(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 625 460**

(51) Int. CI.:

A61K 39/12 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2007 PCT/US2007/087628**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2008 WO08076915**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2007 E 07869309 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2094872**

(54) Título: **Tratamiento de cerdos seropositivos en anticuerpo anti-PCV2 con antígeno PCV2**

(30) Prioridad:

15.12.2006 US 870311 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Tratamiento de cerdos seropositivos en anticuerpo anti-PCV2 con antígeno PCV2

Listado de secuencias

Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato papel y en formato legible por ordenador, cuyas enseñanzas y contenido se incorporan por la presente por referencia. El listado de secuencias es idéntico al incorporado en WO06/072065.

Antecedentes de la invención

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a la utilización de una composición inmunogénica que comprende un antígeno circovirus porcino tipo 2 (PCV2) para la prevención y tratamiento de varias manifestaciones clínicas (enfermedades) en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2 específicos. Preferiblemente, los anticuerpos anti-PCV-2 específicos son anticuerpos maternos.

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 secuencia de aproximadamente el 80% con el circovirus porcino tipo 1 (PCV1). Sin embargo, a diferencia de PCV1 que generalmente no es virulento, la infección de cerdos con PCV2 se ha asociado recientemente con varios síndromes patológicos que se han denominado colectivamente Enfermedades asociadas con el Circovirus Porcino (PCVAD) (también denominadas Enfermedades del Circovirus Porcino (PCVD)) (Allan et al, 2006, IPVS Congress). El Síndrome Multisistémico de Desmedro Post-desdete (PMWS) se considera generalmente como la manifestación clínica más importante de PCVAD. (Harding et al., 1997, Swine Health Prod; 5: 201-203; Kennedy et al., 2000, J Comp Pathol; 122: 9-24). El PMWS afecta a cerdos de entre 5-18 semanas de edad. Clínicamente, el PMWS se caracteriza por un adelgazamiento, palidez de la piel, un desarrollo poco vigoroso, dificultad respiratoria, diarrea, icterus e ictericia. En algunos cerdos afectados, resultará evidente una combinación de todos los síntomas, mientras que otros cerdos afectados solamente tendrán uno o dos de estos síntomas. (Muirhead, 2002, Vet. Rec.; 150: 456) 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. (Allan y Ellis, 2000; J Vet. Diagn. Invest., 12: 3-14). Se ha observado una fuerte correlación entre la cantidad de ácidos nucleicos o antígenos PCV2 y la gravedad de las lesiones linfoides microscópicas. Las tasas de mortalidad para cerdos infectados con PCV2 pueden aproximarse al 80%. Además del PMWS, PCV2 se ha asociado con varias infecciones más, incluyendo pseudorrabia, síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis post-destete, hepatosis dietética y bronconeumonía supurativa. Sin embargo, la investigación llevada a cabo hasta ahora no ha confirmado si alguno de estos síntomas son, 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 métodos para tratar las infecciones por PCV2 basados en una vacuna de ADN se describen en la Patente de EEUU No. 6.703.023. En el documento WO03/049703 se describe la producción de una vacuna quimérica viva, que comprende un núcleo de PCV-1 en el que un gen inmunogénico de una cepa patógena de PCV2 reemplaza un gen del núcleo de PCV-1. El documento WO99/18214 ha proporcionado varias cepas de PCV2 y procedimientos para la preparación de una vacuna muerta de PVC2. Sin embargo, no se ha mostrado ningun dato de eficacia. Una vacuna de subunidades eficaz basada en ORF-2 se ha mostrado en WO06/072065 y en WO2007/028823. Se pretende que estas dos vacunas se utilicen para la vacunación/tratamiento de cerdos o cerdos mayores de 3 semanas de edad. Ninguna de estas vacunas se ha descrito para utilizarse en lechones jóvenes, menores de 3 ó 2 semanas de edad.

Se ha mostrado que la inmunidad procedente de la madre confiere un determinado grado de protección frente a la infección por PCV2 y a las enfermedades clínicas asociadas con las infecciones por PCV2. Se ha mostrado que esta protección es dependiente de la titulación: las titulaciones más altas son protectoras generalmente mientras que las titulaciones más bajas no lo son (McKeown et al., 2005; Clin. Diagn. Lab. Immunol.; 12: 1347-1351). Se ha estimado que la vida media media del anticuerpo en animales destetados es 19,0 días y la ventana para la degradación del anticuerpo pasivo de PCV2 en una población es relativamente amplia (Opriessnig et al. 2004, J. Swine Health Prod. 12:186-191). Se vio que titulaciones bajas de los anticuerpos de PCV2 adquiridos pasivamente presentes a los 10-12 días de edad se degradaban aproximadamente a las 4,9 + 1,2 semanas de edad, se vio que niveles moderados de anticuerpos se degradaban aproximadamente a las 8,1+1,9 semanas de edad y se vio que niveles altos de anticuerpos se degradaban aproximadamente a las 11,1+2,5 semanas de edad (Opriessnig et al., 2006, 37th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians). Con una correlación oportuna con la disminución de la titulación del anticuerpo se produce la aparición de los primeros signos clínicos de PCVAD que se produce cuando los lechones tienen aproximadamente 5 y 12 semanas de edad (Allan et al, 2000, Vet. Diagn. Investigation, 12: 3-14). Además, PCV2 también se ha aislado a partir de nódulos linfáticos de lechones neonatales (Hirai et al, 2001, Vet. Record; 148:482-484) lo que indica que los lechones aún más jóvenes pueden estar afectados con PCVAD en

ausencia de titulaciones protectoras de anticuerpo maternal. La correlación obvia entre la titulación de anticuerpo y la protección se ha probado en un estudio Español de Campo: Los cerdos con titulaciones bajas de anticuerpo a las 7 semanas de edad (titulación media de anticuerpo 1:100, intervalo 0 a 1:320) tenían una proporción de mortalidad significativamente mayor en las 5 semanas siguientes que los animales con titulaciones más altas de anticuerpo (Rodriguez-Arrioja et al., 2002, Am. J Vet. Res. 63:354-357).

La presencia de anticuerpo procedente de la madre no sólo puede conferir un determinado grado de protección frente a infecciones virales, que, sin embargo, no se puede predecir, sino que también se sabe que disminuye la eficacia de la inmunización. Por ejemplo, titulaciones altas de anticuerpos procedentes de la madre frente al virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) inhiben tanto la respuesta inmune mediada por células como la humoral a una vacuna de CSFV, sin embargo titulaciones más bajas no tienen una influencia significativa (Suradhat y Damrongwatanapokin, 2003, Vet. Microbiol; 92: 187-194). También se ha predicho para las vacunas vivas de PCV2 que funcionarán más eficazmente cuando se administran a lechones mayores de 7 u 8 semanas de edad, ya que la mayor parte de los anticuerpos maternos se han degradado en ese momento. La interferencia de los anticuerpos maternos está influida por el tipo de respuesta inmune incitada (Th1 frente a Th2) que depende (entre otras cosas) del tipo de vacuna, tipo de antígeno, tipo de adyuvante así como de la cantidad de antígeno administrada. Consecuentemente, la posible interferencia de los anticuerpos maternos puede ser diferente según las vacunas incluso si éstas protegen frente al mismo patógeno. En resumen, los anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre pueden conferir un determinado grado de protección frente a PCV2, pero, por otra parte, estos anticuerpos pueden disminuir la eficacia de cualquier vacuna de PCV2.

