína expresada del marco de lectura abierto 2 en el sobrenadante; y
- v) combinar dicha proteína recuperada con un adyuvante adecuado u otro vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico.

en el que dicho método (II.) además incluye, en particular, la etapa de obtener dicha construcción a partir de un vector de transferencia, y/o en donde dicho método (II.) además incluye, en particular la etapa de amplificar dicho marco de lectura abierto 2 a partir de una cepa de PCV2 antes de clonar dicho marco de lectura abierto 2 en dicho vector de transferencia.

En el método (II.) antes mencionado dicho marco de lectura abierto 2 recombinante además comprende, en particular, una secuencia seleccionada del grupo formado por una secuencia de Kozak 5', que particularmente comprende SEQ ID NO: 1, un sitio EcoR1 3', que particularmente comprende SEQ ID NO: 2, y combinaciones de los mismos.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (II.) dicho marco de lectura abierto de PCV2 comprende, en particular, la SEQ ID N°: 4, y/o dicha proteína recombinante comprende, en particular la SEQ ID N°: 6 y/o dicho medio comprende, en particular, medio de células de insecto sin suero.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (II.) se incluye una etapa adicional de amplificar dicho marco de lectura abierto 2 a partir de una cepa de PCV2 antes de clonar dicho marco de lectura abierto en dicho vector de transferencia, entonces el método (II.) además comprende, en particular, las etapas de:

- i) clonar dicho marco de lectura abierto 2 amplificado en un primer vector;
- ii) recortar dicho marco de lectura abierto 2 de dicho primer vector; y
- iii) utilizar dicho marco de lectura abierto 2 recortado para su clonación en dicho vector de transferencia.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (II.) dichas células comprenden, en particular, células SF+, y/o dicho virus comprende, en particular, un baculovirus, y/o dicha porción transfectada comprende, en particular, la SEQ ID N°: 4, y/o dicha proteína del marco de lectura abierto 2 se recupera, en particular, al menos 5 días después de infectar dichas células con dicho virus.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (II.) dicha etapa de recuperación comprende, en particular, la etapa de separar dicho medio de dichas células y desechos celulares, en donde dicha etapa de separación incluye, en particular, la etapa de filtrar dichas células, desechos celulares y medio de crecimiento a través de un filtro con poros que tienen un tamaño que oscila entre aproximadamente 0,45 µM y aproximadamente 1,0 µM.

En cualquiera de los aspectos antes mencionados del método (II.) dicho método además incluye, en particular, la etapa de inactivar dicho virus antes de combinar dicha proteína recuperada con un adyuvante adecuado.

La divulgación comprende también:

Un método (III.) para recuperar la proteína expresada por el marco de lectura abierto 2 del PCV2, en el que dicho método incluye las etapas

- i) infectar células en un medio de crecimiento con un vector viral recombinante que contiene dicho marco de lectura abierto 2;
- ii) lograr que dicho vector exprese dicha proteína; y
- iii) recuperar dicha proteína expresada en el sobrenadante,

en el que dicha recuperación tiene lugar al menos 5 días después de la infección de las células con dicho vector viral.

La divulgación también comprende una composición de materia obtenida mediante cualquiera de las realizaciones antes mencionadas de método (I.), método (II.) o método (III.), en donde dicha composición se utiliza, en particular, como un medicamento o para la preparación de un medicamento para prevenir una infección por PCV2.

La divulgación también comprende un método de producción de un kit de diagnóstico para la detección de una infección por PCV2 en una muestra, que comprende

- i) producir una proteína recombinante según se menciona en cualquiera de las realizaciones antes mencionadas de método (I.) o método (II.);
- ii) y envasar dicha proteína recombinante en un envase adecuado,

en el que dicho método además comprende, en particular, la etapa de incluir un manual de instrucciones con el envase que envuelve a la proteína recombinante.

LISTADO DE SECUENCIAS

5

**Eichmeyer, Mark**

**Nitzel, Greg**

**Schaeffer, Merrill**

**Hayes, Phillip**

10 <120> COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS PARA PCV2 Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LAS  
MISMAS

<130> 34816-CIP1

<140> DESCONOCIDA

<141> 2005-01-10

15 <150> Desconocida

<151> 2004-12-30

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.3

20

<210> 1

<211> 8

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Esta es una secuencia de Kozak modificada.

