

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 254**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006 E 11164854 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2371385**

54 Título: **Uso de una composición inmunogénica de PCV2 para reducir los síntomas clínicos en cerdos**

30 Prioridad:

**29.12.2005 US 755016 P**  
**17.10.2006 US 829809 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.12.2015**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**  
**(100.0%)**  
**2621 North Belt Highway**  
**St. Joseph, MO 64506-2002, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

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

**ES 2 553 254 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

Uso de una composición inmunogénica de PCV2 para reducir los síntomas clínicos en cerdos

### Listado de secuencias

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

## 5 Antecedentes de la invención

### Campo de la Invención

La presente descripción se refiere al uso de una composición inmunogénica que comprende un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) para el tratamiento de varias manifestaciones clínicas (enfermedades). Preferiblemente, estas manifestaciones clínicas están asociadas con una infección por PCV2. Más particularmente, la presente descripción concierne a una composición inmunológica eficaz para proporcionar una respuesta inmune que reduce o disminuye la gravedad de los síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2. La composición inmunológica comprende un antígeno producido de forma recombinante de PCV2. El antígeno es una proteína ORF2 de PCV2. Lo más particularmente, la presente descripción concierne a una composición inmunológica, eficaz para el tratamiento de síntomas clínicos asociados con infecciones por PCV2 en cerdos que reciben la composición inmunológica, y en donde la composición comprende la proteína expresada por ORF2 de PCV2. Otro aspecto de la presente descripción es el uso de cualquiera de las composiciones proporcionadas con la presente como un medicamento, preferiblemente como un medicamento veterinario, incluso más preferiblemente como una vacuna. Además de ello, la presente descripción también se refiere al uso de cualquiera de las composiciones descritas en esta memoria, para la preparación de un medicamento para reducir o disminuir la gravedad de síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2. Preferiblemente, el medicamento es para la prevención de una infección por PCV2, incluso más preferiblemente en cerdos. Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un procedimiento para la producción de un medicamento, que comprende una composición inmunogénica de PCV2 para el tratamiento de varias manifestaciones clínicas.

### Descripción de la Técnica Anterior

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

Los actuales enfoques para tratar infecciones por PCV2 incluyen vacunas basadas en ADN, tales como las descritas en la patente de EE.UU. nº 6.703.023. Sin embargo, este tipo de vacunas ha sido ineficaz para conferir inmunidad protectora contra una infección por PCV2 o para reducir, disminuir la gravedad o curar cualesquiera síntomas clínicos asociados con la misma. Además, vacunas descritas en la técnica anterior estaban dirigidas solamente a la prevención de infecciones por PCV2 en cerdos, pero no consideraban ningún uso médico adicional.

Por consiguiente, lo que se necesita en la técnica es una composición inmunogénica para el tratamiento de varias manifestaciones clínicas. Además, lo que se necesita en la técnica es una composición inmunológica que confiera inmunidad protectora contra una infección por PCV2, pero que también se pueda usar para tratar síntomas clínicos existentes, asociados con una infección por PCV2.

### Descripción de la invención

La presente invención supera los problemas inherentes en la técnica anterior y proporciona un avance preciso en el estado de la técnica. La presente invención proporciona un uso o usos medicinales de una composición o composiciones inmunogénicas que comprenden antígeno de PCV2.

La presente invención proporciona:

[1] Una composición inmunogénica capaz de provocar o reforzar una respuesta inmune contra PCV2 y que comprende proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante, para uso en la prevención de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos:

- 5 (1) neumonía intersticial con edema interlobular,  
(2) palidez cutánea o íctero,  
(3) hígados atróficos moteados,  
(4) úlceras gástricas y  
(5) nefritis,

10 en donde la proteína ORF2 de PCV2 se ha de administrar una vez a cerdos.

[2] La composición inmunogénica de acuerdo con [1] para uso de acuerdo con [1], en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante es proteína ORF2 de PCV2 expresada en baculovirus.

[3] La composición inmunogénica de acuerdo con [1] o [2] para uso de acuerdo con [1] o [2], en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante ha sido obtenida por un método en el que

- 15 - células susceptibles son infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2,  
- el polipéptido ORF2 de PCV2 es expresado por el baculovirus recombinante, y  
- el polipéptido ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración y se inactiva.

20 [4] La composición inmunogénica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante ha sido recuperada del sobrenadante de células cultivadas in vitro, en donde dichas células fueron infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2, y en donde dicho cultivo celular fue tratado con BEI aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM para inactivar el vector de baculovirus, y una concentración equivalente de un agente de neutralización.

25 [5] La composición inmunogénica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], que comprende, además, al menos una parte de vector de baculovirus recombinante que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2.

[6] La composición inmunogénica de acuerdo con [5] para uso de acuerdo con [5], que comprende, además, una parte de sobrenadante del cultivo celular.

30 [7] La composición inmunogénica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en donde la composición inmunogénica es una vacuna.

[8] La composición inmunogénica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], que comprende de aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 200 µg de la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante por dosis.

35 [9] La composición inmunogénica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], en donde los cerdos son cerdos de 2 semanas de edad o mayores, pero no mayores que 15 semanas de edad.

[10] La composición inmunogénica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], en donde la composición inmunogénica comprende, además, un adyuvante.

40 [11] La composición inmunogénica de acuerdo con [10] para uso de acuerdo con [10], en donde el adyuvante puede incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua o en donde el adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico, y los copolímeros de anhídrido maleico y un derivado de alqueno.

45 [12] La composición inmunogénica de acuerdo con [10] u [11] para uso de acuerdo con [10] u [11], que comprende 100 µg a 10 mg de adyuvante por dosis.

[13] La composición inmunogénica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12], en donde la composición inmunogénica está sustancialmente exenta de antígenos o polipéptidos de PCV2 que no sean la proteína ORF2 de PCV2.

- [14] La composición inmunogénica de acuerdo con [4] para uso de acuerdo con [4] y que comprende, además, un adyuvante listado en [11], en donde la composición inmunogénica es estable a lo largo de un período de 24 meses.
- 5 [15] La composición inmunogénica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [14] para uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [14], en donde el medicamento se ha de administrar por vía intramuscular.
- [16] Uso de una composición inmunogénica capaz de provocar o reforzar una respuesta inmune contra PCV2 y que comprende proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante, en la fabricación de un medicamento para la prevención de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos:
- 10 (1) neumonía intersticial con edema interlobular,  
(2) palidez cutánea o íctero,  
(3) hígados atróficos moteados,  
(4) úlceras gástricas y  
(5) nefritis,
- 15 en donde la proteína ORF2 de PCV2 se ha de administrar una vez a cerdos.
- [17] El uso de acuerdo con [16], en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante es proteína ORF2 de PCV2 expresada en baculovirus.
- [18] El uso de acuerdo con [16] o [17], en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante ha sido obtenida por un método en el que
- 20 - células susceptibles son infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2,  
- el polipéptido ORF2 de PCV2 es expresado por el baculovirus recombinante, y  
- el polipéptido ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración y se inactiva.
- [19] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [16] a [18], en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante ha sido recuperada del sobrenadante de células cultivadas in vitro, en donde dichas células fueron infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2, y en donde dicho cultivo celular fue tratado con BEI aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM para inactivar el vector de baculovirus, y una concentración equivalente de un agente de neutralización.
- 25 [20] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [16] a [19], que comprende, además, al menos una parte de vector de baculovirus recombinante que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2.
- [21] El uso de acuerdo con [20], que comprende, además, una parte de sobrenadante del cultivo celular.
- [22] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [16] a [21], en donde la composición inmunogénica es una vacuna.
- 35 [23] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [16] a [22], que comprende de aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 200 µg de la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante por dosis.
- [24] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [16] a [23], en donde los cerdos son cerdos de 2 semanas de edad o mayores, pero no mayores que 15 semanas de edad.
- 40 [25] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [16] a [24], en donde la composición inmunogénica comprende, además, un adyuvante.
- [26] El uso de acuerdo con [25], en donde el adyuvante puede incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua o en donde el adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico, y los copolímeros de anhídrido maleico y un derivado de alqueno.
- 45 [27] El uso de acuerdo con [25] o [26], que comprende 100 µg a 10 mg de adyuvante por dosis.
- [28] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [16] a [27], en donde la composición inmunogénica está sustancialmente exenta de antígenos o polipéptidos de PCV2 que no sean la proteína ORF2 de PCV2.

[29] El uso de acuerdo con [19], en donde la composición inmunogénica comprende, además, un adyuvante listado en [26] y es estable a lo largo de un período de 24 meses.

[30] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [16] a [29], en donde el medicamento se ha de administrar por vía intramuscular.

5 En general, no se observaron sucesos adversos ni reacciones en el sitio de inyección para ninguna de las composiciones inmunogénicas de antígeno de PCV2 tal como se utilizan en esta memoria. Así, las composiciones inmunogénicas utilizadas en esta memoria parecen ser seguras cuando se administran a cerdos jóvenes, preferiblemente a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas, lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas.  
10 Alternativamente, se prefiere que la administración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se produzca en el espacio de al menos 2 y preferiblemente en el espacio de al menos 3 semanas de exposición a PCV virulento. De acuerdo con una realización adicional, las composiciones inmunogénicas utilizadas en esta memoria para cualquier uso medicinal descrito en esta memoria se administran a cerdos de 3 semanas de edad o mayores, preferiblemente de 2 semanas de edad o mayores, pero lo más preferiblemente no mayores de 15  
15 semanas de edad.

Inesperadamente, se encontró que el uso terapéutico de las composiciones inmunogénicas descritas a continuación es eficaz para disminuir la gravedad de diversos síntomas clínicos en cerdos. En particular, se descubrió que el uso terapéutico de las composiciones inmunogénicas de la presente invención, y específicamente composiciones que comprenden antígeno de ORF2 de PCV2, es eficaz para reducir o disminuir la linfadenopatía, el agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes en cerdos infestados con PCV2. Además, el uso terapéutico de una composición antigénica, según se proporciona con la presente, y que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de ORF2, reduce la carga global de circovirus y su impacto inmunosupresor, dando con ello como resultado un nivel más elevado de resistencia general a la enfermedad y una incidencia reducida de enfermedades y síntomas asociados a PCV-2.  
20

25 Así, en esta memoria se describe el uso de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, para la preparación de un medicamento para la prevención, disminución y/o reducción de linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes en cerdos. Preferiblemente, dicho medicamento es eficaz para la prevención, disminución y/o reducción de la linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes asociados con infecciones por PCV2 en cerdos. Todavía más preferiblemente, dicho medicamento es eficaz para la prevención, disminución y/o reducción de la linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes asociados con infecciones por PCV2 en cerdos, cuando se administra a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas y, lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas.  
30 Alternativamente, se prefiere que la administración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se produzca en el espacio de al menos 2 y preferiblemente en el espacio de al menos 3 semanas de exposición a PCV virulento.  
35

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un método para el tratamiento de linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes en cerdos, que comprende la administración de una composición inmunogénica, según se proporciona con la presente, a un cerdo, comprendiendo dicha composición inmunogénica un antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2. Todavía en otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes asociados con una infección por PCV2 en cerdos, que comprende la administración de una composición inmunogénica, según se proporciona con la presente, a un cerdo, comprendiendo dicha composición inmunogénica un antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, dicho tratamiento da como resultado la disminución, reducción, prevención y/o curado de la linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes en cerdos que reciben dicha composición inmunogénica. De acuerdo con un aspecto adicional, dichos métodos de tratamiento comprenden, además, la administración de dicha composición inmunogénica a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas, y lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas. Alternativamente, se prefiere que la administración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se produzca en el espacio de al menos 2 y preferiblemente en el espacio de al menos 3 semanas de exposición a PCV virulento.  
40  
45  
50

55 Además, se descubrió que el uso terapéutico de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante, y lo más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2, según se proporciona con la presente, puede reducir o disminuir la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos afectados: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductores, p. ej. aborto, partos muertos, momias, etc.  
60

Así, se describe en esta memoria el uso de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2,

preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, para la preparación de un medicamento para la prevención, disminución y/o reducción de la linfadenopatía, en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductores, p. ej. aborto, partos muertos, momias, etc., en cerdos. Preferiblemente, dicho medicamento es eficaz para la prevención, disminución y/o reducción de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas asociados con una infección por PCV2 en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductores, p. ej. aborto, partos muertos, momias, etc. De acuerdo con un aspecto adicional, dicho medicamento es eficaz para la prevención, disminución y/o reducción de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductores, p. ej. aborto, partos muertos, momias, etc. en cerdos, cuando se administra a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas, y lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas. Alternativamente, se prefiere que la administración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se produzca en el espacio de al menos 2 y preferiblemente en el espacio de al menos 3 semanas de exposición a PCV virulento.

Además, la presente descripción también se refiere a un método para el tratamiento de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductores, p. ej. aborto, partos muertos, momias, etc., comprendiendo dicho método la administración de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante, y más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente. Preferiblemente, la presente descripción también se refiere a un método para el tratamiento de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas asociados con una infección por PCV2 en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductores, p. ej. aborto, partos muertos, momias, etc., comprendiendo dicho método la administración de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante, y más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, a un cerdo. Preferiblemente, dicho tratamiento resulta en la disminución o reducción de la linfadenopatía, y uno o más de los siguientes síntomas asociados con una infección por PCV2 en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductores, p. ej. aborto, partos muertos, momias, etc. De acuerdo con un aspecto adicional, dichos métodos de tratamiento comprenden, además, la administración de la composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante, y más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2, según se proporciona en esta memoria, a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas, y lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas. Alternativamente, se prefiere que la administración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se produzca en el espacio de al menos 2 y preferiblemente en el espacio de al menos 3 semanas de exposición a PCV virulento.