La protección de los animales mediante inmunización activa es más complicada por el hecho de que a) el momento en el que se produce la degradación de los anticuerpos procedentes de la madre (MDA) varía de un animal a otro y b) muchas enfermedades se producen poco después de la degradación de los anticuerpos. Para afrontar este problema varias estrategias de vacunación prevén un régimen de vacunación de dos administraciones para animales jóvenes: La primera vacunación se administra a una edad temprana con el fin de proteger a aquellos animales con MDA bajo. Se acepta que esta primera vacunación puede no ser eficaz en animales con titulaciones altas de MDA debido a una interferencia con el antígeno de la vacuna. Con el fin de proteger también a estos animales, se requiere una segunda vacunación, cuando se piense que hayan disminuido los niveles altos de MDA. Esta clase de esquema de vacunación se utiliza para muchas vacunas pequeñas de animales (frente a, por ejemplo, parvovirosis canina, hepatitis canina), vacunas equinas (frente a, por ejemplo, vacunas de influenza equina) y vacunas porcinas (frente a, por ejemplo, *Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis*). Debido a que la aparición de PCVAD en animales de 5 semanas de edad o mayores parece estar ligada a la degradación de anticuerpos frente a PCV2 que se ha mostrado que se produce en animales que tienen 4-11 semanas, se han descrito varios métodos de vacunación frente a PCVAD que utilizan un régimen de vacunación de dos administraciones con el fin de evitar una posible interferencia de los anticuerpos maternos. En el documento WO 2007/028823 se describe la vacunación de lechones que tienen anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre con más de 20 µg/dosis de antígeno utilizando un régimen de vacunación de dos administraciones. La vacunación inicial se administró entre la semana 1 y 4 de edad. Se re-vacunó a todos los animales tres semanas después de la vacunación inicial, cuando hubieron disminuido o desaparecido los anticuerpos procedentes de la madre en los animales con niveles altos de MDA en el momento de la primera vacunación. Por lo tanto, todavía no existe información que describa la influencia exacta de los anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre en el grado de protección o interferencia. Por esta razón, se recomienda no vacunar a los lechones antes de las tres (3) semanas de edad al menos con un régimen de vacunación de una administración. La vacunación antes de las 3 semanas de edad está conectada con un determinado grado de incertidumbre respecto a la eficacia de la inmunización. Por otra parte, los lechones con niveles más bajos de anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, aunque nadie sabe todavía los que significa exactamente niveles más bajos, no están suficientemente protegidos frente a la infección por PCV2 antes de la semana 3 de edad. En otras palabras, las piaras con titulaciones bajas de MDA que no se vacunan antes de las 3 semanas de edad tienen un riesgo inmanente de infecciones por PCV2 debido a la falta de un estado inmune suficiente.

Más aún, no se ha descrito que dichas vacunas confieran inmunidad protectora frente a la infección por PCV2 o que reduzcan, o que disminuyan la gravedad de, o curen cualquier síntoma clínico asociado con ésta en cerdos que ya tienen anticuerpos anti-PCV2, preferiblemente que tienen anticuerpos anti-PC2 maternos.

Descripción breve de los dibujos

Figura 1: clases de titulaciones del anticuerpo anti-PCV2 en el momento de la vacunación.

Figura 2: Comparación de peso corporal vivo en animales vacunados con anticuerpos anti-PCV2 bajos (< 1:100) y altos (> 1:1.000).

Figura 3: Diferencia en el peso corporal de animales vacunados (IVP) comparado con animales control tratados con placebo (CP).

Descripción de la invención

Las reivindicaciones definen el objeto para el que se solicita la protección. La presente invención supera los problemas inherentes a la técnica anterior y proporciona un avance preciso en el estado de la técnica. Según un aspecto general, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento. Resultó un descubrimiento impredecible y sorprendente, que la presencia de anticuerpos anti-PCV2, en particular de origen materno, no disminuyera la eficacia de la vacuna que comprende el antígeno PCV2.

Los términos “vacuna” o “composición inmunogénica” (los dos términos se utilizan como sinónimos) tal y como se utilizan en la presente memoria se refieren a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno PCV2, composición que puede utilizarse para prevenir o tratar una enfermedad o condición asociada con una infección por PCV2 en un sujeto. Una composición inmunogénica preferida puede inducir, estimular o reforzar la respuesta inmune frente a PCV2. El término abarca así tanto composiciones inmunogénicas de subunidades, como las que se describen más adelante, como composiciones que contienen PCV2 completo muerto o atenuado y/o inactivado.

Por lo tanto según otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que la composición inmunogénica es composición inmunogénica de subunidades, una composición que contiene PCV2 completo muerto, o atenuado y/o inactivado.

La expresión "composición inmunogénica de subunidades", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una composición que contiene al menos un polipéptido o antígeno inmunogénico, pero no todos los antígenos, obtenidos de u homólogos a un antígeno procedente de PCV2. Una composición de este tipo está sustancialmente exenta de PCV2 intacto. Así, una "composición inmunogénica de subunidades" se prepara a partir de polipéptidos inmunogénicos procedentes de PCV2 al menos parcialmente purificados o fraccionados (preferiblemente sustancialmente purificados), o análogos recombinantes de éstos. Una composición inmunogénica de subunidades puede comprender la subunidad del antígeno o de los antígenos de interés sustancialmente exentos de otros antígenos o polipéptidos procedentes de PCV2, o en forma fraccionada. Una composición inmunogénica de subunidades preferida comprende la proteína ORF-2 de PCV2 como se describe más adelante. Las más preferidas son las composiciones inmunogénicas de subunidades que comprenden cualquiera de los antígenos PCV2 proporcionados en WO06/072065.

Una "respuesta inmune" significa, pero no está limitada a, el desarrollo en un anfitrión de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmune" incluye, pero no está limitada a, uno o más de los efectos siguientes: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el anfitrión exhibirá una respuesta inmunológica terapéutica o protectora (memoria), de modo que la resistencia a una nueva infección resultará reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad quedará reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción del número de o de la gravedad de, o la ausencia de uno o más de los síntomas asociados con las infecciones por PCV2, en el retraso de la aparición de la viremia, en una persistencia viral reducida, en una reducción de la carga viral global y/o una reducción de la excreción viral.

Los términos "antígeno” tal y como se utilizan en la presente memoria se refieren a una secuencia de aminoácidos que incita una respuesta inmunológica como se ha descrito anteriormente. Un antígeno, tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye la secuencia de longitud completa de cualquier proteína PCV2, análogos de éstas, o fragmentos inmunogénicos de éstas. La expresión "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y, así, incita la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Dichos fragmentos pueden identificarse utilizando cualquier técnica de mapeo de epítopos, muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando concurrentemente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de la proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos, mientras los péptidos siguen estando fijados a los soportes. Dichas técnicas son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de EEUU No. 4.708.871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como, por ejemplo, mediante cristalografía por rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*.

También se incluyen dentro de la definición antígenos sintéticos, por ejemplo poliepítopos, epítopos flanqueantes y otros antígenos recombinantes u obtenidos de forma sintética. Véanse, por ejemplo, Bergmann et al. (1993) Eur. J.

Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de junio - 3 de julio, 1998.

Según un aspecto adicional, la composición inmunogénica tal y como se utiliza en la presente memoria comprende más preferiblemente el polipéptido, o un fragmento de éste, expresado por ORF-2 de PCV2. El ADN y proteína ORF-2 de PCV2, utilizados en la presente memoria para la preparación de las composiciones y en los procesos proporcionados en la presente memoria, es un dominio altamente conservado en aislados de PCV2 y, por esto, cualquier ORF-2 de PCV2 será eficaz como fuente del ADN y/o polipéptido de ORF-2 de PCV tal y como se utiliza en la presente memoria. Una proteína ORF-2 de PCV2 preferida es la de SEQ ID NO: 11 de WO06/072065. Un polipéptido ORF-2 de PCV más preferido se proporciona como SEQ ID NO: 5 de WO06/072065. Sin embargo, 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 así conservar las características antigénicas que la hacen útil en las composiciones inmunogénicas. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden estimarse, por ejemplo, por el experimento de exposición tal y como se proporciona en el Ejemplo 4 de WO06/072065. Más aún, 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 si se compara con la proteína ORF-2 de PCV2 codificada por la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 tal y como se proporciona en WO06/072065.

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que el antígeno PCV2 es una proteína antigénica ORF-2 de PCV2 que tiene al menos un 70%, preferiblemente un 80%, aún más preferiblemente un 90% de la inmunidad protectora si se compara con la proteína ORF-2 de PCV2 codificada por la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 tal y como se proporciona en WO06/072065. Preferiblemente dicha ORF-2 de PCV2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID Nº: 5 de WO06/072065.