<400> 1

ccgccatg 8

30

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Esta es una secuencia Eco R1 recombinante.

<400> 2

gaattc 6

10 <210> 3

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

15 <400> 3

cagctatgac gtatccaagg aggcggttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60

ttggccagat cctccgcccgc cgccccctggc togtccaccc ccgccaccgc taccggttga 120

gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgcac cttcggatat actgtggaga 180

aggaaaaatg gcatcttcaa cacccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240

20 ttgttcccc gggagggggg accaacaanaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300

gaaaggttaa ggttgaattc tggccttgcct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360

gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420

accatattgt aaactactcc tcccgccata caatccccc acccttctcc taccactccc 480

gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccaactattga ttacttccaa ccaaataaca 540

25 aaaggaatca gctttggctg aggcataaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600

gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660

tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaaatg aat 713

<210> 4

<211> 713

<212> ADN

5 <213> *Circovirus porcino*

<400> 4

ccgccatgac gtatccaagg aggcggttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60

ttggccagat cctccgcccgc cgcccctggc togtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120

gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccocgc tctcccgcac cttcggatat actgtcaagg 180

10 ctaccacagt cacaacgccc tctcggggggc tggacatgat gagatttaat attgacgact 240

ttgttcccc gggagggggg accaacaanaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300

gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccccacac ccagggtgat aggggagtg 360

gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420

accatattgt aaactactcc tcccgcata caatccccca acccttctcc taccactccc 480

15 gttacttcac acccaaact gttcttgact ccaactattga ttacttcaa ccaaataaca 540

aaaggaatca gctttggctg aggotacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600

gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660

tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccaattga accctaagaa ttc 713

20 <210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> *Circovirus porcino*

<400> 5

25 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

ES 2 532 861 T3

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

5 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

10 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

15 130 135 140

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

20 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

25 210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro

225 230

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Circovirus porcino

<400> 6

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

10 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

15 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

20 100 105 110

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

25 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

ES 2 532 861 T3

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

5 195 200 205

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

10

<210> 7

<211> 756

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

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

<400> 7

gcgccgcgga gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcggtaccg cagaagaaga 60

20 caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcccgc gccctggct cgtccacccc 120

cgccaccgct accggtggag aaggaaaaat ggcattttca acaccgcct ctccgcacc 180

ttcggatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgcct cctggggcgt ggacatgatg 240

agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc 300

tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggccctgctc ccccatcacc 360

25 cagggtgata ggggagtggt ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag 420

gccacagccc taacctatga cccatattga aactactcct cccgccatac aatcccccaa 480

cccttctct accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat 540

ES 2 532 861 T3

tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggtga ggctacaaac ctctagaaat 600  
gtggaccacg taggcctcgg cactgogttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat 660  
atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaate ttaaagaccc cccacttgaa 720  
ccctaagaat tctatcacta gtgaattogc ggccgc 756

5

<210> 8

<211> 10387

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Esta es el circovirus porcino de tipo 2, construcción ORF2, que incluye las secuencias de codificación de baculovirus y pGEM T-easy.

<400> 8

aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatattagt tgcgtttatg agataagatt 60  
15 gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgogt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt 120  
ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacctttgc ggcccagatt gtttgcgtag 180  
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt 240  
ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aatattatg atggtgtgca ttttttgcg 300  
gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata 360  
20 gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccgg catgttggtg 420  
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatogc accggttaca tgggtgtgcag atatttaatg 480  
cacaccctgg gtattgogcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac 540  
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcatc 600  
ttaacaaat actttatcct attttcaaat tggtgogctt cttccagcga accaaaaacta 660  
25 tgcttcgctt gctccgttta gcttgtagcc gatcagtggc gttggttcaa tcgacggtag 720  
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttacgt ttatgctttt 780  
ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgocgctca 840