También se encontró, inesperadamente, que el uso terapéutico de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2, según se proporciona con la presente, puede también reducir o disminuir lesiones similares a Pia (siglas en inglés - adenomatosis intestinal porcina), que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis* (ileitis).

Así, un aspecto de la presente descripción se refiere al uso de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, para la preparación de un medicamento para la prevención, disminución de la gravedad y/o reducción de lesiones similares a Pia, que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis* en cerdos. De acuerdo con un aspecto adicional, dicho medicamento es eficaz para la prevención, disminución de la gravedad y/o reducción de lesiones similares a PIA que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis*, cuando se administra a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas y, lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas. Alternativamente, se prefiere que la administración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se produzca en el espacio de al menos 2 y preferiblemente en el espacio de al menos 3 semanas de exposición a PCV virulento.

Además, la presente descripción también se refiere a un método para el tratamiento de lesiones similares a Pia, que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis*, comprendiendo dicho método la administración de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona en esta memoria, a un cerdo. Preferiblemente, dicho tratamiento resulta en la disminución o reducción de las lesiones similares a Pia que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis*. De acuerdo con un aspecto

adicional, los métodos de tratamiento arriba descritos comprenden la administración de la composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante, y más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona en esta memoria, a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas y, lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas. Alternativamente, se prefiere que la administración de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se produzca en el espacio de al menos 2 y preferiblemente en el espacio de al menos 3 semanas de exposición a PCV virulento.

La composición inmunogénica

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, es eficaz para inducir una respuesta inmune contra PCV2 y prevenir, reducir y/o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2. La composición generalmente comprende al menos un antígeno de PCV2.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que los habitualmente comprendidos por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. La expresión "composición inmunogénica", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a toda composición farmacéutica que contiene un antígeno de PCV2, composición que puede ser utilizada para prevenir o tratar una enfermedad o estado asociado a una infección por PCV2 en un sujeto. Una composición inmunogénica preferida puede inducir, estimular o reforzar la respuesta inmune contra PCV2. La expresión abarca tanto composiciones inmunogénicas subunidad, como las que se describen más abajo, así como composiciones que contienen PCV2 entero matado o atenuado y/o inactivado.

La expresión "composición inmunogénica subunidad", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una composición que contiene al menos un polipéptido o antígeno inmunogénico, pero no todos los antígenos, derivados de u homólogos a un antígeno procedente de PCV2. Una composición de este tipo está sustancialmente exenta de PCV2 intacto. Así, una "composición inmunogénica subunidad" se prepara a partir de polipéptidos inmunogénicos procedentes de PCV2 al menos parcialmente purificados o fraccionados (de preferencia sustancialmente purificados), o análogos recombinantes de los mismos. Una composición inmunogénica subunidad puede comprender el antígeno o los antígenos subunidad de interés sustancialmente exentos de otros antígenos o polipéptidos procedentes de PCV2, o fraccionados de ellos. Una composición inmunogénica subunidad preferida comprende la proteína ORF2 de PCV2 según se describe más abajo.

Una "respuesta inmunológica o inmune" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmune" incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas y/o células T yd, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped exhibirá una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de modo que la resistencia a la nueva infección resultará reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad quedará reducida. Una protección de este tipo quedará demostrada por una reducción en el número o gravedad de o por la carencia de uno o más de los síntomas asociados con infecciones por PCV2 según se describen arriba.

Las expresiones proteína o polipéptido o "antígeno" "inmunogénico", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a una secuencia de aminoácidos que provoca una respuesta inmunológica según se describe antes. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", tal como se utiliza en esta memoria, incluye la secuencia de longitud completa de cualesquiera proteínas de PCV2, análogos de las mismas o fragmentos inmunogénicos de las mismas. La expresión "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítomos y, así, provoca la respuesta inmunológica arriba descrita. Fragmentos de este tipo se pueden identificar utilizando cualquier número de técnicas de representación en mapa de epítomos, bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, epítomos lineales se pueden determinar, p. ej., sintetizando concurrentemente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos, a la vez que los péptidos siguen estando fijados a los soportes. Técnicas de este tipo son conocidas en la técnica y se describen, p. ej., en la patente de EE.UU. nº 4.708.871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De manera similar, epítomos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tales como, p. ej., cristalografía por rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols, supra.

También se incluyen dentro de la definición antígenos sintéticos, por ejemplo poliepítomos, epítomos flanqueantes y otros antígenos recombinantes o derivados de forma sintética. Véase, p. ej., Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; Gardner et al., (1998) 12ª Conferencia Mundial del SIDA, Ginebra, Suiza, 28 de junio - 3 de julio de 1998.

En una realización preferida de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune y confiere inmunidad protectora frente a los síntomas clínicos de una infección por PCV2. La

composición comprende el polipéptido, o un fragmento del mismo, expresado por ORF2 de PCV2, en calidad del componente antigénico de la composición. ADN y proteína de ORF2 de PCV2, utilizados en esta memoria para la preparación de las composiciones y dentro de los procedimientos proporcionados en esta memoria, es un dominio altamente conservado dentro de aislados de PCV2 y, con ello, todo ORF2 de PCV2 sería eficaz como fuente del ADN y/o polipéptido de ORF2 de PCV tal como se utiliza en esta memoria. Una proteína ORF2 de PCV2 preferida es la de SEQ ID NO. 11. Un polipéptido ORF2 de PCV preferido se proporciona en esta memoria como SEQ ID NO. 5, pero se entiende por los expertos en la técnica que esta secuencia podría variar tanto como 6-10% en la homología de la secuencia y aún conservar las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. Las características antigénicas de una composición inmunológica se puede, por ejemplo, estimar por el experimento de evaluación según se proporciona por el Ejemplo 4. Además, se sigue conservando la característica antigénica de un antígeno modificado cuando el antígeno modificado confiere al menos un 70%, preferiblemente un 80%, más preferiblemente un 90% de la inmunidad protectora en comparación con la proteína ORF2 de PCV2, codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Una "composición inmunogénica", tal como se utiliza en esta memoria, significa una proteína ORF2 de PCV2 que provoca una "respuesta inmunológica" en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, esta composición inmunogénica es capaz de provocar o de reforzar una respuesta inmune contra PCV2, confiriendo con ello inmunidad protectora contra una infección por PCV2 y una reducción en la incidencia, gravedad o prevención de uno o más, y preferiblemente de todos los síntomas clínicos asociados con la misma.

En algunas formas, se utilizan porciones inmunogénicas de proteína ORF2 de PCV2 en calidad del componente antigénico en la composición. La expresión "porción inmunogénica", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a formas truncadas y/o sustituidas, o fragmentos de proteína y/o polinucleótido ORF2 de PCV2, respectivamente. Preferiblemente, tales formas truncadas y/o sustituidas, o fragmentos comprenderán al menos 6 aminoácidos contiguos procedentes del polipéptido de ORF2 de longitud completa. Más preferiblemente, las formas truncadas o sustituidas, o fragmentos tendrán al menos 10, más preferiblemente al menos 15, y aún más preferiblemente al menos 19 aminoácidos contiguos procedentes del polipéptido de ORF2 de longitud completa. Dos secuencias preferidas a este respecto se proporcionan en esta memoria como SEQ ID NOs. 9 y 10. Se entiende, además, que este tipo de secuencias pueden ser parte de fragmentos mayores o formas truncadas.

Un polipéptido de ORF2 de PCV2 preferido, proporcionado en esta memoria, es codificado por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Sin embargo, se entiende por los expertos en la técnica que esta secuencia podría variar tanto como 6-20% en la homología de la secuencia y aún conservar las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. En algunas formas, se utiliza una forma truncada o sustituida, o fragmento de este polipéptido de ORF2 de PCV2 como el componente antigénico en la composición. Preferiblemente, formas truncadas o sustituidas de este tipo, o fragmentos comprenderán al menos 18 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos de ORF2 de longitud completa, p. ej. de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, las formas truncadas o sustituidas, o fragmentos tendrán al menos 30, más preferiblemente al menos 45, y aún más preferiblemente al menos 57 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de ORF2 de longitud completa, p. ej. SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

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

nucleótidos que tenga al menos, por ejemplo, un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de "identidad de secuencia" con una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado sea idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polinucleótidos dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, incluso más preferiblemente hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos que tenga al menos un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 15%, preferiblemente el 10%, incluso más preferiblemente el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede estar suprimido o sustituido con otro nucleótido, o un cierto número de nucleótidos de hasta el 15%, preferiblemente el 10%, incluso más preferiblemente el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones terminales 5' ó 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezclado individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, por un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tenga al menos, por ejemplo, un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido dado sea idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polipéptidos dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, incluso más preferiblemente hasta 5 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptidos dada que tenga al menos un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 15%, preferiblemente hasta el 10%, incluso más preferiblemente hasta el 5% de los residuos aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar suprimido o sustituido con otro aminoácido, o un cierto número de aminoácidos de hasta el 15%, preferiblemente hasta el 10%, incluso más preferiblemente hasta el 5% del número total de residuos aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren por las sustituciones conservativas de aminoácidos. Sin embargo, las sustituciones conservativas no están incluidas como un apareamiento cuando se determina la identidad de secuencia.

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

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

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

Así, la composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, también se refiere a una composición que comprende proteína ORF2 de PCV2, en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 es una cualquiera de las descritas arriba. Preferiblemente, dicha proteína ORF2 de PCV2 es

- i) un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11,
- ii) cualquier polipéptido que es al menos un 80% homólogo con el polipéptido de i),
- iii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos de i) y/o ii),
- iv) la porción inmunogénica de iii), que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos incluidos en las

secuencias de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11,

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

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

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

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

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

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

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

El polipéptido ORF2 de PCV2 utilizado en la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención se puede derivar de cualquier metodología recombinante. Métodos preferidos para obtener polipéptido ORF2 de PCV2 se proporcionan en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 11/034.797. En síntesis, células susceptibles son infestadas con un vector viral recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2, el polipéptido ORF2 de PCV2 es expresado por el virus recombinante, y el polipéptido ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración y se inactiva por cualquier método convencional, preferiblemente utilizando etilenimina binaria, que luego se neutraliza para detener el proceso de inactivación.  
40

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, también se refiere a una composición que comprende **i)** cualesquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en las concentraciones descritas arriba, y **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante. Además, la composición inmunogénica puede comprender **i)** cualesquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en las concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, y **iii)** una porción del sobrenadante del cultivo celular.  
45

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, también se refiere a una composición que comprende **i)** cualesquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en las concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, y **iii)** una porción del cultivo celular; en donde aproximadamente el 90% de los componentes tienen un tamaño menor que 1 µm.  
50

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, también se refiere a una composición que comprende **i)** cualesquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en las concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2,  
55

preferiblemente de un baculovirus recombinante, **iii**) una porción del cultivo celular, **iv**) y agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm. Preferiblemente, BEI está presente en concentraciones eficaces para inactivar el baculovirus. Concentraciones eficaces se describen arriba.

- 5 La composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, también se refiere a una composición que comprende **i**) cualesquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en las concentraciones descritas arriba, **ii**) al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, **iii**) una porción del cultivo celular, **iv**) un agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, y **v**) un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm. Preferiblemente, si el agente inactivante es BEI, dicha composición comprende tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI.

15 El polipéptido se incorpora en una composición que puede ser administrada a un animal susceptible a infección por PCV2. En formas preferidas, la composición puede incluir también componentes adicionales conocidos por los expertos en la técnica (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18<sup>a</sup> ed. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes aceptables en veterinaria. Tal como se emplea en esta memoria, "un soporte aceptable en veterinaria" incluye uno y cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la adsorción y similares. En una realización preferida, la composición inmunogénica comprende proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, preferiblemente en las concentraciones descritas arriba, la cual está mezclada con un adyuvante, preferiblemente Carbopol, y solución salina fisiológica.

25 Los expertos en la técnica comprenderán que la composición utilizada en esta memoria puede incorporar soluciones estériles inyectables, fisiológicamente aceptables conocidas. Para preparar una solución lista para el uso para inyección parenteral o infusión, están fácilmente disponibles soluciones isotónicas acuosas, tales como, p. ej., solución salina o correspondientes soluciones de proteínas en el plasma. Además, las composiciones de vacuna inmunogénicas de la presente invención pueden incluir diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes. Los diluyentes pueden incluir agua, disolución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetraacético, entre otros.

35 "Adyuvantes", tal como se utilizan en esta memoria, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, p. ej. Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galénica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión se puede basar, en particular, en aceite de parafina líquido ligero (tipo de la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide tal como aceite escualano o escualeno que resulta de la teoligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de polietilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferiblemente tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitan, de manida (p. ej. oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isosteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados, y copolímeros de bloques de polioxiopropileno-polioxitileno, 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).

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

50 Un ejemplo adicional de un adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialquenoil-éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término carbómero (Pharmeuropa Vol. 8, nº 2, junio 1996). Personas expertas en la técnica también pueden aludir a la patente de EE.UU. nº 2.909.462 que describe polímeros acrílicos de este tipo reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos reemplazados por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, p. ej. vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener por sí mismos otros sustituyentes tal como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE.UU) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alil-sacarosa o con alil-pentaeritritol. Entre ellos se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg

hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferido, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

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

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

Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. Tal como se emplea en esta memoria, "un soporte farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la adsorción y similares. Lo más preferiblemente, la composición proporcionada con la presente contiene proteína ORF2 de PCV2 recuperada del sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, en donde dichas células estaban infestadas con un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2, y en donde dicho cultivo celular se trató con BEI aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, preferiblemente con BEI aproximadamente 5 mM para inactivar el vector viral, y una concentración equivalente de un agente de neutralización, preferiblemente solución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM.