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

Como se ha mencionado anteriormente, un polipéptido ORF-2 de PCV2 más preferido es uno cualquiera 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 así conservar las características antigénicas que la hacen útil en las composiciones inmunogénicas. En algunas formas, se utiliza una forma truncada o sustituida, o fragmento de este polipéptido ORF-2 de PVC2 como el componente antigénico en la composición. Preferiblemente, dichas formas truncadas o sustituidas, o fragmentos comprenderán al menos 18 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos de longitud completa de ORF-2 de PCV2, por ejemplo 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 todavía más preferiblemente al menos 57 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos de longitud completa de ORF-2 de PCV2, por ejemplo la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

“Identidad de Secuencia”, tal y 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 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 cadenas de dichas secuencias. Tras dicho alineamiento, la identidad de secuencia se constata sobre una base de posición-por-posición, por ejemplo, las secuencias son “idénticas” en una posición particular si en esa posición los restos de nucleótidos o aminoácidos son idénticos. El número total de dichas identidades de posición se divide entonces por el número total de nucleótidos o restos en la secuencia de referencia para proporcionar el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia se puede calcular fácilmente por métodos conocidos, que incluyen, pero no están limitados a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis

Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia se diseñan para proporcionar el apareamiento mayor entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia se codifican en programas de ordenador disponibles públicamente que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Los ejemplos de dichos programas incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990). El programa BLASTX está públicamente disponible en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). Estos programas alinean de forma óptima las secuencias utilizando pesos de huecos por defecto con el fin de producir el nivel más alto de identidad de secuencia entre las secuencias dada y de referencia. Como ilustración, por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, un 85%, preferiblemente un 90%, aún más preferiblemente un 95% de "identidad de secuencia" con una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende dar a entender que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia, excepto en que la secuencia de polinucleótidos dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, aún 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%, aún más preferiblemente un 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 15%, preferiblemente el 10%, aún 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%, aún más preferiblemente el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones terminales 5' ó 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos, por ejemplo, un 85%, preferiblemente un 90%, aún más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, se pretende dar a entender que la secuencia de aminoácidos dada del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto en que la secuencia de polipéptido dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, aún 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%, aún más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 15%, preferiblemente hasta el 10%, aún más preferiblemente hasta el 5% de los restos de 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 restos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos. Sin embargo, las sustituciones conservativas no están incluidas como un apareamiento cuando se determina la identidad de secuencia.

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

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

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

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que dicha proteína ORF-2 de PCV2 es cualquiera de las descritas anteriormente. Preferiblemente, dicha proteína ORF-2 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 de WO06/07065;

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 de WO06/072065,

v) un polipéptido que es codificado por un ADN que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 de WO06/072065.

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

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

viii) la porción inmunogénica de vii), en la que el polinucleótido que codifica dicha porción inmunogénica comprende al menos 30 nucleótidos contiguos incluidos en las secuencias de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 de WO06/072065.

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

Según un aspecto adicional, la proteína ORF-2 de PCV2 se proporciona en la composición inmunogénica a un nivel de inclusión de antígeno eficaz para inducir la respuesta inmune deseada, a saber para reducir la incidencia de, disminuir la gravedad de, o prevenir o reducir uno o más síntomas clínicos que resultan o están asociados con una infección por PCV2. Preferiblemente, el nivel de inclusión de la proteína ORF-2 de PCV2 es al menos 0,2 µg de antígeno / ml de la composición inmunogénica final (µg/ml), más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/ml, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/ml, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/ml, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/ml, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 18 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/ml, todavía más preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 µg/ml, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1,6 µg/ml.

Según un aspecto adicional, el nivel de inclusión del antígeno ORF-2 de PCV es al menos 0,2 µg / de proteína ORF-2 de PCV2 según se ha descrito anteriormente por dosis de la composición antigénica final (µg/dosis), más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/dosis, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/dosis, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/dosis, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/dosis, todavía más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 18 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 µg/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/dosis, todavía más preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 µg/dosis, aún más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 µg/dosis, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1,6 µg/dosis. Sorprendentemente, se ha encontrado que un nivel de inclusión de la proteína ORF-2 de PCV2 (contenido en antígeno) de menos de 20 µg/dosis, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 18 µg/dosis es adecuado para conferir inmunidad a animales jóvenes y/o a animales que son positivos para los anticuerpos de PCV2, en particular que son positivos para los anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar menos de 20 µg/dosis, preferiblemente aproximadamente 0,5 a 18 µg/dosis de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento. Dicho antígeno PCV2 es

cualquiera de los descritos en esta solicitud de patente. Preferiblemente, dicho antígeno PCV2 es cualquier proteína ORF-2 de PCV2, más preferiblemente cualquiera de las proteínas ORF-2 de PCV2 descritas en la presente memoria.

El polipéptido ORF-2 de PCV2 utilizado en la composición inmunogénica según la presente invención se puede obtener de cualquier manera, incluyendo el aislamiento y la purificación de ORF-2 de PCV2, síntesis estándar de proteínas y metodología recombinante. Los métodos preferidos para obtener el polipéptido ORF-2 de PCV2 se proporcionan en WO06/072065. Brevemente, se infectan células susceptibles con un vector viral recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF-2 de PCV2, el polipéptido ORF-2 de PCV2 es expresado por el virus recombinante, y el polipéptido ORF-2 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.

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

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que el antígeno PCV2 es ORF-2 de PCV2 recombinante, preferiblemente ORF-2 de PCV2 expresada en un baculovirus. Preferiblemente, las ORF-2 de PCV2 recombinantes o expresadas en baculovirus que tienen la secuencia descrita anteriormente.

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

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

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

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

Los expertos en la técnica comprenderán que la composición utilizada en la presente memoria puede incorporar disoluciones estériles inyectables, fisiológicamente aceptables conocidas. Para preparar una disolución lista para utilizarse para inyección parenteral o infusión, están fácilmente disponibles disoluciones isotónicas acuosas, tales como, por ejemplo, disolución salina o disoluciones de proteínas del plasma correspondientes. Además, las

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

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

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

Un ejemplo adicional de adyuvante es un compuesto elegido entre los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alquenilo. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están entrecruzados, especialmente con polialquenil-éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, nº 2, junio 1996). Las personas expertas en la técnica también pueden aludir a la patente de EEUU. No. 2.909.462 que describe dichos polímeros acrílicos entrecruzados 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, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener por sí mismos otros sustituyentes tal como metilo. Los productos vendidos con el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EEUU) son particularmente apropiados. Carbopol™ tal como se utiliza en toda esta memoria descriptiva es una designación comercial para polímeros de poli(ácido acrílico) que se conocen tambi´çen como Carbomer. Están entrecruzados 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, aún 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.

Los adyuvantes adecuados adicionales incluyen, pero no están limitados a, el 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 del cólera, IMS 1314, o dipéptido muramilo, entre muchos otros.

Preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. Aún más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg a 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 vehículos aceptables farmacéuticamente. Tal y como se utiliza en la presente memoria,"un vehículo aceptable farmacéuticamente" incluye cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retardan la adsorción y similares. Lo más preferiblemente, la composición proporcionada con la presente, contiene proteína ORF-2 de PCV2 recuperada del sobrenadante de células cultivadas in vitro, en el que dichas células estaban infectadas con un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF-2 de PCV2 y que expresan proteína ORF-2 de PCV2, y en el que dicho cultivo celular se trató con aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM de BEI, preferiblemente con aproximadamente 5 mM de BEI, para inactivar el vector viral, y una concentración equivalente de un agente de neutralización, preferiblemente disolución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM.

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

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir además uno o más agentes inmunomoduladores adicionales tales como, por ejemplo, interleuquinas, interferones u otras citoquinas. Las composiciones inmunogénicas también pueden incluir Gentamicina y 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 2.000 µg de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 250 µg/ml de dosis de la composición de vacuna. Así, la composición inmunogénica, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere también a una composición que comprende de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibióticos.

La composición inmunogénica, tal y como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF-2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF-2 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 las cantidades descritas anteriormente; vii) una concentración aceptable farmacéuticamente de un tampón salino, preferiblemente de una sal fosfato, y viii) un agente anti-microbiológico activo; en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor de 1 µm.

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

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2 maternos, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que la composición inmunogénica es CircoFLEX®, CircoVac®, CircoVent o Suvaxyn PCV-2 One Dose®. Lo más preferiblemente, la composición inmunogénica es Ingelvac® CircoFLEX™, y/o el antígeno PCV2 es ORF-2 de PCV2, preferiblemente ORF-2 de PCV2 expresado en baculovirus, lo más preferiblemente como se incluye en Ingelvac® CircoFLEX™.