ES 2 532 861 T3

cgcaaacac cggatgtttg cgcttgccg cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat 900  
 ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gogogtcttt tttctgcatt atttctctt 960  
 tcttttgcac ggtttcctgg aagccggtgt acatgcgggt tagatcagtc atgacgcgcg 1020  
 tgacctgcaa atctttggcc togatctgct tgtccttgat ggcaacgatg cgttcaataa 1080  
 5 actcttgttt tttacaagt tcctcggttt tttgogccac caccgcttgc agcgcgtttg 1140  
 tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctcccgtt 1200  
 gtttgatcgc gggatcgtac ttgccggtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa 1260  
 gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttgactt cataatcagc tgaatcacgc 1320  
 cggatttagt aatgagcact gtatgoggct gcaatacag cgggtcgccc cttttcacga 1380  
 10 cgctgttaga ggtagggccc ccattttgga tggctctgctc aaataacgat ttgtatttat 1440  
 tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaaactg ttagcgcagt 1500  
 ccttgccac gaaccggacc tgttggtcgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat 1560  
 cttctcaaaa tttaaattct ccaattttaa cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat 1620  
 tttgcaaaa ctattgtttt ttaacgaaa ctaaacttat tgtggttaagc aataataaa 1680  
 15 tatgggggaa catgcgccgc tacaacactc gtogttatga acgcagacgg cgccggtctc 1740  
 ggcgcaagcg gctaaaacgt gttgogcgtt caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag 1800  
 tacagttttg atttgcata taacggcgat tttttaaatt atcttattta ataaatagtt 1860  
 atgacgccta caactccccg cccgcgttga ctogctgcac ctogagcagt tcggtgacgc 1920  
 cttcctccgt gtggccgaac acgtcgagcg ggtggtogat gaccagcggc gtgccgcacg 1980  
 20 cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcga aggcacgtcg gcctccaagt 2040  
 ggcaatattg gcaaattcga aatatatac agttgggttg tttgocgata tctatcgtgg 2100  
 cgttgggcat gtacgtccga acgttgattt gcatgcaagc cgaaattaa tcattgcgat 2160  
 tagtgcgatt aaaacgttgt acatctcgc ttttaatcat gccgtcgatt aaatcgcgca 2220  
 atcgagtcaa gtgatcaaag tgtggaataa tgttttcttt gtattcccga gtcaagcgcga 2280  
 25 gcgcgtattt taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc 2340  
 aataatata tatgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gcccgttgtc gcatctcaac 2400  
 acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag cttgcgacgc aacgtgcacg 2460

ES 2 532 861 T3

atctgtgcac gcgttccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca 2520  
 tgacccccgt agtgacaacg atcacgocca aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt 2580  
 atgtcgggtga cgttaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc 2640  
 tgggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt 2700  
 5 agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atcccgatga ttttattgat 2760  
 aaattgacct taactccata cacggtatte tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc 2820  
 ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccgcccacta ttaatgaaat taaaaattcc 2880  
 aattttaaaa aacgcagcaa gagaaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa 2940  
 aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg 3000  
 10 aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggtatgt acaggaagag gtttatacta 3060  
 aactgttaca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaaagtgtg aaaaccgatg tttaatcaag 3120  
 gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcatctttta 3180  
 atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aatgaaaac tgtcgacaag 3240  
 ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata 3300  
 15 aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa 3360  
 cattttagt attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgtgagg taatatttaa 3420  
 aatcattttc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac 3480  
 tagacgcctt gtcgtcttct tcttcgtatt ccttctcttt ttcatttttc tctcataaaa 3540  
 aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt 3600  
 20 tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtttttc 3660  
 tgtaatttac aacagtgcta ttttctggta gttcttogga gtgtgttgct ttaattatta 3720  
 aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt 3780  
 acgcagcttc ttctagttca attacacocat tttttagcag caccggatta acataacttt 3840  
 ccaaaatgtt gtacgaaccg ttaaacaata acagttcacc tcccttttct atactattgt 3900  
 25 ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaactaat 3960  
 atcacaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaat 4020  
 gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa 4080