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

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

Las composiciones inmunogénicas pueden además incluir uno o más de otros agentes inmunomoduladores tales como, p. ej., interleucinas, interferones u otras citocinas. Las composiciones inmunogénicas pueden también incluir Gentamicina y Mertiolato. Si bien las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 2000 µg de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 250 µg/ml de dosis de la composición de vacuna. Así, la composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere también a una composición que comprende de aproximadamente 1 µg/ml hasta aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibióticos.

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

Sorprendentemente, se ha encontrado que la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 de PCV2 era muy estable a lo largo de un periodo de 24 meses. También se ha encontrado que las composiciones

inmunogénicas son muy eficaces para reducir los síntomas clínicos asociados con infecciones por PCV2. También se descubrió que las composiciones inmunogénicas que comprenden el baculovirus recombinante que expresa proteína ORF2 de PCV2 según se describe arriba, son sorprendentemente más eficaces que una composición inmunogénica que comprende el virus PCV2 completo en una forma inactivada o antígeno de ORF2 de PCV2 viral aislado. En particular, sorprendentemente, se ha encontrado que el baculovirus recombinante que expresa proteína ORF2 de PCV2 es eficaz en concentraciones muy bajas, lo que significa concentraciones de hasta 0,25 µg/dosis. Este alto potencial inmunogénico inesperado de la proteína ORF2 de PCV2 es Carbopol incrementado. Los Ejemplos 1 a 3 describen en detalle la producción de ORF2 de PCV2 que comprende composiciones inmunogénicas.

- 5
- 10 La composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere también a Ingelvac® CircoFLEX™, (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, MO, EE.UU.), CircoVac® (Merial SAS, Lyon, Francia), CircoVent (Intervet Inc., Millsboro, DE, EE.UU.) o Suvaxyn PCV-2 One Dose® (Fort Dodge Animal Health, Kansas City, KA, EE.UU.).

Administración de la composición inmunogénica

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

- 25 Preferiblemente, al menos una dosis de las composiciones inmunogénicas, tal como se describen arriba, se administran por vía intramuscular al sujeto que lo necesita. De acuerdo con un aspecto adicional, el antígeno de PCV-2 o la composición inmunogénica que comprende un antígeno de PCV-2 de este tipo según se describe arriba se formula y administra en un (1) mL por dosis. Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción también se refiere a una composición inmunogénica de 1 ml, que comprende antígeno de PCV-2 según se describe en esta memoria, para reducir o disminuir la linfadenopatía, el agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes en cerdos infestados con PCV2.

- De acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción también se refiere a una composición inmunogénica de 1 ml, que comprende antígeno de PCV-2 según se describe en esta memoria, para reducir o disminuir la linfadenopatía, en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductores, p. ej. aborto, partos muertos, momias.

- De acuerdo con un aspecto adicional, al menos una administración adicional de al menos una dosis de la composición inmunogénica según se describe arriba se da a un sujeto que lo necesita, en donde la segunda o cualquier administración adicional se da al menos 14 días más tarde de la administración inicial o de cualesquiera administraciones anteriores. Preferiblemente, la composición inmunogénica se administra con un estimulante inmune. Preferiblemente, dicho estimulante inmune se da al menos dos veces. Preferiblemente, hay un espacio de tiempo de al menos 3 días, más preferiblemente al menos 5 días, incluso más preferiblemente al menos 7 días entre las primera y segunda administraciones y entre la segunda o cualquier administración adicional del estimulante inmune. Preferiblemente, el estimulante inmune se da al menos 10 días, preferiblemente 15 días, incluso más preferiblemente 20, incluso más preferiblemente 22 días más tarde de la administración inicial de la composición inmunogénica proporcionada en esta memoria. Un estimulante inmune preferido es, por ejemplo, hemocianina de lapa bocallave (KLH - siglas en inglés), preferiblemente emulsionado con adyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA). Sin embargo, se entiende con la presente que también se puede usar cualquier otro estimulante inmune conocido por una persona experta en la técnica. La expresión "estimulante inmune", tal como se utiliza en esta memoria, significa cualquier agente o composición que puede disparar la respuesta inmune, preferiblemente sin iniciar ni aumentar una respuesta inmune específica, por ejemplo la respuesta inmune contra un patógeno específico. Se instruye, además, administrar el estimulante inmune en una dosis adecuada.

- Además, sorprendentemente, se ha encontrado que el potencial inmunogénico de las composiciones inmunogénicas utilizadas en esta memoria, preferiblemente las que comprenden proteína ORF2 de PCV2 expresada en baculovirus recombinante, incluso más preferiblemente en combinación con Carbopol, se puede confirmar adicionalmente mediante la administración de la vacuna IngelVac PRRS MLV (véase el Ejemplo 5). Los síntomas clínicos de PCV2 y las manifestaciones de la enfermedad se magnifican grandemente cuando está presente una infección por PRRS. Sin embargo, las composiciones inmunogénicas y las estrategias de vacunación, tal como se proporcionan con la presente, redujeron este efecto grandemente, y en mayor medida de lo esperado. En otras palabras, se observó un efecto sinérgico inesperado cuando animales, preferiblemente cochinitos, fueron tratados con cualquiera de las composiciones inmunogénicas de ORF2 de PCV2, según se proporcionan

con la presente, y la vacuna Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

### Breve descripción de los dibujos

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

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

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los siguientes ejemplos recogen materiales y procedimientos preferidos de acuerdo con la presente invención. Aunque se puede utilizar en la práctica o someter a ensayo en la presente invención cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, los métodos, los dispositivos y los materiales preferidos se describen a continuación. Ha de entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente, y nada en ellos debe considerarse una limitación tras el alcance global de la invención.

#### Ejemplo 1

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

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

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

## ES 2 553 254 T3

se microfiltraron a través de una membrana con un tamaño de poros de 0,45-1,0 µm.

Las muestras resultantes tenían la cantidad de ORF2 presente en ellas, cuantificada a través de un ensayo ELISA. El ensayo ELISA se efectuó con anticuerpo de captura Pab IgG Prot. G anti-PCV2 porcino purificado (diluido a razón de 1:250 en PBS), diluido a razón de 1:6000 en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6). 100 µL del anticuerpo se dispusieron luego en los pocillos de la placa de microtitulación, se sellaron e incubaron durante una noche a 37°C. La placa se lavó después tres veces con una solución de lavado que comprendía 0,5 mL de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100 mL de 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) y 899,5 mL de agua destilada. Subsiguientemente, se añadieron a cada uno de los pocillos 250 µL de una solución de bloqueo (5 g de leche en polvo no grasa Carnation (Nestle, Glendale, CA) en 10 mL de D-PBS QS hasta 100 mL con agua destilada). La etapa siguiente era lavar la placa de ensayo y luego añadir antígeno pre-diluido. El antígeno pre-diluido se produjo añadiendo 200 µL de solución diluyente (0,5 mL de Tween 20 en 999,5 mL de D-PBS) a cada uno de los pocillos en una placa de dilución. La muestra se diluyó luego a una relación de 1:240 y a una relación de 1:480, y 100 µL de cada una de estas muestra diluidas se añadieron después a uno de los pocillos superiores en la placa de dilución (es decir, un pocillo superior recibió 100 µL de la dilución de 1:240 y el otro recibió 100 µL de la dilución de 1:480). Después se hicieron diluciones en serie para el resto de la placa separando 100 µL de cada uno de los pocillos sucesivos y transfiriéndolos al pocillo siguiente de la placa. Cada pocillo se mezcló antes de realizar la siguiente transferencia. El lavado de la placa de ensayo incluía el lavado de la placa durante tres veces con el tampón de lavado. La placa se selló después y se incubó durante una hora a 37°C antes de lavarla tres veces más con el tampón de lavado. El anticuerpo de detección utilizado era anticuerpo monoclonal contra ORF2 de PCV. Se diluyó a razón de 1:300 en solución diluyente y después se añadieron a los pocillos 100 µL del anticuerpo de detección diluido. La placa se selló después y se incubó durante una hora a 37°C antes de lavarla tres veces con el tampón de lavado. Luego se preparó diluyente conjugado añadiendo suero normal de conejo (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) a la solución diluyente hasta una concentración del 1%. Anticuerpo conjugado anti-ratón de cabra (H+I)-HRP (Jackson Immunoresearch) se diluyó en el diluyente de conjugado hasta 1:10.000. 100 µL del anticuerpo conjugado diluido se añadieron entonces a cada uno de los pocillos. La placa se selló después y se incubó durante 45 minutos a 37°C antes de lavarla tres veces con el tampón de lavado. 100 µL de sustrato (Sustrato TMB Peroxidasa, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), mezclados con un volumen igual de Sustrato Peroxidasa B (KPL) se añadieron a cada uno de los pocillos. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. 100 µL de solución de HCl 1 N se añadieron luego a todos los pocillos para detener la reacción. La placa se hizo pasar luego a través de un lector ELISA. Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Tabla 1 que figura a continuación:

Tabla 1

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

7	1	6,54	176
7	2	12,09	190
7	3	15,84	158
7	4	15,19	152

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

Ejemplo 2

Este ejemplo proporciona datos en cuanto a la eficacia de la invención reivindicada en esta memoria. Un matraz de centrifugación de 1000 mL se sembró con aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células Sf+/ml en 300 mL de medio Excell 420. El matraz se incubó luego a 27°C y se agitó a 100 rpm. Subsiguientemente, el matraz se sembró con 10 mL de siembra de virus ORF2 de PCV2/Bac p+6 (el baculovirus recombinante que contiene el gen ORF2 de PCV2 ORF2 pasó 6 veces adicionales en las células de insectos Sf9) con 0,1 MOI después de 24 horas de incubación.

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

Tabla 2

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

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

Ejemplo 3

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

Tabla 3

Día después de la infección:	ORF2 en el sobrenadante (µg/mL)
4	29,33
5	41,33
6	31,33
7	60,67

Ejemplo 4

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

Tabla 4. Diseño de Estudio General

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

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

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

15

Grupos 1-8 se les enfrentó con un PCV2 virulento.

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

Materiales y Métodos:

Este era un estudio de capacidad de enfrentamiento frente a la vacunación parcialmente ciego realizado en cerdos CDCD, de 9 a 14 días de edad el Día 0. Para ser incluidos en el estudio, los títulos IFA de PCV2 de cerdas eran  $\leq 1:1000$ . Adicionalmente, el estado serológico de cerdas procedía de una piara PRRS-negativa conocida. Se sometió a ensayo a ventiocho (28) cerdas en cuanto al estado serológico de PCV2. Catorce (14) cerdas tenían un título de PCV2 de  $\leq 1000$  y fueron transferidas al primer sitio de estudio. Ciento diez (110) cochinitos fueron proporcionados mediante cirugía por sección cesárea y estaban disponibles para este estudio el Día -4. El Día -3 se pesaron 108 cerdos CDCD en el primer sitio de estudio, se identificaron con etiquetas de oreja, se bloquearon por el peso y se asignaron al azar a 1 de 9 grupos, según se recoge antes en la tabla 4. Si cualquier animal de ensayo que cumplía los criterios de inclusión fue enrolado en el estudio y posteriormente fue excluido por cualquier motivo, el Investigador y Monitor consultó con el fin de determinar el uso de datos recogidos del animal en el análisis final. Se documentó la fecha en la que se excluyó a los cerdos enrolados y el motivo de la exclusión. Inicialmente no se excluyó a ninguna cerda. Un total de 108 de 110 cerdos disponibles fue asignado a uno de 9 grupos el Día -3. Los dos cerdos más pequeños (n<sup>os</sup> 17 y 19) no fueron asignados a un grupo y estaban disponibles como extras, en caso necesario. Durante el transcurso del estudio, se retiró a varios animales. Cada uno de Cerdo n<sup>o</sup> 82 (Grupo 9) el Día -1, Cerdo n<sup>o</sup> 56 (Grupo 6) el Día 3, Cerdo n<sup>o</sup> 53 (Grupo 9) el Día 4, Cerdo n<sup>o</sup> 28 (Grupo 8) el Día 8, Cerdo n<sup>o</sup> 69 (Grupo 8) el Día 7 y Cerdo n<sup>o</sup> 93 (Grupo 4) el Día 9, fue encontrado muerto antes del enfrentamiento. Estos seis cerdos no fueron incluidos en los resultados del estudio final. El cerdo n<sup>o</sup> 17 (uno de los cerdos extra) fue asignado al Grupo 9. El restante cerdo n<sup>o</sup> 19 extra fue excluido del estudio.