Para la investigación de una posible interferencia del antígeno PCV2 con el anticuerpo materno se realizó un estudio en el que se determinaron las titulaciones de anticuerpo de los animales en estudio en el momento de la vacunación que se agruparon en una clase de anticuerpos baja, moderada y alta: Las titulaciones medias geométricas de < 1:100 se consideraron como titulaciones bajas de anticuerpo, las titulaciones de 1:100 a 1:1.000 se consideraron como titulaciones moderadas de anticuerpo y las titulaciones de >1:1.000 se consideraron como titulaciones altas de anticuerpo. Este patrón de agrupamiento es comparable con el realizado en un estudio de campo Canadiense en el que las titulaciones de anticuerpo de 1:80 se consideraron como bajas, las titulaciones de anticuerpo de 1:640 como moderadas y las titulaciones de anticuerpo de > 1:1.280 como altas (Larochelle et al., 2003, Can. J. Vet. Res.; 67: 114-120). Con el fin de analizar el impacto de las titulaciones bajas, moderadas y altas de anticuerpo en el momento de la vacunación en la viremia, se compararon los animales vacunados y los tratados con placebo respecto a la aparición, finalización, duración de la viremia, el número de días de muestreo positivos y la carga viral. Sorprendentemente, se encontró que la presencia de anticuerpos anti-PCV2, en particular de anticuerpos procedentes de la madre, no tenía un impacto significativo en ninguno de estos parámetros. En otras palabras,

sorprendentemente se encontró que la eficacia del antígeno PCV2 en la prevención y tratamiento de una infección por PCV2 o en la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales no se vio afectada en el día de la vacunación por la presencia de anticuerpos anti-PCV2, por títulos de anticuerpo anti-PCV2 de más de 1:1.000. Este efecto podría mostrarse en un experimento de vacunación de una administración, que significa que el antígeno PCV2 se administró sólo una vez y sin ninguna administración posterior de antígeno PCV2.

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

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos maternos, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, preferiblemente de menos de 20 µg/dosis en el que dicho animal tiene una titulación detectable de anticuerpo anti-PCV2 de más de 1:1.000. Preferiblemente, esta titulación de anticuerpos anti-PCV2 es detectable y cuantificable en un ensayo inmune específico anti-PCV2, preferiblemente en el ensayo tal y como se describe en el Ejemplo 2. Más preferiblemente, estos anticuerpos anti-PCV-2 son anticuerpos procedentes de la madre. El antígeno PCV2 sólo se administra una vez, preferiblemente con una dosis de menos de 20 µg/dosis.

Los lechones que tienen sólo titulaciones bajas (< 1:100) o titulaciones moderadas (< 1:1.000) de anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre no están suficientemente protegidos frente a las infecciones por PCV2 que se producen antes de las 3 semanas de edad. Por lo tanto, es deseable la vacunación en una etapa muy temprana de la vida. Debido a los resultados impredecibles e inesperados proporcionados en la presente memoria y que demuestran una ausencia de interferencia de los anticuerpos anti-PCV2 con el antígeno PCV2, resulta realista la vacunación/tratamiento de los animales antes de las 3 semanas de edad. Además, sorprendentemente se ha encontrado que las titulaciones de anticuerpo anti-PCV2 de más de 1:1.000 no tenían influencia en la eficacia de la vacuna de PCV2 independientemente del nivel de la titulación inicial de anticuerpo existente. Por ejemplo, la vacunación de animales con titulación alta (titulación del anticuerpo anti-PCV2 > 1:1.000) resultó en una duración 9,5 días más corta de la viremia, una finalización 11,9 días más temprana de la viremia, 1,9 días menos de días de muestreo virémico y una reducción de aproximadamente 2 veces de la suma de equivalentes genómicos/ml comparado con los animales control no vacunados. Después de la comparación de “animales con titulación alta” “moderada” y “baja” vacunados no se observaron diferencias significativas respecto a los diferetes parámetros de la viremia de PCV2. Estos resultados indican que también en presencia de titulaciones altas de anticuerpo anti-PCV2 el antígeno PCV2 utilizado para la vacunación puede aún reducir significativamente la viremia en la sangre (finalización de la viremia, duración de la viremia, carga de virus). De acuerdo con este descubrimiento no se pudieron encontrar diferencias respecto al peso corporal vivo cuando se compararon animales con titulación baja y alta del grupo vacunado. Además, los animales vacunados con una titulación alta de anticuerpo anti-PCV2 en el momento de la vacunación/tratamiento (> 1:1.000) también mostraron un peso corporal significativamente mayor después de la aparición de la viremia comparado con los animales tratados con placebo con titulaciones altas de anticuerpo iniciales (véase la Figura 3). Consecuentemente, es posible la vacunación/tratamiento de los animales de 1 día de edad o mayores con el antígeno PCV2. Sin embargo, la vacunación debe realizarse en las primeras 8, preferiblemente en las primeras 7 semanas de edad. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales, que comprende la etapa de administrar al animal que necesite dicho tratamiento en el día 1 de edad o posteriormente, preferiblemente no después de la semana 8 de edad, una cantidad eficaz de un antígeno PCV2. Según una realización preferida, se requieren menos de 20 µg/dosis de antígeno PCV2 para conferir inmunidad a dicho animal. El antígeno PCV2, preferiblemente menos de 20 µg/dosis de éste, se administra sólo una vez al animal que necesite dicho tratamiento.

Según un aspecto adicional, más general, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento.

El término “animal joven” tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un animal de 1 a 22 días de edad. Preferiblemente, por el término animal joven se quiere decir un animal de 1 a 20 días de edad. Más preferiblemente, el término animal joven se refiere a un animal de 1 a 15 días de edad, aún más preferiblemente de 1 día de edad a 14 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 12 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 10 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 8 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 7 días de edad, aún más

preferiblemente de 1 a 6 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 5 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 4 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 3 días de edad, aún más preferiblemente de 1 ó 2 días de edad, lo más preferiblemente a un animal de 1 día de edad. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 a un animal de 1 a 22 días de edad, preferiblemente de 1 a 20 días de edad, más preferiblemente de 1 a 15 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 14 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 12 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 10 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 8 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 7 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 6 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 5 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 4 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 3 días de edad, aún más preferiblemente de 1 ó 2 días de edad, lo más preferiblemente en el día 1 de edad que necesite dicho tratamiento. Por ejemplo, se proporciona evidencia de que la vacunación/tratamiento en los días 19 a 22 de edad muestra una alta eficacia de la vacunación. Además, también se ha mostrado que la vacunación/tratamiento en los días 12 a 18, preferiblemente los días 12 a 14 de edad es muy eficaz en la reducción de los síntomas clínicos asociados con infecciones por PCV2, reducción de la carga viral total, reducción de la duración de la viremia, retraso en la aparición de la viremia, ganancia de peso. Además, también se ha mostrado que la vacunación en la semana 1 de edad es muy eficaz en la reducción de los síntomas clínicos asociados con infecciones por PCV2, reducción de la carga viral total, reducción de la duración de la viremia, retraso en la aparición de la viremia, ganancia de peso. Preferiblemente, se requiere menos de 20 µg/dosis de antígeno PCV2 para conferir inmunidad a estos animales jóvenes. El antígeno PCV2, preferiblemente menos de 20 µg, se administra sólo una vez al animal joven que necesite dicho tratamiento.

Debido a la ubicuidad de PCV2 en el campo la mayoría de los lechones jóvenes son seropositivos respecto a PCV2. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales jóvenes que tienen anticuerpos anti-PCV2 en el día de la vacunación, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 a un animal de 1 a 22 días de edad, preferiblemente de 1 a 20 días de edad, más preferiblemente de 1 a 15 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 14 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 12 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 10 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 8 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 7 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 6 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 5 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 4 días de edad, aún más preferiblemente de 1 a 3 días de edad, aún más preferiblemente en el día 1 ó 2 de edad, lo más preferiblemente en el día 1 de edad que necesite dicho tratamiento. Preferiblemente dichos animales jóvenes, en el día de la vacunación/tratamiento, tienen una titulación detectable de anticuerpo anti-PCV2 de hasta 1:100, preferiblemente de más de 1:100, aún más preferiblemente de más de 1:250, aún más preferiblemente de más de 1:500, aún más preferiblemente de 1:640, aún más preferiblemente de más de 1:750, lo más preferiblemente de más de 1:1.000 en el día de la vacunación/tratamiento. Preferiblemente, se requiere menos de 20 µg/dosis de antígeno PCV2 para conferir una inmunidad suficiente a estos animales jóvenes. El antígeno PCV2, preferiblemente menos de 20 µg, se administra sólo una vez al animal joven que necesite dicho tratamiento.