ES 2 532 861 T3

aaacataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcgg atcagatctg 4140  
 cagcggccgc ggggaattcga tccgccatga cgtatccaag gaggcggttac cgcagaagaa 4200  
 gacaccgccc ccgcagccat cttggccaga tctccgcgcg ccgcccctgg ctctccacc 4260  
 cccgccaccg ctaccgttgg agaaggaaaa atggcatctt caacaccgcg ctctcccgca 4320  
 5 ccttcggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctctctggcg gtggacatga 4380  
 tgagatttaa tattgacgac tttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac 4440  
 cctttgaata ctacagaata agaaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tccccatca 4500  
 cccagggatga taggggagtg ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa 4560  
 aggccacagc cctaacctat gaccatgatg taaactactc ctcccgccat acaatcccc 4620  
 10 aacccttctc ctaccactcc cgttaactca caccocaaacc tgttcttgac tccactattg 4680  
 attacttcca accaaataac aaaaggaatc agctttggct gaggcataca acctctagaa 4740  
 atgtggacca cgtaggcctc ggactgcgt tcgaaaacag taaatacgcg caggactaca 4800  
 atatccgtgt aaccatgtat gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccacttg 4860  
 aaccctaaga attctatcac tagtgaattc gcggccgcgc gccgctccag aattctagaa 4920  
 15 ggtaccggg atcctttcct gggaccggc aagaacaaa aactcactct cttcaaggaa 4980  
 atccgtaatg ttaaaccoga cacgatgaag cttgtcgttg gatggaaagg aaaagagttc 5040  
 tacagggaaa cttggaccgc ctcatggaa gacagcttc ccattgttaa cgaccaagaa 5100  
 gtgatggatg tttccttgt tgtcaacatg cgtcccacta gaccocaccg ttgttacaaa 5160  
 ttcctggccc aacacgctct gcgttgcgc cccgactatg tacctcatga cgtgattagg 5220  
 20 atcgtcgcgc cttcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcgcct ggctaagaag 5280  
 ggcggcggct gcccaataat gaaccttcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagttc 5340  
 atcgatcgtg tcatctggga gaactctac aagccatcg tttacatcgg taccgactct 5400  
 gctgaagagg aggaaattct ccttgaagtt tccctgggtg tcaaagtaaa ggagtttgca 5460  
 ccagacgcac ctctgttcac tggctcggcg tattaaaaca cgatacattg ttattagtac 5520  
 25 atttattaag cgctagatcc tgtgcgttgt tgatttacag acaattgttg tacgtatttt 5580  
 aataattcat taaatttata atctttaggg tggatgttta gagcgaaaat caaatgattt 5640  
 tcagcgtctt tatactgaa tttaaatatt aaatcctcaa tagatttgta aaataggttt 5700

ES 2 532 861 T3

cgattagttt caaacaaggg ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt 5760  
 tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc 5820  
 gtttgtgttt tgttttgtaa taaaggttcg acgtogttca aaatattatg cgcttttgta 5880  
 tttctttcat cactgtcggt agtgtacaat tgactogacg taaacacggt aaataaagct 5940  
 5 tggacatatt taacatcggg cgtgtagct ttattaggcc gattatcgtc gtcgtcccaa 6000  
 ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta 6060  
 attgtgtcgg ctaacacgtc cgcgatcaaa tttgtagttg agctttttgg aattatttct 6120  
 gattgcgggc gtttttgggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac 6180  
 acgttagaaa gcgatggtgc aggcgggtgg aacatttcag acggcaaatc tactaatggc 6240  
 10 ggcgggtggtg gagctgatga taaatctacc atcgggtggag gcgcaggcgg ggctggcggc 6300  
 ggaggcggag gcggaggtgg tggcgggtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct 6360  
 ttaggcaaca cagtcggcac ctcaactatt gtactggttt cgggcgcctt ttttggtttg 6420  
 accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag cttccaacaa ttgttgtctg 6480  
 tcgtctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca 6540  
 15 gacatcgatg gtggtggtgg tgggtggaggc gctggaatgt taggcacggg agaagggtgg 6600  
 ggcggcgggtg ccgccggtat aatttgttct ggttttagttt gttcgcgcac gattgtgggc 6660  
 accggcgcag gcgccgctgg ctgcacaacg gaaggctgct tgcttcgagg cagcgccttg 6720  
 ggtggtggca attcaatatt ataattggaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt 6780  
 gtaatttcgc tatcgtttac cgtgccgata ttaacaacc gctcaatgta agcaattgta 6840  
 20 ttgtaaagag attgtctcaa gctcgcgcga cgcgcgataac aagccttttc atttttacta 6900  
 cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtogacgta catgtatgct ttgttgtcaa 6960  
 aaacgtcggt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt 7020  
 tgtcgtaaat gttgtttttg ataatttgcg cttccgcagt atcgacacgt tcaaaaaatt 7080  
 gatgcgcac ctaatttgtt ttctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc 7140  
 25 tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgctgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200  
 actgcaaaaa cgtcaaaact cgggtataaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta 7260  
 ttttatcgca caagcccact agcaaatgt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt 7320