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

Tabla 5. Actividades de Estudio

Día de Estudio	Actividad de Estudio
-4, 0 a 49	Observaciones generales para la salud global y síntomas clínicos
-3	Pesado; distribuidos al azar en grupos; muestras de sangre tomadas de todos los cerdos
0	Examen de salud; administrados IVP N <sup>os</sup> 1-7 a los Grupos 1-7, respectivamente
0-7	Cerdos observados en cuanto a reacciones en los sitios de inyección

Día de Estudio	Actividad de Estudio
14	Grupo 7 reforzado con Vacuna nº 7 contra PCV2; muestras de sangre de todos los cerdos
14-21	Grupo 7 observado en cuanto a reacciones en los sitios de inyección
16-19	Tratados todos los cerdos con antibióticos (falta de datos)
19	Cerdos transportados desde el primer sitio de ensayo a un segundo sitio de ensayo
21	Grupos 1-9 tratados con KLH/ICFA
24	Muestras de sangre y de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos; pesados todos los cerdos; Grupos 1-8 enfrentados con material de enfrentamiento de PCV2
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 47	Muestras de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos
27	Grupos 1-9 tratados con KLH/ICFA
31	Muestras de sangre tomadas de todos los cerdos
49	Muestras de sangre y de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos; pesados todos los cerdos; necropsia de todos los cerdos; lesiones burdas señaladas con énfasis localizadas en íctero y úlceras gástricas; pulmones evaluados en cuanto a lesiones; guardadas muestras de tejido recientes y fijadas con formalina; completada la fase viva del estudio

Después de completarse la fase en vivo del estudio, tejidos fijados con formalina fueron examinados por inmunohistoquímica (IHC) para la detección de antígeno de PCV2 por parte de un patólogo, las muestras de sangre se evaluaron en cuanto a la serología de PCV2, las muestras de torunda nasal fueron evaluadas en cuanto a la secreción de PCV2, y la ganancia de peso media diaria (ADWG) fue determinada desde el Día 24 al Día 49.

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

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

Todos los cerdos de ensayo fueron tratados con vitamina E el Día -2, con inyecciones de hierro el Día -1 y con NAXCEL® (1,0 mL, IM, en jamones alternantes) los Días 16, 17, 18 y 19. Además, el Cerdo nº 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 nº 69 (Grupo 8) fue tratado con NAXCEL® el Día 6, el Cerdo nº 74 (Grupo 3) fue tratado con dexametazona y penicilina el Día 14, y el Cerdo nº 51 (Grupo 1) fue tratado con dexametazona y penicilina el Día 13 y con NAXCEL® el Día 14 por diversos motivos de salud.

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

El Día 0, los cerdos asignados a los Grupos 1-6, recibieron 1,0 mL de vacunas 1-6 contra PCV2, respectivamente, IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x ½". Los cerdos asignados al Grupo 7 recibieron 2,0 mL de vacuna nº 7 de PCV2, IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x ½". El Día 14, los cerdos asignados al Grupo 7 recibieron 2,0 mL de vacuna nº 7 de PCV2, IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x ½".

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

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

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

Con el fin de determinar la serología de PCV2, sangre entera venosa se recogió de cada cochinito del seno venoso orbital los Días -3 y 14. Para cada cochinito, la sangre se tomó del seno venoso orbital insertando un tubo capilar estéril en el canto medial de uno de los ojos y drenando aproximadamente 3,0 mL de sangre entera en un Tubo Separador de Suero (SST - siglas en inglés) de 4,0 mL. Los Días 24, 31 y 49 se tomó sangre entera venosa de cada cerdo de la vena cava anterior utilizando una aguja estéril 18g x 1 ½" Vacutainer (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey), un soporte de aguja Vacutainer y un SST de 13 mL. Las tomas de sangre en cada instante se registraron en el Registro de Toma de Muestras. Se dejó que se coagulara la sangre en cada SST, cada SST fue centrifugado y se recolectó el suero. El suero recolectado fue transferido a un tubo con tapón de cierre rápido estéril y se almacenó a -70 ± 10° C hasta que se sometió a ensayo con posterioridad. Las muestras de suero fueron sometidas a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos de PCV2 por parte del personal de BIVI-R&D.

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

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

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

De cada uno de los 103 cerdos a los que se realizó una necropsia en el segundo sitio de estudio, una muestra de tejido de las tonsilas, pulmones, corazón, hígado, nódulo linfático mesentérico, riñón y nódulo linfático inguinal se dispuso en un solo recipiente con formalina al 10% tamponada; mientras que otra muestra de tejido procedente de los mismos órganos antes mencionados se dispuso en un Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino

Unido) y cada Whirl-pak se dispuso en hielo. Cada recipiente se etiquetó apropiadamente. Las recogidas de muestras se registraron en el Formulario de Informe de la Necropsia. Después de ello, muestras de tejido fijado con formalina y el Formulario de Petición de Diagnóstico se suministraron para el ensayo de IHC. El ensayo de IHC se efectuó de acuerdo con procesos de laboratorio estándares ISU para muestras de recepción, preparación de muestras y portaobjetos y técnicas de tinción. Tejidos recientes en Whirl-paks fueron transportados con paquetes de hielo al Monitor del Estudio para el almacenamiento (-70° ± 10° C) y posible uso futuro. Los tejidos fijados con formalina fueron examinados por un patólogo en cuanto a la detección de PCV2 mediante IHC y se evaluaron utilizando el siguiente sistema de anotación: 0 = ninguno; 1 = tinción escasa positiva, pocos sitios; 2 = tinción moderada positiva, múltiples sitios; y 3 = abundante tinción positiva, difusa por todo el tejido. Debido al hecho de que el patólogo no podía diferenciar positivamente los NL inguinales de los NL mesentéricos, los resultados para estos tejidos fueron etiquetados simplemente como Nódulos Linfáticos y la puntuación daba la puntuación más alta para cada uno de los dos tejidos por animal.

Resultados

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	ADWG - kg/día (Día 24 a Día 49) o ajustada para cerdos muertos antes del Día 29
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	0,39 ± 0,13 kg/día
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	0,32 ± 0,14 kg/día
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	0,22 ± 0,09 kg/día
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	0,38 ± 0,14 kg/día
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	0,43 ± 0,09 kg/día
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	0,33 ± 0,11 kg/día
7	KV (2 dosis)	12	0,23 ± 0,07 kg/día
8	Controles de Enfrentamiento	10	0,34 ± 0,09 kg/día
9	Controles Estrictos Negativos	11	0,48 ± 0,08 kg/día
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado			

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

Tabla 7. Sumario del Grupo de Títulos IFA de PCV2

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

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

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

\*\*Día de Enfrentamiento

\*\*\*Día de la Necropsia

Los resultados de las observaciones clínicas post-enfrentamiento se presentan a continuación en la Tabla 8. Este sumario de resultados incluye observaciones del Comportamiento Anormal, Respiración Anormal, Tos y Diarrea. La Tabla 9 incluye los resultados del Sumario de Incidencia de los Síntomas Clínicos Globales del Grupo y la Tabla 10 incluye los resultados del Sumario de Tasas de Mortalidad del Grupo Post-enfrentamiento. El síntoma clínico más común señalado en este estudio era el comportamiento anormal, el cual se clasificó como letargia de suave a grave. Los cerdos que recibían las 2 dosis más bajas de vORF2, los cerdos que recibían 16 µg de rORF2 y los cerdos que recibían 2 dosis de vacuna KV tenían tasas de incidencia de = 27,3%. Los cerdos que recibían 8 µg de rORF2 y el grupo control estricto negativo no tenían un comportamiento anormal. Ninguno de los cerdos en este estudio mostró respiración anormal. El acceso de tos se observó con frecuencia en todos los grupos (0 a 25%), al igual que la diarrea (0-20%). Ninguno de los síntomas clínicos señalados era patonómico para PMWS.

La incidencia global de los síntomas clínicos varió entre grupos. Los grupos que recibían cualquiera de las vacunas de vORF2, el grupo que recibía 16 µg de rORF2, el grupo que recibía 2 dosis de vacuna KV y el grupo control de enfrentamiento tenían la incidencia más alta de síntomas clínicos globales (≥ 36,4%). El grupo control estricto negativo, el grupo que recibía 8 µg de rORF2 y el grupo que recibía 4 µg de rORF2 tenían tasas de incidencia globales de síntomas clínicos de 0%, 8,3% y 9,1%, respectivamente.

También variaban las tasas de mortalidad global entre grupos. El grupo que recibía 2 dosis de vacuna de KV tenía la tasa de mortalidad más alta (16,7%); mientras que los grupos que recibían 4 µg de vORF2, 16 µg de rORF2 u 8 µg de rORF2 y el grupo control estricto negativo tenían todas las tasas de mortalidad del 0%.

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

Grupo	Tratamiento	N	Comportamiento Anormal <sup>1</sup>	Comportamiento 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%)

ES 2 553 254 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

9	Controles Estrictos Negativos	11	0	0 %
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado				
<sup>1</sup> Número total de cerdos en cada grupo que mostró cualquier síntoma clínico durante al menos un día				

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

Grupo	Tratamiento	N	Muertes Post-enfrentamiento	Tasa de Mortalidad
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	0	0 %
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	0	0 %
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	0	0 %
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	1	9,1 %
7	KV (2 dosis)	12	2	16,7 %
8	Controles de Enfrentamiento	10	1	10 %
9	Controles Estrictos Negativos	11	0	0 %
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado				

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que secretó durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	2	18,2 %
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	1	9,1 %
7	KV (2 dosis)	12	5	41,7 %
8	Controles de Enfrentamiento	10	8	80 %
9	Controles Estrictos Negativos	11	7	63,6 %
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado				

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

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

15 Casi todas las lesiones pulmonares observadas se describieron como rojas/púrpura y se consolidaron.

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

Grupo	Tratamiento	Íctero	Úlceras Gástricas	% Medio de Lesiones Pulmonares	Incidencia de Lesiones Pulmonares Anotadas
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$0,40 \pm 0,50\%$	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	Controles de Enfrentamiento	0/10 (0%)	0/10 (0%)	$9,88 \pm 29,2\%$	8/10 (80%)
9	Controles Estrictos Negativos	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que tenían al menos un tejido positivo para PCV2	Tasa de Incidencia
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	2	16,7 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	3	25,0 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	8	66,7 %
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	4	36,3 %

ES 2 553 254 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Discusión

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

20 De manera interesante, el Grupo 4, que recibió una dosis más alta de antígeno rORF2 que el Grupo 5, no se comportó tan bien ni mejor que el Grupo 5. El Grupo 4 tenía una ADWG ligera menor, una mayor incidencia de comportamiento anormal, una mayor incidencia de síntomas clínicos globales, una mayor tasa de secreción nasal de PCV2, un mayor % medio de lesiones pulmonares y una mayor tasa de tejidos IHC positivos que el Grupo 5. Los análisis estadísticos, que pueden indicar que las diferencias entre estos dos grupos no eran estadísticamente significativas, no se realizaron en estos datos, pero existía una tendencia observada de que el Grupo 4 no se comportaba tan bien como el Grupo 5.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Ejemplo 5

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

10

Tabla 16. Diseño de Estudio General

Grupo	Nº de Cerdos	Tratamiento	Día de Tratamiento	KLH/ICFA el Día 22 y el Día 28	Enfrentamiento con PCV2 Virulento el Día 25	PRRSV MLV el Día 46	Necropsia el Día 50
1	15	Vacuna 1 contra PVC2 16 µg rORF2 – IMS 1314	0 y 14	+	+	+	+
2	15	Vacuna 2 contra PVC2 16 µg vORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
3	15	Vacuna 3 contra PCV2 16 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
4	15	Vacuna 2 contra PCV2 16 µg vORF2 – Carbopol	0	+	+	+	+
5	15	Vacuna 3 contra PVC2 4 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
6	15	Vacuna 3 contra PVC2 1 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
7	15	Vacuna 3 contra PVC2 0,25 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
8	15	Vacuna 4 contra PVC2 > 8,0 log KV – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+

Grupo	Nº de Cerdos	Tratamiento	Día de Tratamiento	KLH/ICFA el Día 22 y el Día 28	Enfrentamiento con PCV2 Virulento el Día 25	PRRSV MLV el Día 46	Necropsia el Día 50
9	15	Controles de Enfrentamiento	N/A	+	+	+	+
10	15	Ninguno - Grupo Control Negativo Estricto	N/A	+	-	+	+

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

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

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

**Materiales y Métodos:**

Este era un estudio de capacidad de enfrentamiento frente a la vacunación parcialmente ciego realizado en cerdos CDCD, de 6 a 16 días de edad el Día 0. Para ser incluidos en el estudio, los títulos IFA de PCV2 de cerdas eran ≤ 1:1000. Adicionalmente, el estado serológico de cerdas procedía de una piara PRRS-negativa conocida. Se sometió a ensayo a dieciseis (16) cerdas en cuanto al estado serológico de PCV2 y las dieciseis (16) tenían un título de PCV2 de ≤ 1000 y fueron transferidas al primer sitio de estudio. Ciento cincuenta (150) cochinitos fueron proporcionados mediante cirugía por sección cesárea y estaban disponibles para este estudio el Día -3. El Día -3, se pesaron 150 cerdos CDCD en el primer sitio de estudio, se identificaron con etiquetas de oreja, se bloquearon por el peso y se asignaron al azar a 1 de 10 grupos, según se recoge antes en la tabla 16. Muestras de sangre fueron tomadas de todos los cerdos. Si cualquier animal de ensayo que cumplía los criterios de inclusión fue enrolado en el estudio y posteriormente fue excluido por cualquier motivo, el Investigador y Monitor consultó con el

## ES 2 553 254 T3

fin de determinar el uso de datos recogidos del animal en el análisis final. Se documentó la fecha en la que se excluyó a los cerdos enrolados y el motivo de la exclusión. No se excluyeron cerdas que cumplieran con los criterios de inclusión, seleccionadas para el estudio y fueron transportadas al primer sitio de estudio. No se excluyeron cochinitos del estudio, y antes de terminar no se retiró del estudio a ningún animal de ensayo. La Tabla 17 describe los intervalos de tiempo para las actividades clave de este Ejemplo.