Como se ha descrito anteriormente, la vacunación/tratamiento de animales jóvenes con el antígeno PCV2 resultó en un acortamiento de la fase virémica comparado con los animales control no vacunados. El tiempo medio de acortamiento fue 9,5 días comparado con los animales control no vacunados de la misma especie. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que el tratamiento o profilaxis resulta en un acortamiento de la fase de viremia de 5 días o más, preferiblemente 6 días o más, aún más preferiblemente de 7 días o más, aún más preferiblemente de 8 días o más, aún más preferiblemente de 9, aún más preferiblemente de 10, aún más preferiblemente de 12, aún más preferiblemente de 14, lo más preferiblemente de más de 16 días comparado con los animales de un grupo control no tratado de la misma especie. En algunos casos la fase virémica se acorta más de 20 días. En general, la vacunación de lechones jóvenes resultó en una reducción de la pérdida de ganancia de peso, una duración menor de la viremia, una finalización más temprana de la viremia, y una carga de virus más baja. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que dicho tratamiento o profilaxis de infección por PCV2 resulta en una mejora, si se compara con animales de un grupo control no tratado de la misma especie, de un parámetro de eficacia de vacunación seleccionado del grupo que consiste en una reducción de la pérdida de ganancia de peso, una duración más corta de la viremia, una finalización más temprana de la viremia, una carga de virus más baja, o combinaciones de éstos. Preferiblemente, se requieren menos de 20 µg/dosis de antígeno PCV2 para producir cualquiera de los parámetros mejorados de eficacia de la vacuna mencionados anteriormente. Además, dichos parámetros mejorados de eficacia de la vacuna se consiguen mediante una única administración de sólo una dosis.

El término “una cantidad eficaz” tal y como se utiliza en la presente memoria significa, pero no está limitado a, una

cantidad de antígeno que incita o es capaz de incitar una respuesta inmune en un animal, al que se administra dicha dosis eficaz del antígeno PCV2. Preferiblemente, una cantidad eficaz se define como una cantidad de antígeno que confiere al menos una duración de la inmunidad (DOI) de 10 semanas, preferiblemente al menos una (DOI) de 12 semanas, más preferiblemente al menos una (DOI) de 15 semanas, lo más preferiblemente al menos una (DOI) de 20 semanas.

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

Las vacunas de subunidades se administran normalmente con un nivel de inclusión del antígeno de al menos 0,2 µg de antígeno por dosis, preferiblemente con aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 0,5 a aproximadamente 18 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 0,6 a aproximadamente 16 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/dosis.

Inesperadamente, se encontró que la utilización profiláctica de las composiciones inmunogénicas descritas *supra*, es eficaz para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con infecciones por PCV2, preferiblemente en animales jóvenes y/o en animales que tienen una inmunidad pasiva frente a PCV2 en el día del tratamiento. En particular, se descubrió que la utilización profiláctica de las composiciones inmunogénicas tal y como se describen en la presente memoria, y específicamente de las composiciones que comprenden el antígeno ORF-2 de PCV2, es eficaz para reducir la linfadenopatía, depleción linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes en los animales infectados con PCV2 y que tienen anticuerpos anti-PCV-2 maternos en el día del tratamiento/vacunación. Además, se descubrió que la utilización profiláctica de las composiciones inmunogénicas tal y como se describen en la presente memoria, y específicamente de las composiciones que comprenden el antígeno ORF-2 de PCV2, es eficaz para reducir (1) neumonia intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados moteados atróficos, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, por ejemplo, aborto, nacimiento de crías muertas, momias, etc, (7) lesiones semejantes a Pia, que se sabe que están normalmente asociadas con infecciones por Lawsonia intracellularis (Ileitis), (8) linfadenopatía, (9) depleción linfoide y/o (10) histiocitos multinucleados/gigantes (11) Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS), (12) mortalidad asociada con PCVAD, (13) pérdida de peso asociada con PCVAD, (14) variabilidad en el crecimiento reducida, (15) frecuencia reducida de ‘crías poco desarrolladas’, (16) co-infecciones reducidas con el Complejo de Enfermedades Reproductoras y Respiratorias Pocinas (PRRSV). Dicha composición inmunogénica también es eficaz para mejorar parámetros de crecimiento importantes económicamente tales como tiempo de sacrificio, peso canal, proporción magro carne. Por lo tanto, el término "síntomas clínicos" tal y como se utiliza en la presente memoria, significa, pero no está limitado a, (1) neumonia intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados moteados atróficos, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, por ejemplo, aborto, nacimiento de crías muertas, momias, etc, (7) lesiones semejantes a Pia, que se sabe que están normalmente asociadas con infecciones por Lawsonia intracellularis (Ileitis), (8) linfadenopatía, (9) depleción linfoide y/o (10) histiocitos multinucleados/gigantes (11) Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS), (12) mortalidad asociada con PCVAD, (13) pérdida de peso asociada con PCVAD, (14) variabilidad en el crecimiento reducida, (15) frecuencia reducida de ‘crías poco desarrolladas’, (16) co-infecciones reducidas con el Complejo de Enfermedades Reproductoras y Respiratorias Porcinas (PRRSV). Además, la composición antigénica descrita en la presente memoria reduce la carga total de circovirus incluyendo una aparición posterior, una menor duración, una finalización más temprana de la viremia, y una carga viral reducida y su impacto inmunosupresor en animales jóvenes, en particular en los que tienen anticuerpos anti-PCV2 en el día de la vacunación, lo que resulta en un nivel mayor de resistencia general a la enfermedad y en una incidencia reducida de enfermedades y síntomas asociados con PCV2.

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales jóvenes y/o en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que los síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en: (1) neumonia intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados moteados atróficos, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, por ejemplo, aborto,

nacimiento de crías muertas, momias, etc, (7) lesiones semejantes a Pia, que se sabe que están normalmente asociadas con infecciones por Lawsonia intracellularis (Ileitis), (8) linfadenopatía, (9) depleción linfoide y/o (10) histiocitos multinucleados/gigantes (11) Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS), (12) mortalidad asociada con PCVAD, (13) pérdida de peso asociada con PCVAD, (14) variabilidad en el crecimiento reducida, (15) frecuencia reducida de 'crías poco desarrolladas', (16) co-infecciones reducidas con el Complejo de Enfermedades Reproductoras y Respiratorias Porcinas (PRRSV). Según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en el que los síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en: (1) neumonia intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados moteados atróficos, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, por ejemplo, aborto, nacimiento de crías muertas, momias, etc, (7) lesiones semejantes a Pia, que se sabe que están normalmente asociadas con infecciones por Lawsonia intracellularis (Ileitis), (8) linfadenopatía, (9) depleción linfoide y/o (10) histiocitos multinucleados/gigantes (11) Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS), (12) mortalidad asociada con PCVAD, (13) pérdida de peso asociada con PCVAD, (14) variabilidad en el crecimiento reducida, (15) frecuencia reducida de 'crías poco desarrolladas', (16) co-infecciones reducidas con el Complejo de Enfermedades Reproductoras y Respiratorias Porcinas (PRRSV).

La composición según la descripción puede aplicarse por vía oral, intradérmica, intratraqueal o intravaginal. Preferiblemente, la composición puede aplicarse 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 ha descrito anteriormente, en tejidos diana a través de una inyección intravenosa o por inyección directa. Para la aplicación sistémica, se prefieren las vías intravenosa, intravascular, intramuscular, intranasal, intraarterial, intraperitoneal, oral o intratecal. Se puede efectuar una aplicación más local por vía subcutánea, intradérmica, intracutánea, intracardial, intralobal, intramedular, intrapulmonar, o directamente en o cerca del tejido a tratar (tejido conjuntivo, óseo, muscular, nervioso, epitelial). Dependiendo de la duración y eficacia de tratamiento deseadas, las composiciones según la descripción puede administrarse una o varias veces, también de forma intermitente, por ejemplo sobre una base diaria durante varios días, semanas o meses y en diferentes dosificaciones.