ES 2 532 861 T3

ttaacgctga cgaaataaaa gttcaccagt taatgagcga ccacccaaat tttataaaaa 7380  
 tctatnttaa tcacggttcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc 7440  
 ccgatttatt tgaaacacta caaattaaag gcgagctttc gtaccaactt gttagcaata 7500  
 ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg 7560  
 5 acataaaact cgaaaatgtc ttatatttgc aagcacttga tcgcgtgtat gtttgcgatt 7620  
 acggattgtg caaacacgaa aactcactta gcgtgcacga cggcacgttg gagtattntta 7680  
 gtccggaaaa aattcgacac acaactatgc acgtttcgtt tgactggtac gcggcgtgtt 7740  
 aacatacaag ttgctaacgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgntatcc 7800  
 gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 7860  
 10 atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 7920  
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 7980  
 tgggcgctct tccgcttccct cgcctcactga ctgcctgcgc tcggctcgttc ggctgcggcg 8040  
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8100  
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 8160  
 15 gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgaocagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8220  
 tcagagggtg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgntttccc ctggaagctc 8280  
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacogga tacctgtccg cttttctccc 8340  
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 8400  
 cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 8460  
 20 atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8520  
 agccactggt aacaggatta gcagagcag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8580  
 gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtatnt ggtatctgcg ctctgctgaa 8640  
 gccagttacc ttcggaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 8700  
 tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 8760  
 25 agatcctttg atctnttcta cggggtctga cgcctcagtg aacgaaaact cacgttaagg 8820  
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atcctnttaa attaaaaatg 8880  
 aagntntaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 8940

ES 2 532 861 T3

aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact 9000  
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcctacca tctggcccca gtgctgcaat 9060  
gataccgcca gacccacgct cacgggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9120  
aagggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9180  
5 ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9240  
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 9300  
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaagcgg ttagctcctt 9360  
cggctctccg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 9420  
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9480  
10 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccga cagagttgct cttgcccggc 9540  
gtcaatacgg gataatacgg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 9600  
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9660  
accactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720  
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg 9780  
15 aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9840  
gagcgggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9900  
tccccgaaaa gtgccacctg acgtotaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960  
aaataggcgt atcacgagc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 10020  
ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag 10080  
20 acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cgggctggc ttaactatgc 10140  
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg 10200  
cgtaaggaga aaatacgcga tcaggogcca ttogccatc aggetgcgca actgttggga 10260  
agggcgatcg gtgcgggctt cttogetatt acgccagctg gcgaaaggg gatgtgctgc 10320  
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc 10380  
25 cagtgcc 10387

<211> 20

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 9

5 Ser Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His His Pro Pro Ser

1 5 10 15

His Leu Gly Gln

<210> 10

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

15 1 5 10 15

Thr Leu Ser

<210> 11

<211> 233

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Esta es la secuencia de aminoácidos para el circovirus porcino de tipo

25 2, el marco de lectura abierto 2.