5

Tabla 17. Actividades de Estudio

Día de Estudio	Fechas Reales	Actividad de Estudio
-3	04-4-03	Cerdos pesados; exam. de salud; distribuidos al azar en grupos; muestras tomadas de sangre
-3 0-21	04-4-03 07-4-03 a 27-5-03	Observados en cuanto a la salud general y en cuanto a sucesos adversos post-vacunación
0	07-4-03	Administrados IVPs respectivos a los Grupos 1-8
0-7	07-4-03 14-4-03	Cerdos observados en cuanto a reacciones en los sitios de inyección
14	21-4-03	Grupos 1-3, 5-8 reforzados con IVPs respectivos; tomadas muestras de sangre de todos los cerdos
14-21	21-4-03 a 28-4-03	Cerdos observados en cuanto a reacciones de inyección
19-21	26-4-03 a 28-4-03	Todos los cerdos tratados con antibióticos
21	28-4-03	Cerdos transportados desde Struve Labs, Inc. a Veterinary Resources, Inc. (VRI)
22-50	28-4-03 a 27-5-03	Cerdos observados en cuanto a síntomas clínicos post-enfrentamiento
22	29-4-03	Grupos 1-10 tratados con KLH/ICFA
25	02-5-03	Muestras de sangre tomadas de todos los cerdos; pesados todos los cerdos; Grupos 1-9 enfrentados con material de enfrentamiento de PCV2
28	05-5-03	Grupos 1-10 tratados con KLH/ICFA
32	09-5-03	Muestras de sangre tomadas de todos los cerdos
46	23-5-03	INGELVAC® PRRS MLV administrado a todos los grupos
50	27-5-03	Muestra tomadas de sangre, pesados y sometidos a necropsia a todos los cerdos; se registraron lesiones burdas; los pulmones se evaluaron en cuanto a lesiones; se guardaron muestras de tejido recientes y fijadas con formalina; se completó la fase viva del estudio

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

10

Los animales fueron alojados en el primer sitio de estudio en jaulas individuales en siete recintos desde el nacimiento hasta aproximadamente 11 días de edad (aproximadamente el Día 0 del estudio). Cada recinto era idéntico en su distribución y consistía en jaulas de acero inoxidable individuales apiladas, siendo suministrado aire

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

15 En el primer sitio de estudio, los cochinitos fueron alimentados con una ración de leche especialmente formulada desde el nacimiento hasta aproximadamente 3 semanas de edad. Todos los cochinitos consumían una ración sólida, especial mixta el Día 21 (aproximadamente 4 ½ semanas de edad). En el segundo sitio de estudio, se alimentó a todos los cerdos con una ración mixta comercial habitual, no medicada, en cuanto a su edad y peso, *ad libitum*. También se disponía *ad libitum* de agua en los dos sitios de estudio.

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

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

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

35 El Día 22 todos los cerdos de ensayo recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x1". El Día 28 todos los cerdos de ensayo recibieron 2,0 mL de KLH/ICFA IM en la zona del jamón derecho utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x1".

40 El Día 25, los cerdos asignados a los Grupos 1-9, recibieron 1,0 mL de material de enfrentamiento ISUVDL de PCV2 (3,98 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL), IM en la zona derecha del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x 1". Se administró 1,0 mL adicional del mismo material, IN a cada cerdo (0,5 mL por fosa nasal) utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una cánula nasal.

El Día 46 todos los cerdos de ensayo recibieron 2,0 mL de INGELVAC® PRRS MLV, IM, en la zona derecha del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x1". El PRRSV MLV fue administrado en un intento de aumentar la virulencia del material de enfrentamiento a PCV2.

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

55 Con el fin de determinar la serología de PCV2, sangre entera venosa se recogió de cada cochinito del seno venoso orbital los Días -3 y 14. Para cada cochinito, la sangre se tomó del seno venoso orbital insertando un tubo capilar estéril en el canto medial de uno de los ojos y drenando aproximadamente 3,0 mL de sangre entera en un Tubo Separador de Suero (SST) de 4,0 mL. Los Días 25, 32 y 50 se tomó sangre entera venosa de cada cerdo de la vena cava anterior utilizando una aguja estéril 20g x 1 ½" Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes,

Nueva Jersey), un soporte de aguja Vacutainer® y un SST de 13 mL. Las tomas de sangre en cada instante se registraron en el Registro de Toma de Muestras. Se dejó que se coagulara la sangre en cada SST, cada SST fue centrifugado y se recolectó el suero. El suero recolectado fue transferido a un tubo con tapón de cierre rápido estéril y se almacenó a  $-70 \pm 10^\circ \text{C}$  hasta que se sometió a ensayo con posterioridad. Las muestras de suero fueron sometidas a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos de PCV2 por parte del personal de BIVI-R&D.

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

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

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

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

#### Resultados

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	ADWG kg/día (Día 25 a Día 50) o ajustada para cerdos muertos antes del Día 50
1	rORF2 - $16 \mu\text{g}$ – IMS 1314 2 dosis	14	$0,48 \pm 0,14 \text{ kg/día}$
2	vORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	$0,50 \pm 0,07 \text{ kg/día}$
3	rORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	$0,48 \pm 0,09 \text{ kg/día}$
4	vORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 1 dosis	15	$0,52 \pm 0,12 \text{ kg/día}$
5	rORF2 – $4 \mu\text{g}$ – Carbopol 1 dosis	15	$0,48 \pm 0,12 \text{ kg/día}$

ES 2 553 254 T3

6	rORF2 – 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,50 ± 0,12 kg/día
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,45 ± 0,20 kg/día
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	0,42 ± 0,15 kg/día
9	Controles de Enfrentamiento	14	0,36 ± 0,13 kg/día
10	Controles Estrictos Negativos	15	0,48 ± 0,10 kg/día

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

5 Los resultados de la serología de PCV2 se presentan a continuación en la Tabla 19. Todos los diez (10) grupos eran seronegativos para PCV2 el Día -3. El Día 14, los títulos de PCV2 seguían bajos para los diez (10) grupos (intervalo de 50-113). El Día 25, el Grupo 8, que recibía la vacuna de virus matado de células completas tenía el título de PCV2 más alto (4617), seguido del Grupo 2, que recibía 16 µg de vORF2 – Carbopol, el Grupo 4, que recibía como dosis única 16 µg de vORF2 – Carbopol, y el Grupo 3, que recibía 16 µg de rORF2 – Carbopol, que tenían títulos de 2507, 1920 y 1503, respectivamente. El Día 32 (una semana post enfrentamiento), los títulos para los Grupos 1-6 y el Grupo 8 oscilaban entre 2360 y 7619; mientras que los Grupos 7 (0,25 µg de rORF2 – Carbopol), 9 (Control de Enfrentamiento) y 10 (control estricto negativo) tenía títulos de 382, 129 y 78, respectivamente. El Día 50 (día de la necropsia), los diez (10) grupos mostró altos títulos de PCV2 (= 1257).

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

Tabla 19. Sumario del Grupo de Títulos IFA de PCV2

Grupo	Tratamiento	Día -3	Día 14**	Día 25***	Día 32	Día 50****
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	50	64	646	3326	4314
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 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	Controles de Enfrentamiento	50	53	50	129	4288
10	Controles Estrictos Negativos	50	50	50	78	11205

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

\*Para fines de cálculo, un título IFA  $\leq 100$  se designó como un título de "50"; un título IFA  $\geq 6400$  se designó como un título de "12.800".

\*\*Día de Enfrentamiento

\*\*\*Día de la Necropsia

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

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Comportamiento Anormal <sup>1</sup>	Comportamiento Anormal <sup>2</sup>	Tos <sup>3</sup>
1	rORF2 - 16 $\mu\text{g}$ – IMS 1314 2 dosis	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7,1 %)
2	vORF2 – 16 $\mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2 – 16 $\mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)
4	vORF2 – 16 $\mu\text{g}$ – Carbopol 1 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2 - 4 $\mu\text{g}$ – Carbopol 1 dosis	15	1/15 (6,7 %)	1/15 (6,7 %)	0/15 (0%)
6	rORF2 - 1 $\mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)
7	rORF2 – 0,25 $\mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)	1/15 (0,67 %)
8	KV $> 8,0 \log$ – Carbopol 2 dosis	15	1/15 (6,7 %)	1/15 (6,7 %)	0/15 (0%)
9	Controles de Enfrentamiento	14	1/14 (7,1 %)	1/14 (7,1 %)	2/14 (14/3%)
10	Controles Estrictos Negativos	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

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

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con Síntomas Clínicos <sup>1</sup>	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	1	7,1 %
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	0	0,0 %
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 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	Controles de Enfrentamiento	14	2	14,3 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	0	0,0 %

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Muertes Post-enfrentamiento	Tasa de Mortalidad
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	0	0,0 %
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	1	6,7 %
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 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 %

## ES 2 553 254 T3

8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
9	Controles de Enfrentamiento	14	2	14,3 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	0	0,0 %
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado				

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

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

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que secretó durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - $16 \mu\text{g}$ – IMS 1314 2 dosis	15	0	0 %
2	vORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
3	rORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
4	vORF2 – $16 \mu\text{g}$ – Carbopol 1 dosis	15	2	13,3 %
5	rORF2 - $4 \mu\text{g}$ – Carbopol 1 dosis	15	3	20,0 %
6	rORF2 - $1 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	6	40,0 %
7	rORF2 – $0,25 \mu\text{g}$ – Carbopol 2 dosis	15	7	46,7 %
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	12	80 %
9	Controles de Enfrentamiento	14	14	100,0 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	14	93,3 %
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado				

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que secretó durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - 16 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	Controles de Enfrentamiento	14	14	100,0 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	14	93,3 %

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

10 Discusión

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

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

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

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

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

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

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

Lesiones burdas en cerdos con PMWS secundaria a la infección por PCV2 consistía típicamente en linfadenopatía generalizada en combinación con uno o más de lo siguiente: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis. En la necropsia (Día 50), no se observó en ninguno de los grupos íctero, hepatitis ni nefritis. Una úlcera gástrica fue observada en un cerdo del Grupo 7, pero no se examinó específicamente una linfadenopatía. En base a la presencia de lesiones que eran consistentes con una infección por PCV2, tres grupos tenían al menos un cerdo diagnosticado tentativamente con PCV2 (PMWS). El Grupo 8, que recibía dos dosis de vacuna matada, tenía un 20% diagnosticado tentativamente con PCV2, mientras que el Grupo 7 y el Grupo 4 tenían 13,3% y 6,7%, respectivamente, diagnosticado tentativamente con PCV2. El % medio de puntuaciones de lesiones pulmonares variaba entre grupos en la necropsia. Los Grupos 1, 2, 3, 4, 6 y 10 tenían un bajo % de puntuación de lesiones pulmonares que oscilaba entre  $0,11 \pm 0,38\%$  y  $0,90 \pm 0,15\%$ . Como era de esperar, el Grupo 9, el grupo control de enfrentamiento tenía el % medio más alto de puntuaciones de lesiones pulmonares ( $10,81 \pm 23,27\%$ ). En los cuatro grupos, el % medio de puntuaciones de lesiones pulmonares se elevó debido a uno hasta tres cerdos en cada uno

de estos grupos que tenían puntuaciones muy altas de lesiones pulmonares. Las lesiones pulmonares eran rojas/púrpura y estaban consolidadas. Típicamente, las lesiones pulmonares asociadas con PMWS se describen como de color canela y no colapsables con edema interlobular. Las lesiones pulmonares observadas en este estudio no se asociaron con una infección por PCV2 o puede estar presente un segundo agente infeccioso pulmonar. Dentro del contexto de este estudio, el % de puntuación de lesiones pulmonares no reflejan, probablemente, una medida verdadera de la cantidad de infección pulmonar debida a PCV2. De igual manera, también se puede haber sobre-utilizado un diagnóstico tentativo de neumonía. Cualquier cerdo con lesiones pulmonares, algunas tan pequeñas como del 0,10%, fueron listados con un diagnóstico tentativo de neumonía. En este ejemplo no había diferencia suficiente entre grupos con respecto a lesiones burdas y el % de lesiones pulmonares en las que basar la eficacia de la vacuna.

Los resultados de IHC mostraron las mayores diferencias entre grupos. El Grupo 1 (16 µg de rORF2 – IMS 1314) tenía los resultados IHC positivos más bajos para el antígeno de PCV2 (0%); mientras que los Grupos 9 y 10 tenían los resultados IHC positivos más altos con tasas de incidencia de 100% y 93,3%, respectivamente. Los Grupos 3, 5, 6 y 7, que recibían 16, 4, 1 ó 0.25 µg de antígeno rORF2, respectivamente, adyuvados con Carbopol, tenían tasas IHC positivas de 20%, 20%, 40% y 46,7%, respectivamente. El Grupo 2, que recibía dos dosis de 16 µg de vORF2 adyuvado con Carbopol tenía una tasa IHC positiva de 6,7%, mientras que el Grupo 4, que recibía solamente una dosis de la misma vacuna, tenía una tasa IHC positiva de 13,3%. Debido a la naturaleza objetiva de este ensayo y al hecho de que los resultados de IHC se correlacionaban con los resultados esperados, el ensayo de IHC es probablemente uno de los mejores parámetros en los que basar la eficacia de la vacuna.

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

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

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

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

La descripción comprende, además:

Un método (I.) para reducir o disminuir la gravedad de síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2, para disminuir la carga global de circovirus porcino de un animal y/o para reducir el efecto inmunosupresor de una infección por circovirus porcino en cerdos, que comprende administrar un antígeno de circovirus porcino tipo 2 a un cerdo, y en el que dicho antígeno, en particular, comprende una proteína codificada por una secuencia de ADN que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia con ORF2 de un virus circovirus porcino tipo 2.