Preferiblemente, una dosis de la composición inmunogénica tal y como se ha descrito anteriormente se administra por vía intramuscular al sujeto que la necesita. Según un aspecto adicional, el antígeno PCV2 o la composición inmunogénica que comprende cualquiera de dichos antígenos PCV2 tal y como se describen en la presente memoria se embotella y se administra a un (1) mL por dosis. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona una composición inmunogénica de 1 ml, que comprende el antígeno PCV-2 tal y como se describe en la presente memoria, para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento. Según un aspecto adicional, la presente invención también proporciona una composición inmunogénica de 1 ml, que comprende el antígeno PCV-2 tal y como se describe en la presente memoria, para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento.

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, aún más preferiblemente al menos 7 días entre la primera y segunda administración y entre la segunda o cualquier administración adicional del estimulante inmune. Preferiblemente, el estimulante inmune se da al menos 10 días, preferiblemente 15 días, aún más preferiblemente 20, aún más preferiblemente 22 días más tarde de la administración inicial de la composición inmunogénica proporcionada en la presente memoria. Un estimulante inmune preferido es, por ejemplo, hemocianina de lapa (KLH), preferiblemente emulsionado con adyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA). Sin embargo, se entiende con la presente que también puede utilizarse otro estimulante inmune conocido por una persona experta en la técnica. La expresión "estimulante inmune", tal y como se utiliza en la presente 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 agente patógeno específico. Se instruye, además, administrar el estimulante inmune en una dosis adecuada.

El "animal" tal y como se utiliza en la presente memoria significa cerdo, cerdo o lechón.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los ejemplos siguientes muestran los materiales y procedimientos preferidos según la presente invención. Ha de entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente, y nada en ellos debe considerarse una limitación del alcance global de la invención.

Ejemplo 1

Preparación del antígeno ORF-2 de PCV2

Se crecieron cultivos de células SF+ almacenados en nitrógeno líquido en medio Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) en suspensión en matraces de centrifugación estériles con agitación constante. Los cultivos se crecieron 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 x 10^6 células/mL, éstas se dividieron en nuevos recipientes con una densidad de siembra de 0,5 - 1,5 x 10^6 células/mL. Los cultivos por expansión subsiguientes se crecieron en matraces de centrifugación de hasta 36 litros de capacidad o en biorreactores de acero inoxidable de hasta 300 litros durante un periodo de 2-7 días a 25 - 29°C.

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

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

Ejemplo 2

Inmunoensayo Anti PCV-2

Se siembran células PK15 (por ejemplo, ATCC CCL-33) o VIDO R1 descritas en WO 02/077210 en una placa de 96 pocillos (aproximadamente 20.000 a 60.000 células por pocillo). Las células se infectan con un aislado de PCV2 cuando las monocapas presentan una confluencia de aproximadamente 65 a 85%. Las células infectadas se incuban durante 48 horas. El medio se elimina y los pocillos se lavan 2 veces con PBS. El tampón de lavado se desecha y las células se tratan con fijador frío metanol/acetona 50/50 (~100 µl/pocillo) durante aproximadamente 15 min a aproximadamente -20°C. El fijador se desecha y las placas se secan al aire. Se preparan diluciones seriadas de las muestras de suero porcino en PBS, se añaden a las placas y se incuban para permitir que los anticuerpos se unan si están presentes en las muestras de suero durante aproximadamente 1 hr a 36,5□1°C. Además, se ensayan en paralelo diluciones seriadas de una muestra control positivo y negativo para anti-PCV2 (Muestras Control Positivo y Negativo). Las placas se lavan entonces tres veces con PBS. Se desecha el PBS. Las placas se tiñen entonces con un conjugado comercial anti-Suido de Cabra FITC diluido 1:100 en PBS y se incuba durante aproximadamente 1 hr a 36,5□1°C, lo que permite la detección de los anticuerpos unidos a las células infectadas. Después de que la incubación haya terminado, las microplacas se sacan del incubador, el conjugado se desecha y las placas se lavan 2 veces con PBS. Las placas se leyeron utilizando microscopía UV y los pocillos se registraron como positivos o negativos. Las muestras Control Positivo y Control Negativo se utilizan para evaluar el sistema de ensayo. Si los controles están en los intervalos esperados los resultados del ensayo son aceptables respecto a los parámetros del método de ensayo. Las titulaciones del anticuerpo en suero se calcularon utilizando la dilución más alta que muestra una reactividad IFA específica y se calcula el número de pocillos positivos por dilución o un 50% de un punto final utilizando la fórmula de Reed-Muench apropiada.

Ejemplo 3

Eficacia de ORF-2 de PCV2 (Ingelvac® CircoFLEX™) en animales jóvenes

que tienen niveles bajos o altos de anticuerpos anti-PCV2

Para la investigación de una posible interferencia de la vacuna con el anticuerpo materno se realizó un estudio en el que se determinaron las titulaciones de anticuerpo de todos los animales en estudio en el momento de la vacunación que se agruparon entonces en una clase de anticuerpos baja, moderada y alta: Las titulaciones medias geométricas de < 1:100 se consideraron como titulaciones bajas de anticuerpo, las titulaciones de 1:100 a 1:1.000 se consideraron como titulaciones moderadas de anticuerpo y las titulaciones de >1:1.000 se consideraron como titulaciones altas de anticuerpo.

Realización del estudio

En el estudio se incluyeron aproximadamente 500 animales. Los animales del estudio se equilibraron y distribuyeron por igual en los dos grupos de tratamiento respecto al peso corporal inicial y asignación de lecho. A los 20 días de edad todos los animales del estudio recibieron una única dosis (1 ml) de la vacuna de PCV2 (Producto Veterinario

en Investigación, IVP) o una única dosis (1 ml) de un sobrenadante de cultivo celular adyuvado que contiene placebo (Producto Control, CP) por inyección intramuscular en el lado derecho del cuello. Los animales del estudio se evaluaron hasta el final del engorde.

Se recogieron muestras de sangre de todos los animales del estudio y se analizaron posteriormente por IFAT con el fin de determinar las titulaciones de anticuerpo en el momento de la vacunación. Después de esto, se correlacionaron las titulaciones de anticuerpo iniciales con la ganancia de peso. Además, dependiendo de la titulación de anticuerpo inicial los animales se agruparon en tres clases (titulaciones de anticuerpo iniciales bajas, moderadas y altas) y los animales con 'titulación alta' de los dos grupos de tratamiento se compararon para detectar posibles diferencias respecto a la ganancia de peso y la viremia.

Resultados

Titulaciones de Anticuerpo Iniciales

En el momento de la vacunación la mayoría de los animales tenían titulaciones de anticuerpo moderadas (definidas como 1:100 a 1:1.000) o titulaciones de anticuerpo altas (definidas como > 1:1.000). Sólo aproximadamente el 13% por ciento de los animales tenían titulaciones de anticuerpo bajas (definidas como < 1:100). Debido a la ausencia de infección por PCV2 en el momento del inicio del estudio puede concluirse que las titulaciones de anticuerpo en el día 0 del estudio provenían posiblemente de la madre. No se observaron diferencias significativas en las titulaciones de anticuerpo en el día 0 del estudio entre los dos grupos de tratamiento. Una visión global del porcentaje de animales por clase de titulación se proporciona en la Figura 1.

Correlación de las Titulaciones de Anticuerpo en el Momento de la Vacunación con la Viremia en Sangre

Con el fin de determinar si una titulación alta de anticuerpo en el momento de la vacunación (> 1:1.000) tenía un impacto en la viremia, se compararon los animales vacunados y los tratados con placebo con titulaciones altas de anticuerpo iniciales respecto a la aparición, finalización, duración de la viremia, el número de días de muestreo positivos y la carga de virus. La Tabla 1 resume la comparación de los parámetros de viremia de los 'animales con titulación alta' de los dos grupos de tratamiento.