<400> 11

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

ES 2 532 861 T3

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

5 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

10 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

15 115 120 125

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

20 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

25 195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe

210 215 220

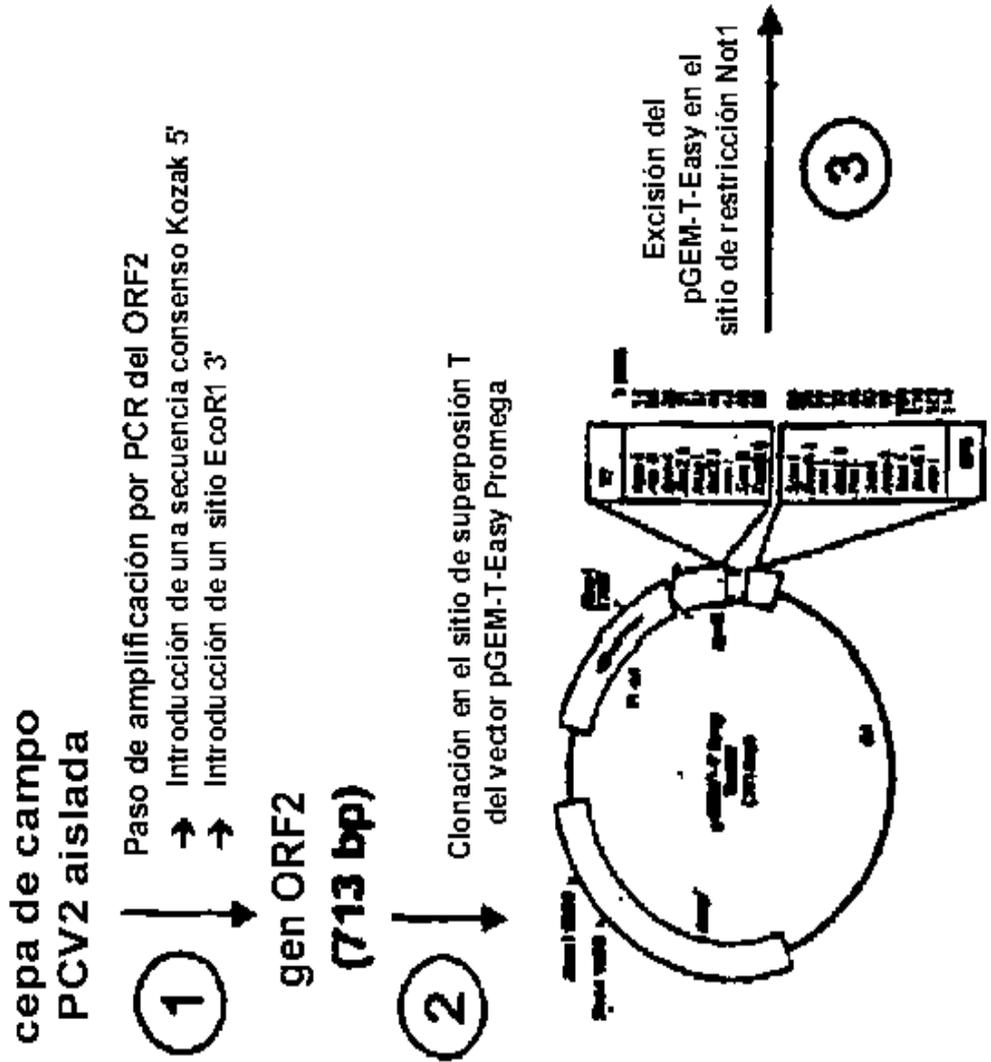
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro

225 230

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una vacuna que comprende 4 a 400 µg/dosis de proteína ORF2 del PCV2 recombinante para uso en un método de prevenir una infección por PCV2 en un cerdo, en donde dicho método consiste en la administración de una dosis de dicha vacuna a dicho cerdo.
- 10 2. La vacuna de la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha vacuna comprende un adyuvante.
3. La vacuna de la reivindicación 1 ó 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho adyuvante se selecciona del grupo que consiste en polímeros de ácido acrílico o polímeros de ácido metacrílico.
- 15 4. La vacuna de la reivindicación 2 ó 3 para uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en donde dicho adyuvante es un carbómero, preferiblemente un Carbopol.
- 20 5. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicho adyuvante comprende aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg de Carbopol por dosis.
6. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha vacuna comprende 4 µg a 200 µg de proteína ORF2 del PCV2 recombinante.
- 25 7. Uso de una vacuna que comprende 4 a 400 µg/dosis de proteína ORF2 del PCV2 recombinante para la fabricación de un medicamento para uso en un método de prevenir una infección por PCV2 en un cerdo, en donde dicho método consiste en la administración de una dosis de dicha vacuna a dicho cerdo.
8. El uso de la reivindicación 7, en donde dicha vacuna comprende un adyuvante.
- 30 9. El uso de la reivindicación 7 u 8, en donde dicho adyuvante se selecciona del grupo que consiste en polímeros de ácido acrílico o polímeros de ácido metacrílico.
- 10, El uso de la reivindicación 8 ó 9, en donde dicho adyuvante es un carbómero, preferiblemente un Carbopol.
- 35 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde dicho adyuvante comprende aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg de Carbopol por dosis.
- 40 12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde dicha vacuna comprende 4 µg a 200 µg de proteína ORF2 del PCV2 recombinante.