- En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicho antígeno de circovirus porcino tipo 2 es, en particular, un antígeno de ORF2 expresado en baculovirus recombinante, y/o dicho antígeno de circovirus porcino tipo 2 se formula y administra, en particular, en un (1) mL por dosis.
- 5 En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dichos síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en linfadenopatía, agotamiento linfóide e histiocitos multinucleados o gigantes, y en el que dicha linfadenopatía, agotamiento linfóide y/o histiocitos multinucleados o gigantes se dan, en particular, en combinación con otro síntoma seleccionado del grupo que consiste en neumonía intersticial con edema interlobular, palidez cutánea o íctero, hígados atróficos moteados, úlceras gástricas, nefritis, lesiones similares a Pia y trastornos reproductores.
- 10 En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicha administración, en particular, se produce en cerdos de menos de 15 semanas de edad, y/o dicha administración se produce en cerdos no mayores de 3 semanas de edad, preferiblemente no mayores de 2 semanas de edad.
- 15 En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicha administración se produce, en particular, en el espacio de aproximadamente 3 semanas de exposición a un antígeno de circovirus porcino tipo 2 virulento.
- En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicha composición comprende, en particular, además, al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos aceptables en veterinaria, vehículos farmacéuticos aceptables y agentes inmunomoduladores.
- 20 En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicha administración se selecciona del grupo que consiste en intradérmica, intratraqueal, intravaginal, intramuscular, intranasal, intravenosa, intravascular, intraarterial, intraperitoneal, oral, intratecal, subcutánea, intracutánea, intracardial, intralobular, intramedular o intrapulmonar, y/o en el que la administración de dicho antígeno de circovirus porcino tipo 2 no muestra sucesos adversos ni reacciones en el sitio de inyección.
- 25 La descripción comprende, además:  
Un método (II.) para mejorar el nivel de resistencia general a enfermedades de cerdos, que comprende administrar un antígeno de circovirus porcino tipo 2 a un cerdo.  
La descripción comprende, además:  
Un procedimiento para la producción de un medicamento para reducir o disminuir la gravedad de síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2, para disminuir la carga global de circovirus porcino de un animal, o para reducir el efecto inmunosupresor de una infección por circovirus porcino, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de obtener un antígeno de circovirus porcino y combinar dicho antígeno con vehículos aceptables en veterinaria, vehículos farmacéuticamente aceptables o agentes inmunomoduladores, en el que dicho antígeno, en particular, comprende un polipéptido codificado por ORF2 de circovirus porcino tipo 2.
- 30
- 35 La descripción comprende, además:  
El uso (I.) de un antígeno de circovirus porcino tipo 2 para la preparación de un medicamento para reducir o disminuir la gravedad de síntomas clínicos asociados con una infección por PCV2, para disminuir la carga global de circovirus porcino de un animal y/o para reducir el efecto inmunosupresor de una infección por circovirus porcino en cerdos, en el que dicho medicamento se administra a un cerdo, en el que dicho antígeno comprende, en particular, una proteína codificada por una secuencia de ADN que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia con ORF2 de un virus circovirus porcino tipo 2.
- 40
- 45 En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicho antígeno de circovirus porcino tipo 2 es, en particular, un antígeno de ORF2 expresado en baculovirus recombinante, y/o dicho antígeno de circovirus porcino tipo 2, en particular, se formula y administra en un (1) mL por dosis.
- 50 En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dichos síntomas clínicos se seleccionan, en particular, del grupo que consiste en linfadenopatía, agotamiento linfóide e histiocitos multinucleados o gigantes, y en donde dicha linfadenopatía, agotamiento linfóide y/o histiocitos multinucleados o gigantes se dan, en particular, en combinación con otro síntoma seleccionado del grupo que consiste en neumonía intersticial con edema interlobular, palidez cutánea o íctero, hígados atróficos moteados, úlceras gástricas, nefritis, lesiones similares a Pia y trastornos reproductores.
- En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicha administración se produce en cerdos de menos de 15 semanas de edad, y/o dicha administración se produce en cerdos no mayores de 3 semanas de edad, preferiblemente no mayores de 2 semanas de edad, y/o dicha administración se produce, en particular, en el espacio de aproximadamente 3 semanas de exposición a un antígeno de circovirus porcino tipo 2 virulento.

## ES 2 553 254 T3

En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicha composición comprende, en particular, además, al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos aceptables en veterinaria, vehículos farmacéuticos aceptables y agentes inmunomoduladores.

- 5 En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas del método (I.), dicha administración se selecciona del grupo que consiste en intradermal, intratraqueal, intravaginal, intramuscular, intranasal, intravenosa, intravascular, intraarterial, intraperitoneal, oral, intratecal, subcutánea, intracutánea, intracardial, intralobal, intramedular o intrapulmonar, y/o la administración de dicho antígeno de circovirus porcino tipo 2 no muestra, en particular, sucesos adversos ni reacciones en el sitio de inyección.

La descripción comprende, además:

- 10 El uso (II.) de un antígeno de circovirus porcino tipo 2 para la preparación de un medicamento para mejorar el nivel de resistencia general a enfermedades de cerdos.

**Listado de secuencias**

<110> Roof, Mike  
 Eichmeyer, Mark  
 Nitzel, Greg  
 5 Schaeffer, Merrill  
 Hayes, Phillip

<120> USO DE UNA COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA DE PCV2 PARA REDUCIR LOS SÍNTOMAS CLÍNICOS  
 EN CERDOS  
 10

<130> 34816-CIP1

<150> Desconocida  
 <151> 30-12-2005  
 15

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20

<220>  
 <223> Esta es una secuencia de Kozak modificada.  
 25

<400> 1

30 ccgccatg 8

<210> 2  
 <211> 6  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Esta es una secuencia Eco R1 recombinante.  
 40

<400> 2

gaattc 6

45

<210> 3  
 <211> 713  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino  
 50

<400> 3

cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60

ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttggg 120

55 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcc tcctccgcac cttcggatat actgtggaga 180

aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240

ttgtcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300

gaaaggtaa ggtgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360

gctccactgc tgtattcta gatgataact ttgaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420

60 acccatatgt aaactactcc tccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc 480

ES 2 553 254 T3

	gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca	540
	aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgggaccac gtaggcctcg	600
	gcactgctt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgatg	660
	tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccactta acctaagt aat	713
5	<210> 4 <211> 713 <212> ADN <213> Circovirus porcino	
10	<400> 4 ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgccc cgcagccatc	60
	ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tegtccacc cgcaccgc taccttga	120
	gaaggaaaaa tggcatctt aacaccgcc tctccgcac cttcgatat actgtcaagg	180
15	ctaccacagt cacaacgccc tctgggagg tggacatgat gagatttaatt attgacgact	240
	ttgtcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc cttgaatac tacagaataa	300
	gaaaggtaa ggtgaattc tggcctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg	360
	gctccactgc tgtattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg	420
	accatattgt aaactactcc tccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc	480
20	gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca	540
	aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgggaccac gtaggcctcg	600
	gcactgctt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgatg	660
	tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccactga acctaagaa ttc	713
25	<210> 5 <211> 233 <212> PRT <213> Circovirus porcino	
30	<400> 5	
	Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg	
	1 5 10 15	
35	Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro	
	20 25 30	
	Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg	
	35 40 45	
40	Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr	
	50 55 60	
45	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	
50	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	

ES 2 553 254 T3

115      120      125  
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
 130      135      140  
 5  
 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  
 10      165      170      175  
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn  
 180      185      190  
 15 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  
 20      210      215      220  
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
 225      230  
 25 <210> 6  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Circovirus porcino  
 <400> 6  
 30 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  
 35      20      25      30  
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35      40      45  
 40 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr  
 50      55      60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val  
 45      65      70      75      80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr  
 85      90      95  
 50 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  
 55 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  
 60 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  
 65      180      185      190  
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp

## ES 2 553 254 T3

	195	200	205					
	Gln Asp Tyr	Asn Ile Arg	Val Thr Met	Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe				
	210	215	220					
5	Asn Leu Lys	Asp Pro Pro	Leu Glu Pro					
	225	230						
	<210> 7							
	<211> 756							
10	<212> ADN							
	<213> Artificial							
	<220>							
15	<223> Esta secuencia procede de circovirus porcino tipo 2, marco de lectura abierto 2, junto con una porción procedente del vector pGEM T-easy.							
	<400> 7							
	gcggccg	cg	gaattcgatc	cgccatgacg	tatccaagga	ggcgttaccg	cagaagaaga	60
	caccgcccc	gcagccatct	tggccagatc	ctccgccgc	gcccctggct	cgccacccc		120
20	cgccaccgct	accgttgag	aaggaaaaat	ggcatctca	acaccgcct	ctccgcacc		180
	ttcggatata	ctgtcaaggc	taccacagtc	acaacgccct	cctggcggt	ggacatgatg		240
	agattaata	ttgacgactt	tggtccccg	ggagggggga	ccaacaaaat	ctctataccc		300
	tttgaatact	acagaataag	aaaggttaag	gttgaattct	ggccctgctc	ccccatcacc		360
	cagggtgata	ggggagtggg	ctccactgct	gttattctag	atgataactt	tgtacaagaag		420
25	gccacagccc	taacctatga	cccatatgta	aactactcct	cccgccatac	aatcccccaa		480
	cccttctct	accactcccg	ttacttca	cccaaacctg	ttcttgactc	caactattgat		540
	tacttcaac	caaataacaa	aaggaatcag	ctttggctga	ggctacaaac	ctctagaat		600
	gtggaccacg	taggcctcgg	cactgcgttc	gaaaacagta	aatacgacca	ggactacaat		660
	atccgtgtaa	ccatgtatgt	acaattcaga	gaatttaatc	ttaaagacct	cccactgaa		720
30	ccctaagaat	tctatcacta	gtgaattcgc	ggccgc				756
	<210> 8							
	<211> 10387							
	<212> ADN							
35	<213> Artificial							
	<220>							
40	<223> Este es el circovirus porcino tipo 2, construcción ORF2, que incluye secuencias codificadoras de baculovirus y pGEM T-easy.							
	<400> 8							
	aagcttact	cgtaaagcga	gttgaaggat	catatttagt	tgcgttatg	agataagatt		60
	gaaagcacgt	gtaaaatgtt	tcccgcgcgt	tggcacaact	atttacaatg	cgccaagtt		120
45	ataaaagatt	ctaactctgat	atgttttaaa	acaccttgc	ggcccagatt	gtttgcgtac		180
	gtgactagcg	aagaagatgt	gtggaccgca	gaacagatag	taaaacaaaa	ccctagtatt		240
	ggagcaataa	tcgattaac	caacacgtct	aatattatg	atggtgtgca	tttttgcgg		300
	gcgggcctgt	tatacaaaaa	aattcaagta	cctggccaga	ctttgccgc	tgaaagcata		360
	gttcaagaat	ttattgacac	ggtaaagaa	ttacagaaa	agtgccccg	catgttggtg		420

# ES 2 553 254 T3

	ggcgtgact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgcag atattaatg	480
	cacaccctgg gattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggcac	540
	aaaattgaaa gacaaaatta cgtcaagat ttattaatt aattaatatt attgcattc	600
	tttaacaaat actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaaacta	660
5	tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttcaa tcgacggtag	720
	gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacgtt gatgttacct ttatgcttt	780
	ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgta	840
	cgcacaacac cggatgtttg cgctgttccg cggggattg aaccgcgcga tccgacaaat	900
	ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgctcttt ttctgcatt atttctctt	960
10	tctttgcat ggtttcctgg aagccgggtg acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg	1020
	tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgccttgat ggcaacgatg cgttcaataa	1080
	actctgttt tttaacaagt tctcgggtt ttgcccacc caccgcttc agcgcgtttg	1140
	tgtgctcggg gaatgvcga atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctcccggt	1200
	gtttgatcgc gggatcgtac ttgccggtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa	1260
15	gccattcttg taattctatg vcgtaaggca atttgactt cataatcagc tgaatcacgc	1320
	cggatttagt aatgagcact gtatgvcgct gcaaatacag cgggtcgcgc cttttcacga	1380
	cgctgttaga ggtagggcc ccaatttga tggctgctc aaataacgat ttgtattat	1440
	tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaaactg ttagcgcagt	1500
	ccttgccac gaaccggacc tgttggctgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat	1560
20	cttctccaaa tttaaattct ccaattttaa vcgagccat ttgatacac gtgtgvcgat	1620
	tttgcaacaa ctattgttt ttacgcacaa ctaaacttat tvtggttagc aataattaa	1680
	tatgggggaa catgvcgccc tacaacactc gtcgttatga acgcagacgg vcgvcgctc	1740
	ggvcgaacgc gctaaaacgt gttgvcgctt caacvcgvcga aacatvcgaa aagccaatag	1800
	tacagtttg attgcatat taacvcgvcgat ttttaaatt atcttatta ataatagtt	1860
25	atgacvccta caactccccg cccvcgvtga ctvcctvcac ctvcagvcagt tcvttgvcgc	1920
	cttctcctgt gttgvcgaac acgtvcgvcg gvtgvtvcgat gaccagvcgc gttvcvcagc	1980
	vcagvcacaa gtatctgtac accgaatgat cvtvcggvcga agvcacvtvcg vcctccaagt	2040
	ggcaatattg gcaaatvcga aaatatatac agttgvtgtt ttgvcvcata tctatvcgtg	2100
	cvttgvtvcgt gtacvtvcga acvtgtatt gcatvcgaac vcgaaattaa tcatvcvcgat	2160
30	tagtvcvcgatt aaaaacvtgt acatvcctvcg ttttaatcat vcvcgtvcgatt aaatvcvcga	2220
	atvcgagvcga gtgatvcgaag tvtggaataa tvttttctt gtattvcvcga gtcaagvcga	2280
	vcvcgvtatt taacaaacta gccatctvtg aagttagttt catttaatvc aactttatcc	2340
	aataatata tvtgtatvcg acvtcaagaa ttaacaatvc gccvcgtvtvc gcatctcaac	2400
	acgactatga tagagatcaa ataaagvcvcg aattaaatag ctvtvcgvcgc aacvtvcagc	2460
35	atctvtvcac gvcgtvcvcg acgagvtttg attgtaataa gtttttacga agvcgatgaca	2520
	tgacccccgt agtvcaacgc atcacvcvca aaagaactvc vcgactacaaa attaccvcgt	2580
	atgtvcvtga cvttaaaact ataaagvcvat ccaatvcgacc gttagtcgaa tvcaggacvc	2640