Tabla 1: Comparación de la viremia en los 'animales con titulación alta' de los dos grupos de tratamiento

Parámetro Investigado	**Grupo de Tratamiento**	**Número de cerdos**	**Media**	**Mediana**	**P**
Aparición de la Viremia	CP	38	111,90 días	113,00 días	0,7843
	IVP	36	109,50 días	113,00 días	ns
	CP-IVP		*2,4 días*		
Duración de la Viremia	CP	38	27,00 días	27,50 días	**<0,0001**
	IVP	36	17,50 días	6,50 días	*******
	CP-IVP		*9,50 días*		
Final de la Viremia	CP	38	138,90 días	141,00 días	**0,0033**
	IVP	36	127,00 días	122,50 días	******
	CP-IVP		*11,9 días*		
Días de Muestreo Positivos	CP	39	3,70 días	3,00 días	**0,0082**
	IVP	47	1,80 días	1,00 días	******
	CP-IVP		*1,9 días*		
Suma Media de gE (log10)	CP	39	18,79 gE	17,21 gE	**<0,0001**
	IVP	47	9,12 gE	5,38 gE	*******
	CP-IVP		*9,67* gE		

gE: suma de equivalentes genómicos por ml
P: valor p del ensayo de Wilcoxon Mann-Whitney para comparaciones entre grupos; ns: no significativo, p>0,05; ** significativo, p < 0,01; *** significativo, p < 0,001

Comparados con los animales con titulación alta tratados con placebo, los animales con titulación alta vacunados tenían una duración 9,5 días más corta de la viremia, una finalización 11,9 días más temprana de la viremia, 1,9 días menos de días de muestreo virémico y una reducción de aproximadamente 2 veces de la suma de equivalentes genómicos/ml en el transcurso del estudio. Estos resultados indican que también en presencia de titulaciones altas de anticuerpo materno el IVP puede aún reducir significativamente la viremia en la sangre (finalización de la viremia, duración de la viremia, carga de virus).

Correlación de las Titulaciones de Anticuerpo en el Momento de la Vacunación con la Ganancia de Peso

Posteriormente, se investigó si la titulación de anticuerpo inicial tenía algún efecto en la ganancia de peso en el transcurso del estudio. La Tabla 2 presenta la correlación de la titulación de anticuerpo inicial con la ganancia de peso a diferentes intervalos de tiempo determinada por el cálculo del coeficiente de rangos de Spearman y el valor p.

Se vio una correlación negativa estadísticamente significativa entre la titulación de anticuerpo y la ganancia de peso en los dos grupos de tratamiento en las semanas de estudio 0 a 7 lo que indica que una titulación alta de anticuerpo materno influye negativamente en el desarrollo de la ganancia de peso en la fase de crianza. No se observó ninguna otra correlación estadísticamente significativa entre la titulación de anticuerpo inicial y la ganancia de peso durante los diferentes intervalos de tiempo. Por lo tanto, puede concluirse que el nivel de titulación del anticuerpo materno no tenía ninguna influencia en la ganancia de peso a partir de las 10 semanas de edad (semana 7 de estudio) en adelante ni en los animales vacunados ni en los animales tratados con placebo.

Tabla 2: Correlación de la titulación de anticuerpo de PCV2 en el momento de la vacunación con la ganancia de peso corporal durante el transcurso del estudio

		Correlación de la titulación de anticuerpo en el momento de la vacunación con la ganancia de peso			
		Semana de estudio 0-7	**Semana de estudio 7-12**	**Semana de estudio 12-17**	**Semana de estudio 17-22**
CP	r	-0,09623	0,03501	-0,00521	-0,02774
	P	**0,0086 ****	0,3425 ns	0,8884 ns	0,4617 ns
	n	744	737	728	706
IVP	r	-0,09748	0,04309	-0,00954	0,02694
	P	**0,0077 ****	0,2440 ns	0,7974 ns	0,4710 ns
	n	746	733	727	718

r: coeficiente de correlación por rangos de Spearman

P: valor p del ensayo en r=0: ns: no significativo, p>0,05;

** significativo, p< 0,01

n: Número de animales

De acuerdo con este descubrimiento no se pudieron encontrar diferencias respecto al peso corporal vivo cuando se compararon animales con titulación baja y alta del grupo vacunado. La Figura 2 muestra que el peso corporal después de la aparición de la viremia (semana de estudio 17 y 22) era comparable independientemente del nivel de la titulación inicial de anticuerpo (Figura 2).

Además, los animales vacunados con una titulación alta de anticuerpo en el momento de la vacunación (> 1:1.000) también mostraron un peso corporal significativamente mayor después de la aparición de la viremia comparado con los animales tratados con placebo con titulaciones altas de anticuerpo iniciales. Como puede observarse en la Figura 3, el peso corporal (LSMean) en la semana 17 de estudio y en la semana 22 de estudio era significativamente mayor en los ‘animales con titulación alta’ vacunados (semana 17 de estudio: 1,55 kg, p = 0,0328; semana 22 de estudio: 3,06 kg, p = 0,0007) que en los ‘animales con titulación alta’ tratados con placebo. Conjuntamente, estos descubrimientos demuestran que no existe interferencia del IVP con la titulación de anticuerpo en el momento de la vacunación.

Conclusión

Para analizar una posible interferencia del anticuerpo materno se correlacionó la titulación inicial del anticuerpo con los dos parámetros de eficacia viremia en sangre y peso corporal vivo. Comparados con los 'animales con titulación alta' tratados con placebo se vieron los siguientes descubrimientos significativos estadísticamente para los 'animales con titulación alta' vacunados:

- reducción en la pérdida de ganancia de peso
- duración más corta de la viremia y finalización más temprana de la viremia
- carga de virus más baja

Ejemplo 4

Eficacia de ORF-2 de PCV2 (Ingelvac® CircoFLEX™) en animales jóvenes

que tienen anticuerpos anti-PCV2 respecto a depleción linfoide, inflamación linfoide, e inmunohistoquímica (IHC) linfoide

El objeto de este estudio ciego de exposición a vacuna fue evaluar a qué edad los cerdos vacunados con la Vacuna de Circovirus Porcino, Tipo 2, Muerto en Vector Baculovirus establecían inmunidad en presencia de anticuerpos procedentes de la madre de Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2). Se analizaron tres parámetros principales después de la exposición. Estos tres parámetros incluyeron depleción linfoide, inflamación linfoide e inmunohistoquímica (IHC) linfoide. Para demostrar inmunidad en presencia de anticuerpos de PCV2 procedentes de la madre, los cerdos criados convencionalmente vacunados con vacuna de PCV2 a las 3 semanas de edad o a las 8 semanas de edad, deben mostrar diferencias significativas estadísticamente ($p<0,05$) para depleción linfoide, inflamación linfoide e IHC linfoide, comparados con cerdos control sometidos a exposición tratados con el Producto Control a las 3 semanas de edad.

Realización del estudio

Ciento veinte (120) cerdos criados convencionalmente, 21 días de edad en el Día 0 (D0), se asignaron completamente al azar a uno de cinco grupos de tratamiento. En el D0, se recogieron muestras de sangre de todos los cerdos,

- El Grupo 1a se trató con el Producto Veterinario en Investigación (IVP; vacuna de referencia de PCV2) a las 3 semanas de edad.
- El Grupo 1b se trató con el Producto Veterinario en Investigación (IVP; vacuna de referencia de PCV2) a las 8 semanas de edad.
- El Grupo 2 se trató con Producto Control (CP) a las 3 semanas de edad.

Los cerdos se observaron para valoraciones clínicas después de la vacunación desde D-1 a D59. Se recogieron muestras de sangre adicionales antes de la exposición en D14, D28, D42, D56 y D63. En la Tabla 3 siguiente se muestra un resumen de las Titulaciones Medias Geométricas (GMT) serológicas del grupo PCV2 antes de la exposición.

Tabla 3: Titulaciones Medias Geométricas Serológicas del Grupo PCV2 Antes de la Exposición

Grupo – Tratamiento	**Serología PCV2 - GMT**					
	D0	**D14**	**D28**	**D42**	**D56**	**D63**
Grupo 1a IVP administrado a las 3 semanas de edad	556,5	252,8	142,0	56,2	32,0	51,3
Grupo 1b IVP administrado a las 8 semanas de edad	476,2	308,2	151,6	36,2	29,3	48,3
Grupo 2 CP administrado a las 3 semanas de edad	513,8	310,7	134,3	36,9	16,9	24,5

Todos los cerdos restantes recibieron 2,0 mL de hemocianina de lapa (KLH) emulsionada en adyuvante de Freund incompleto (ICFA) IM en D60 (Día Después de la Exposición (DPC) -3) y D66 (DPC 3). En D63 (DPC 0), los cerdos restantes recibieron 1,0 mL de material de exposición de PCV2 Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory (ISUVDL) (4,75 $\log_{10}$ $DICT_{50}$/mL) IM y 1,0 mL del mismo material IN. Se recogieron los pesos corporales, temperaturas rectales, observaciones clínicas, muestras de sangre y torundas nasales en el día de la exposición y periódicamente después de la exposición. En la necropsia de cada cerdo, se anotaron las grandes lesiones y se recogieron muestras de tejido pulmonar y linfoide. Los tejidos pulmonar y linfoide se examinaron microscópicamente por ISUVDL para detectar lesiones y para detectar la presencia de antígeno PCV2 por ensayo de IHC. En la Tabla 4 siguiente se muestra una descripción general de la fase de exposición del estudio.