Fig. 1



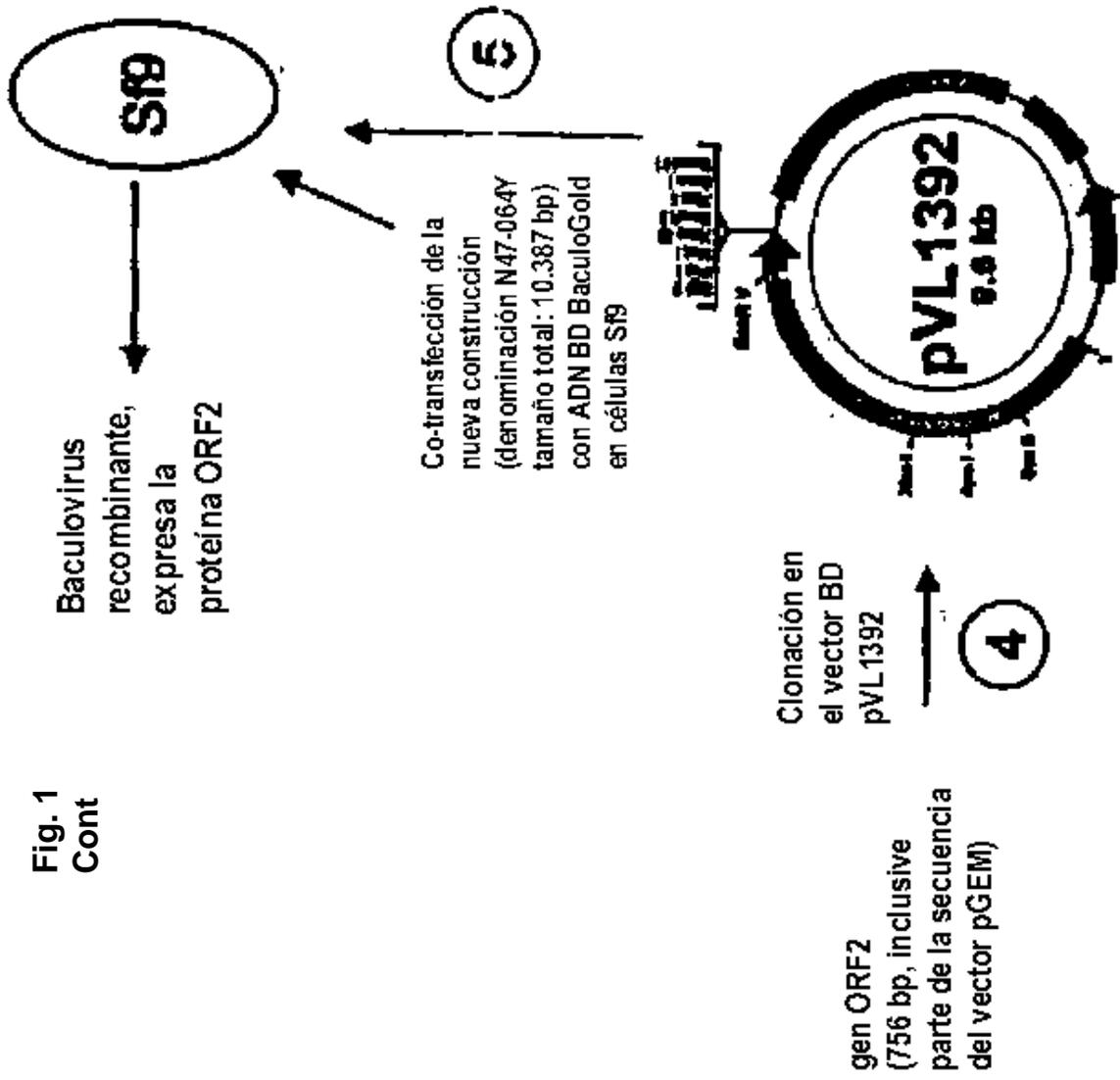


Fig. 1  
Cont

FIGURA 2 (a) :