# ES 2 553 254 T3

	tggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt	2700
	agagcgcat gtttagacaa gaaagctaca tattaattg atccccgatga ttttattgat	2760
	aaattgacct taactccata cacggtattc tacaatggcg gggtttggc caaaatttc	2820
	ggactcgcgat tgcacatgct gtaacggct cgcgccacta ttaatgaaat taaaaattcc	2880
5	aatttataaa aacgcagcaa gagaaacatt tgcataaa aatgcgtaga aggaaagaaa	2940
	aatgctgctg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg	3000
	aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgctc ggcggatgt acaggaagag gttatacta	3060
	aactgttaca ttgcaaacgt ggttcgctg gccaaagtgt aaaaccgatg tttaatcaag	3120
	gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcatcttita	3180
10	atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aatgaaaac tgcgcacaag	3240
	ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta ttgtaatta tgaataata	3300
	aaacaattat aaatgctaaa ttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa	3360
	cattttagt attatctata attgaaaacg cgtagtata atcgtgagg taatattaa	3420
	aatcatttc aaatgattca cagtaattt gcgacaatat aatttattt tcacataaac	3480
15	tagacgcctt gtcgtctct tctcgtatt ccttctctt ttcatcttc tcctcataaa	3540
	aattaacata gttattatcg tatccatata tgcataatc gtagagata aatttttgt	3600
	tgcataaat atatatgtct ttttaattg ggtgtatgt accgctgctc atagttttc	3660
	tgtaattac aacagtgcct tttctggta gttctcggg gtgtgtgct ttaattatta	3720
	aatttatata atcaatgaa ttgggatcgt cggtttggta caatatgtg ccggcatagt	3780
20	acgcagcttc ttctagtcca attacacat ttttagcag caccggatta acataactt	3840
	ccaaaatgtt gtacgaaccg taaacaaaa acagttcacc tccctttct atactattgt	3900
	ctgagcagcag ttgtttgtg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaactaat	3960
	atcacaaact gaaatgtct atcaatata agttgctgat atcatggaga taattaaat	4020
	gataaccatc tcgcaataa ataagtatt tactgtttc gtaacagtt tgaataaaa	4080
25	aaacctataa atattccgga ttattcatal cgtcccacca tcgggcgagg atcagatctg	4140
	cagcggccgc ggaattcga tccgcatga cgtatccaag gaggcgtac cgcagaagaa	4200
	gacaccgccc ccgagccat cttggccaga tctccgccc ccgccctgg ctcgtccacc	4260
	cccgccaccg ctaccgttg agaaggaaaa atggcatct caacaccgc ctctccgca	4320
	cctcggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctctgggag gtggacatga	4380
30	tgagatttaa tattgacgac ttgttccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac	4440
	ccttgaata ctacagaata agaaaggta aggttgaatt ctggccctgc tccccatca	4500
	cccagggtga taggggagtg ggtccactg ctgtattct agatgataac tttgtaaaa	4560
	aggccacagc cctaacctat gacctatag taaactact ccccccat acaatcccc	4620
	aacccttct ctaccactcc cgttactca caccacaaacc tgttctgac tccactattg	4680
35	attactcca accaaataac aaaaggaatc agctttgct gaggctaaa acctctagaa	4740
	atgtggacca cgtaggcctc ggcactgctc tcgaaaacag taaatcagc caggactaca	4800
	atatccgtgt aacctgtat gtacaattca gagaatttaa tctaaagac cccccactg	4860

ES 2 553 254 T3

	aaccctaaga attctatcac tagtgaattc gcggccgccc gccgctccag aattctagaa	4920
	ggtaccgccc atcctttctt gggaccggc aagaaccaa aactcactct ctcaaggaa	4980
	atccgtaatg taaacccga cacgatgaag ctgtcgttg gatggaaagg aaaagagttc	5040
	tacagggaaa ctggaccg ctctatgaa gacagctcc ccattgtaa cgaccaagaa	5100
5	gtgatgatg tttcctgt tgcaacatg cgtcccacta gaccaaccg ttgtacaaa	5160
	ttctggccc aacacgctt gcgtgac cccgactatg tacctatga cgtgattag	5220
	atcgtcagc ctcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcagcct ggtaagaag	5280
	ggcggcgct gcccaataat gaacctcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagttc	5340
	atcgtatg tcatctggga gaactctac aagccatcg ttacatcgg taccgactct	5400
10	gctgaagagg aggaaattct cttgaagt tccctggtg tcaaagtaa ggagttgca	5460
	ccagacgac ctctgtcac tggccggcg tattaaaaca cgatacattg ttattagtag	5520
	attattaag cgctagattc tgtcgtgtg tgattacag acaattgtg tacgtattt	5580
	aataatcat taaattata atcttaggg tggatgta gagcgaat caaatgatt	5640
	tcagcgtct tatactgaa ttaaatatt aaatcccaa tagattgta aataggttt	5700
15	cgattagtt caacaaggg ttgtttcc gaaccgatg ctggactatc taatggatt	5760
	tcgctcaac ccacaaaact tgccaatct ttagcagca atctagctt gtcgatattc	5820
	gtttgttt tttttgta taaaggtcg acgtcgtca aaatattatg cgctttgta	5880
	ttctttcat cactgtcgtt agtgtaaat tgactcagc taaacacgtt aaataaagct	5940
	tggacatatt taacatcggc cgtgttagct ttattagcc gattatcgtc gtcgtccaa	6000
20	ccctcgtcgt tagaagttc tccgaagac gatttgcca tagccacacg acgcctatta	6060
	attgtcgg ctaacacgc cgcgatcaaa ttgtagttg agcttttg aattattct	6120
	gattgccc gttttggc gggttcaat ctaactgtc ccgatttaa ttcagacaac	6180
	acgttagaaa cgatggtgc agcgggtgt aacattcag acgcaaat tactaatggc	6240
	ggcgggtgt gagctgatg taaatctacc atcgggtgag gcgagggc ggctggcggc	6300
25	ggaggcggag gcggaggtg tggcgtgat gcagacggc gtttaggctc aaatgtctct	6360
	ttaggcaaca cagtcggc ctcaactatt gtactggtt cggcgccgt tttggttg	6420
	accggtctga gacgagtcg attttttcg ttctaatag ctccaacaa ttgtgtctg	6480
	tcgtctaaag gtcagcggg ttgaggtcc gtcggcattg gtggagcgg cggaattca	6540
	gacatcgtg gtggtgtg tggggagc gctggaatg taggcacggg agaaggtgt	6600
30	ggcggcggc cgcgggtat aattgttct ggttagttt gttcgcgac gattgtggc	6660
	accggcgcag gcgcccgtg ctgcacaac gaaggctgc tgctcagag cagcgttg	6720
	ggtgtggca attcaatatt ataattgaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt	6780
	gtaattcgc tatcgttac cgtgccgata ttaacaacc gctcaatgta agcaattgta	6840
	ttgtaaagag attgtctcaa gctcggcga cggcgataac aagcctttc attttacta	6900
35	cagcattgta gtggcagac actcgtctg cgtcagcga catgtatgct ttgtgtcaa	6960
	aaacgtcgtt ggcaagctt aaaatatta aaagaacatc tctgtcagc accactgtg	7020
	tgctgtaaat gttgtttt ataattgag ctccgcagt atcgacagc tcaaaaaatt	7080

ES 2 553 254 T3

	gatgcgcatc aattttgtg ttcctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc	7140
	tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgctgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa	7200
	actgcaaaaa cgcaaaaact cggataaaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta	7260
	tttatcgca caagcccact agcaaattgt attgcagaa aacaattcg gcgcacaatt	7320
5	ttaacgctga cgaaataaaa gtcaccagt taatgagcga ccacccaaat ttataaaaa	7380
	tctatftaa tcacggttcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc	7440
	ccgatttatt tgaaacacta caaattaaag gcgagcttc gtaccaactt gttagcaata	7500
	ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg attgcacaa gcacaattc atacacaacg	7560
	acataaaaact cgaaaatgc ttatatttcg aagcactga tgcggtgat gtttgcgatt	7620
10	acggattgtg caaacacgaa aactcacta gcgtgcacga cggcacgttg gagtatttta	7680
	gtccggaaaa aattcgacac acaactatgc acgttctgtg tgactggtag cggcgtgtt	7740
	aacatacaag ttgctaactg aatcatggc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc	7800
	gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta	7860
	atgagtgagc taactcacat taattgctgt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa	7920
15	cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat	7980
	tgggcgtct tccgcttct cgctcactga ctcgctgcgc tggctgttc ggctgcggcg	8040
	agcggatca gctcactcaa aggcgtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc	8100
	aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt	8160
	gctggcgttt ttcataggc tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag	8220
20	tcagagggtg cgaaaccega caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc	8280
	cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc	8340
	ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt	8400
	cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagacc gctgcgcctt	8460
	atccggtaac tatcgtctg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc	8520
25	agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttctgaa	8580
	gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgtgaa	8640
	gccagttacc ttcgaaaaa gagttgtag ctctgtatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg	8700
	tagcggtagt tttttgtt gcaagcagca gattacgagc agaaaaaag gatctcaaga	8760
	agatccttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg	8820
30	gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg	8880
	aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaactgg tctgacagtt accaatgctt	8940
	aatcagtgag gcacctatct cagcgtatct tctatttct tcatccatag ttgcctgact	9000
	ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat	9060
	gataccgca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg	9120
35	aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac ttatccgcc tccatccagt ctattaattg	9180
	ttgccgggaa gctagagtaa gtagtccgc agttaatagt ttgcgcaacg ttgtgcat	9240
	tgctacaggc atcgtggtg cagcctcgc gtttgtagt gcttcattca gctccggtc	9300

ES 2 553 254 T3

	ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgtgtgc aaaaagcgg ttagtcctt	9360
	cggctctcg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttactactca tggttatgc	9420
	agcactgcat aattctcta ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttctg tgactggta	9480
	gtactcaacc aagtcattt gagaatagtg tatgcccga cggagtgct ctgcccggc	9540
5	gtcaatcgg gataatccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa	9600
	acgttctcg gggcgaaaac tcacaaggat ctaccgctg ttgagatcca gttcgtgta	9660
	accactcgt gcaccaact gatcttcagc atctttact ttcaccagcg ttctgggtg	9720
	agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaatgttg	9780
	aatactcata ctctcctt ttcaatatta tgaagcatt tatcagggtt attgtctcat	9840
10	gagcggatc atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt	9900
	tccccgaaaa gtgccactg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctata	9960
	aaataggcgt atcacgaggc ccttctgtct cgcgcgttc ggtgatgacg gtgaaaacct	10020
	ctgacacatg cagctcccgg agacggcac agctgtctg taagcggatg cggggagcag	10080
	acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtg tggcgggtg cggggctggc ttaactatgc	10140
15	ggcatcagag cagattgtac tgagagtga ccatatcgg tgtaaatac cgcacagatg	10200
	cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga	10260
	agggcgatcg gtgcgggcct ctcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc	10320
	aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt tcccagtcga cgacgttgta aaacgacggc	10380
	cagtgcc	10387
20	<210> 9 <211> 20 <212> PRT <213> Circovirus porcino	
25	<400> 9	
	Ser Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His His Pro Pro Ser	
	1 5 10 15	
30	His Leu Gly Gln	
	20	
	<210> 10 <211> 19 <212> PRT <213> Circovirus porcino	
35	<400> 10	
40	Pro Arg His His Tyr Arg Pro Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr	
	1 5 10 15	
	Thr Leu Ser	
45	<210> 11 <211> 233 <212> PRT <213> Artificial	
50		

# ES 2 553 254 T3

<220>

<223> Esta es una secuencia de aminoácidos para el circovirus porcino tipo 2, marco de lectura abierto 2.