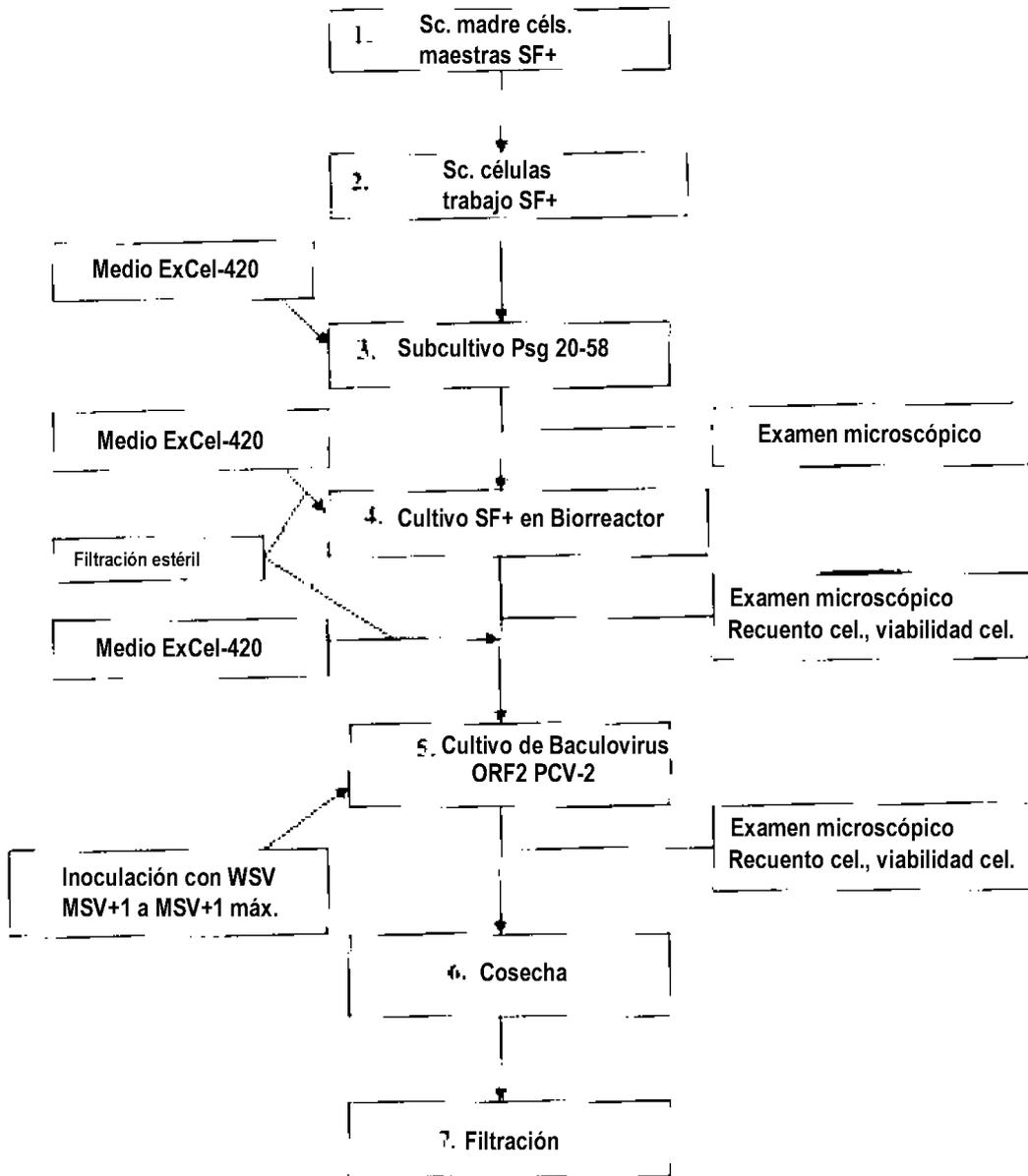


FIGURA 2 (b)