5 <400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

35 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

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

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

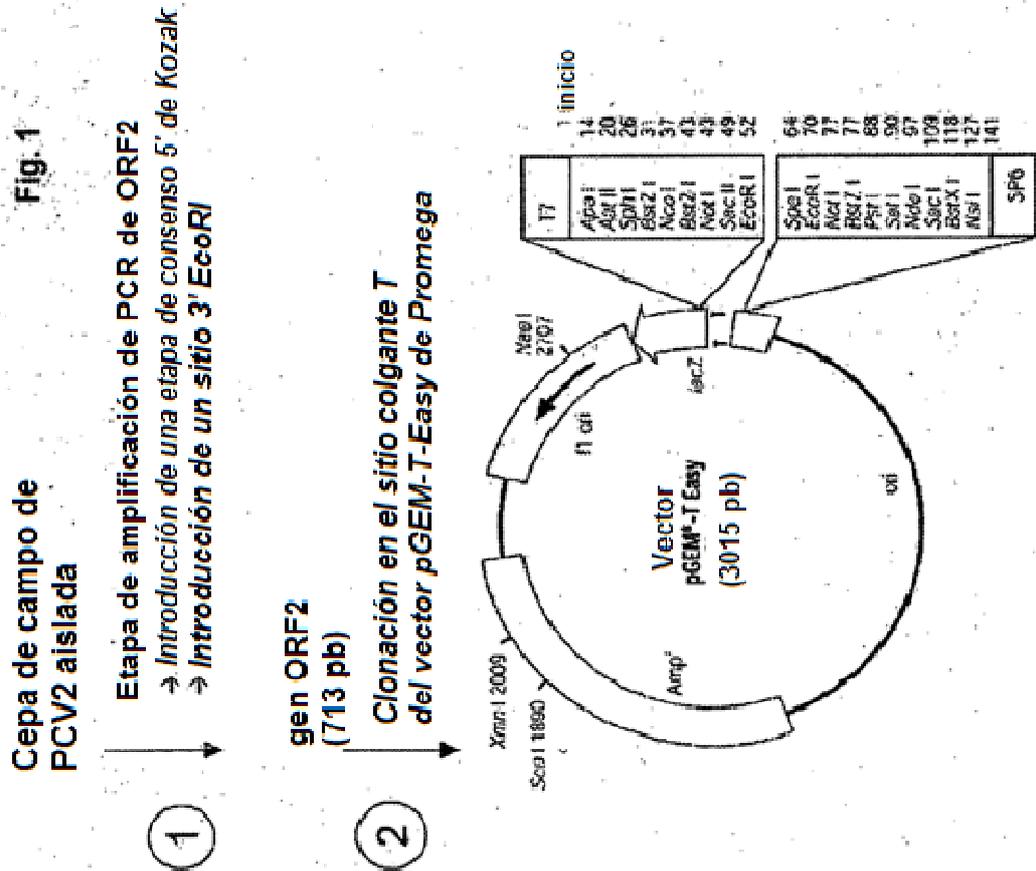
45 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
210 215 220

50 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
225 230

## REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica capaz de provocar o reforzar una respuesta inmune contra PCV2 y que comprende proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante, para uso en la prevención de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos:
- 5 (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis, en donde la proteína ORF2 de PCV2 se ha de administrar una vez a cerdos.
2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante es proteína ORF2 de PCV2 expresada en baculovirus.
- 10 3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante ha sido obtenida por un método en el que
- células susceptibles son infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2,
- 15 - el polipéptido ORF2 de PCV2 es expresado por el baculovirus recombinante, y
- el polipéptido ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración y se inactiva.
4. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante ha sido recuperada del sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, en donde dichas células fueron
- 20 infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2, y en donde dicho cultivo celular fue tratado con BEI aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM para inactivar el vector de baculovirus, y una concentración equivalente de un agente de neutralización.
5. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, al menos una parte de vector de
- 25 baculovirus recombinante que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2.
6. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5 para uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende, además, una parte de sobrenadante del cultivo celular.
7. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso de acuerdo con una cualquiera de 1 a 6, en donde la composición inmunogénica es una vacuna.
- 30 8. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende de aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 200 µg de la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante por dosis.
9. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde los cerdos son cerdos de 2 semanas de edad o
- 35 mayores, pero no mayores que 15 semanas de edad.
10. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición inmunogénica comprende, además, un adyuvante.
- 40 11. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 10 para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el adyuvante puede incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua o en donde el adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico, y los copolímeros de anhídrido maleico y un derivado de alqueno.
- 45 12. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 para uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprende 100 µg a 10 mg de adyuvante por dosis.
13. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición inmunogénica está sustancialmente exenta de antígenos o polipéptidos de PCV2 que no sean la proteína ORF2 de PCV2.
- 50 14. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4 para uso de acuerdo con la reivindicación 4 y que comprende, además, un adyuvante listado en la reivindicación 11, en donde la composición inmunogénica es estable a lo largo de un período de 24 meses.

15. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el medicamento se ha de administrar por vía intramuscular.
- 5 16. Uso de una composición inmunogénica capaz de provocar o reforzar una respuesta inmune contra PCV2 y que comprende proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante, en la fabricación de un medicamento para la prevención de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos:
- (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis, en donde la proteína ORF2 de PCV2 se ha de administrar una vez a cerdos.
- 10 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante es proteína ORF2 de PCV2 expresada en baculovirus.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante ha sido obtenida por un método en el que
- 15 - células susceptibles son infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2,
- el polipéptido ORF2 de PCV2 es expresado por el baculovirus recombinante, y
- el polipéptido ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración y se inactiva.
- 20 19. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante ha sido recuperada del sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, en donde dichas células fueron infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 y que expresa proteína ORF2 de PCV2, y en donde dicho cultivo celular fue tratado con BEI aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM para inactivar el vector de baculovirus, y una concentración equivalente de un agente de neutralización.
- 25 20. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, que comprende, además, al menos una parte de vector de baculovirus recombinante que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2.
21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende, además, una parte de sobrenadante del cultivo celular.
22. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en donde la composición inmunogénica es una vacuna.
- 30 23. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, que comprende de aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 200 µg de la proteína ORF2 de PCV2 producida de forma recombinante por dosis.
24. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en donde los cerdos son cerdos de 2 semanas de edad o mayores, pero no mayores que 15 semanas de edad.
- 35 25. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en donde la composición inmunogénica comprende, además, un adyuvante.
26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el adyuvante puede incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua o en donde el adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico, y los copolímeros de anhídrido maleico y un derivado de alqueno.
- 40 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, que comprende 100 µg a 10 mg de adyuvante por dosis.
28. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 27, en donde la composición inmunogénica está sustancialmente exenta de antígenos o polipéptidos de PCV2 que no sean la proteína ORF2 de PCV2.
29. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la composición inmunogénica comprende, además, un adyuvante listado en la reivindicación 26 y es estable a lo largo de un período de 24 meses.
- 45 30. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 29, en donde el medicamento se ha de administrar por vía intramuscular.



**Fig. 1**  
**Cont.**

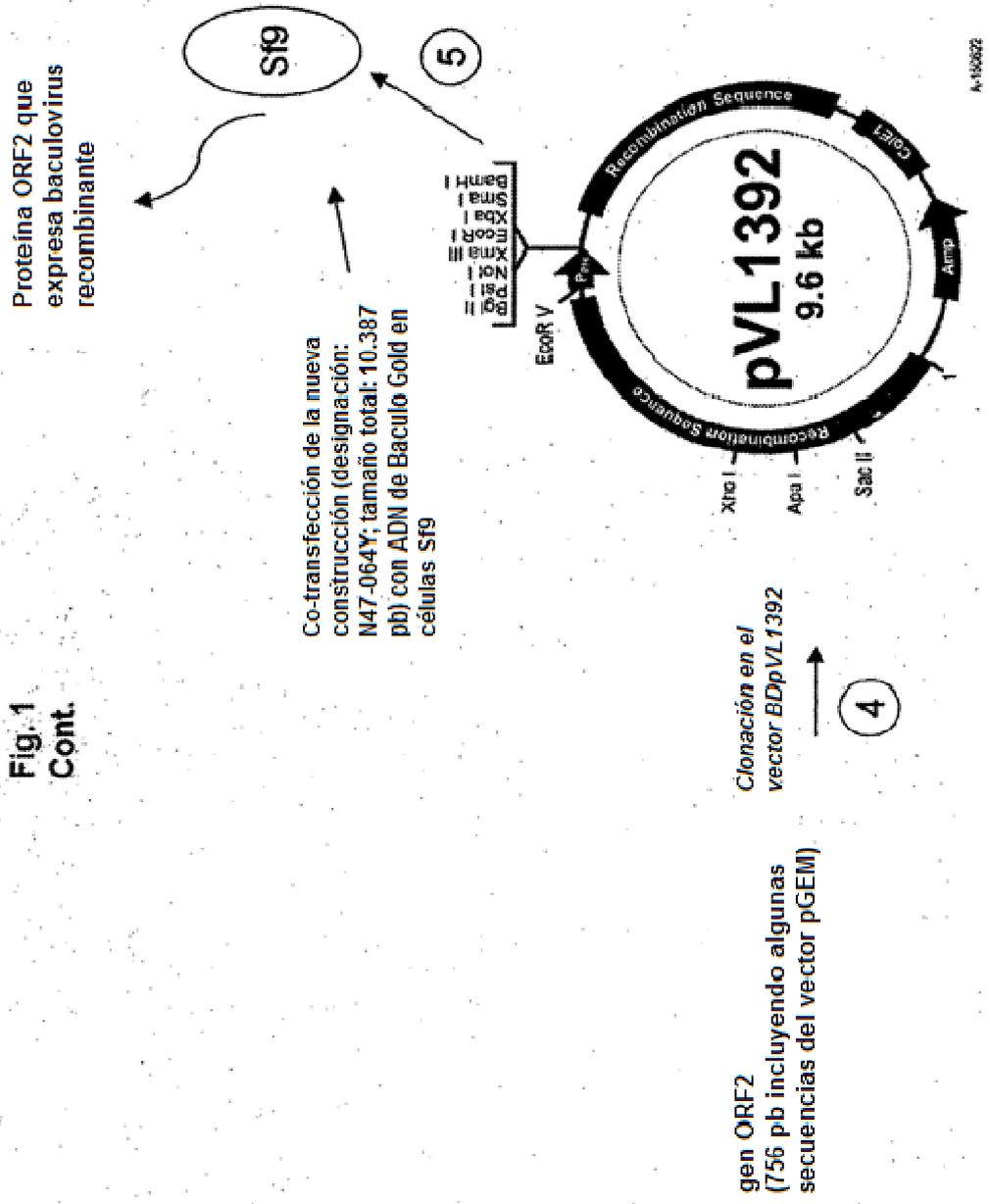


FIG. 2(a)

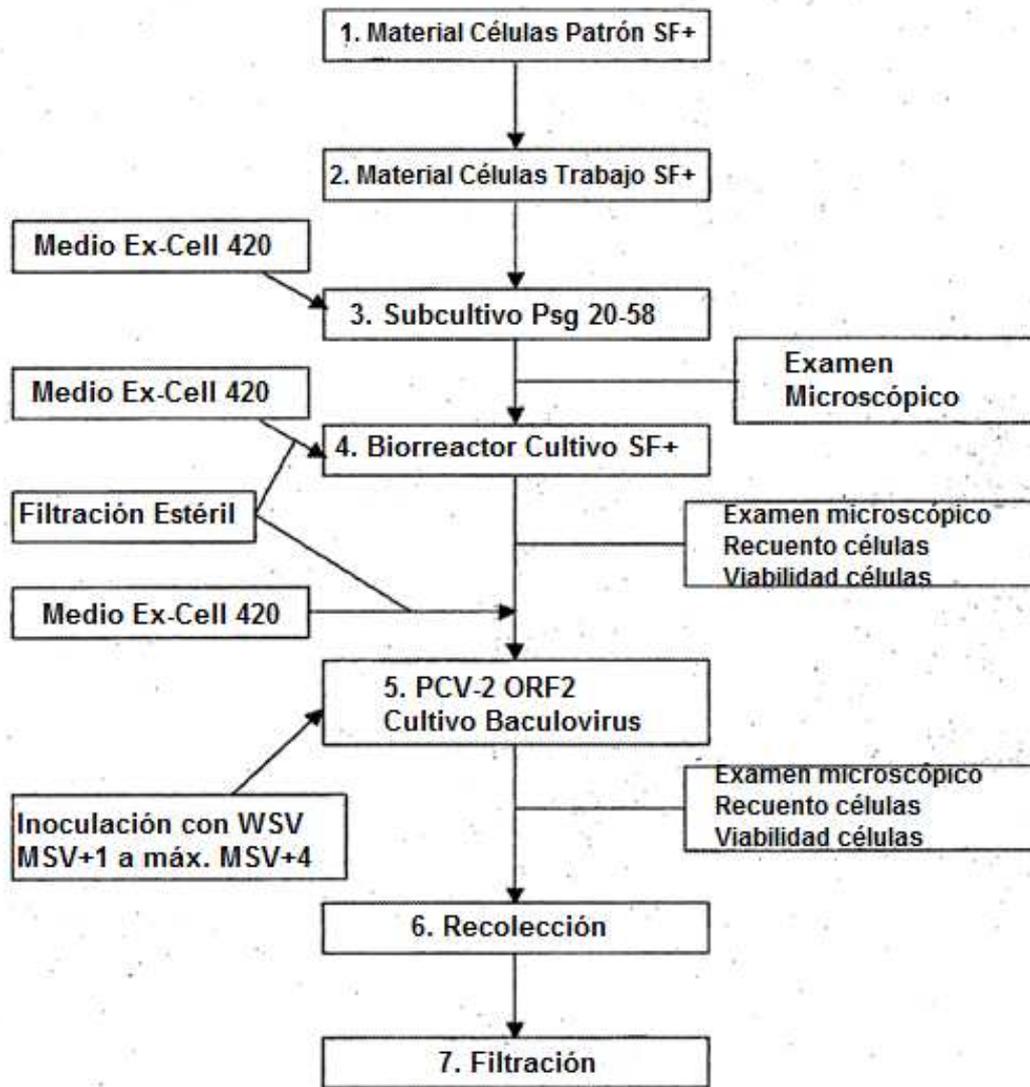


FIG. 2(b)