Tabla 4: Fase de Exposición del Estudio

Grupo - Tratamiento	**Número**	**KLH/ ICFA En D60 (DPC -3)**	**Exposición a PCV2 en D63 (DPC 0)**	**KLH/ ICFA En D66 (DPC 3)**	**Día de la Necropsia**
Grupo 1a IVP administrado a las 3 semanas de edad	20	Sí	Sí	Sí	D87 (DPC 24) o D88 (DPC 25)
Grupo 1b IVP administrado a las 8 semanas de edad	21	Sí	Sí	Sí	D87 (DPC 24) o D88 (DPC 25)
Grupo 2 CP administrado a las 3 semanas de edad	20	Sí	Sí	Sí	D87 (DPC 24) o D88 (DPC 25)

En D86, las titulaciones medias geométricas eran 906,6, 2.447,1, 2.014,9, respectivamente.

Resultados

Después de la exposición a pulso de PCV2 en D63 y la necropsia posterior, el Grupo 1a tenía una proporción más baja estadísticamente significativa de cerdos positivos para la depleción linfoide (**p=0,0084**), una proporción más baja de cerdos positivos para la inflamación linfoide (**p=0,0079**), y una proporción más baja de cerdos con tejidos linfoides positivos por IHC **(p=0,0031)**, todo en comparación con el Grupo 2. Después de la exposición a PCV2, el Grupo 1b tenía una proporción más baja estadísticamente significativa de cerdos positivos para la depleción linfoide (**p=0,0148**), una proporción más baja de cerdos positivos para la inflamación linfoide (**p=0,0036**), y una proporción más baja de cerdos con tejidos linfoides positivos por IHC **(p=0,0013)**, todo en comparación con el Grupo 2. En la Tabla 5 siguiente se muestra un resumen de los resultados de los parámetros principales de eficacia para los Grupos 1a, 1b y 2.

Tabla 5: Resumen de los Resultados de los Parámetros Principales de Eficacia para los Grupos 1a y 1b comparados con el Grupo 2

Grupo - Tratamiento	Estado Serológico de PCV2 en el Día 0	Depleción Linfoide (+/total)	Inflamación Linfoide (+/total)	IHC Linfoide (+/total)
Grupo 1a IVP a las 3 semanas de edad	Seropositivo	1/20 (5%) ***p=0,0084**	3/20 (15%) ***p=0,0079**	3/20 (15%) ***p=0,0031**
Grupo 1b IVP a las 8 semanas de edad	Seropositivo	2/21 (9,5%) ***p=0,0148**	3/21 (14,3%) ***p=0,0036**	3/21 (14,3%) ***p=0,0013**
Grupo 2 CP a las 3 semanas de edad	Seropositivo	9/20 (45%)	12/20 (60%)	13/20 (65%)

* valor p comparado con el Grupo 2 – Ensayo Exacto de Fisher

Se encontraron diferencias significativas entre los Grupos 1a y 1b comparados con el Grupo 2 para la inflamación pulmonar microscópica (**p≤0,0407**), pero no diferencias significativas entre estos grupos para el ensayo de tejido pulmonar positivo para el antígeno PCV2 por ensayo de IHC (p≥ 0,2317). No se encontraron diferencias significativas entre los Grupos 1a y 1b comparados con el Grupo 2 para las valoraciones clínicas después de la vacunación, ADG, signos clínicos después de la exposición, pirexia, secreción nasal de PCV2, % de puntuaciones pulmonares totales y linfadenopatía.

En conclusión, el Grupo 1a, vacunado a las 3 semanas de edad y que tiene una GMT de 556,6 en el momento de la vacunación, estaba protegido significativamente frente a la depleción linfoide, inflamación linfoide, y ensayo de tejidos linfoides positivos para el antígeno PCV2 por ensayo de IHC, comparado con el Grupo 2. El Grupo 1b, vacunado a las 8 semanas de edad y que tiene una GMT de 151,6 una semana antes de la vacunación, estaba protegido significativamente frente a la depleción linfoide, inflamación linfoide y ensayo de tejidos linfoides positivos para el antígeno PCV2 por ensayo de IHC, comparado con el Grupo 2. Los cerdos con anticuerpos de PCV2 procedentes de la madre estaban protegidos frente a la Enfermedad Asociada con el Circovirus Porcino (PCVAD) cuando se vacunaban tan pronto como a las 3 semanas de edad.

Listado de secuencias

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

<120> Tratamiento de cerdos con antígeno PCV2

<130> P01-2169

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

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

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

<400> 1
ccgccatg 8

<210> 2
<211> 6
<212> DNA

<213> Artificial

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

<400> 2
gaattc 6

<210> 3
<211> 713
<212> DNA
<213> Circovirus porcino

<400> 3
cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgcac cttcggatat actgtggaga 180
aggaaaaatg gcatcttcaa cacccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240
ttgttccccc gggaggggag accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaaggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttaa accctaaatg aat 713

<210> 4
<211> 713
<212> DNA
<213> Circovirus porcino

<400> 4
ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
ctaccacagt cacaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
ttgttccccc gggaggggag accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaaggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttga accctaagaa ttc 713

<210> 5
<211> 233
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225            230
```

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

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225            230
```

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

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

<400> 7

```
gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcgttaccg cagaagaaga    60
caccgccccc gcagccatct tggccagatc ctccgccgcc gcccctggct cgtccacccc   120
cgccaccgct accgttggag aaggaaaaat ggcatcttca acacccgcct ctcccgcacc   180
ttcggatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgccct cctgggcggt ggacatgatg   240
agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggaggggggga ccaacaaaat ctctataccc   300
tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggccctgctc ccccatcacc   360
cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag   420
gccacagccc taacctatga cccatatgta aactactcct cccgccatac aatcccccaa   480
cccttctcct accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat   540
tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggctga ggctacaaac ctctagaaat   600
gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat   660
atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagaccc cccacttgaa   720
ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggccgc                             756
```

<210> 8

<211> 10387
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Este es el circovirus porcino de tipo 2, construcción de ORF-2, que incluye secuencias codificantes de baculovirus y pGEM T-easy.

<400> 8

```
aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgtttatg agataagatt    60
gaaagcacgt gtaaaatgtt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt   120
ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacctttgc ggcccgagtt gtttgcgtac   180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt   240
ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca ttttttgcgg   300
gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata   360
gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccgg catgttggtg   420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tggtgtgcag atatttaatg   480
cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac   540
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc   600
tttaacaaat actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaacta   660
tgcttcgctt gctccgttta gcttgtagcc gatcagtggc gttgttccaa tcgacggtag   720
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacgtt gatgttacgt ttatgctttt   780
ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgtca   840
cgcacaacac cggatgtttg cgcttgtccg cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat   900
ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttcgtctt   960
tcttttgcat ggtttcctgg aagccggtgt acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg  1020
tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgtccttgat ggcaacgatg cgttcaataa  1080
actcttgttt tttaacaagt tcctcggttt tttgcgccac caccgcttgc agcgcgtttg  1140
tgtgctcggt gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctcccgtt  1200
gtttgatcgc gggatcgtac ttgccggtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa  1260
gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc  1320
cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaaatacag cgggtcgccc cttttcacga  1380
cgctgttaga ggtagggccc ccattttgga tggtctgctc aaataacgat ttgtatttat  1440
tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaaactg ttagcgacgt  1500
ccttggccac gaaccggacc tgttggtcgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat  1560
cttctccaaa tttaaattct ccaattttaa cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat  1620
```

```
tttgcaacaa ctattgtttt ttaacgcaaa ctaaacttat tgtggtaagc aataattaaa  1680
tatgggggaa catgcgccgc tacaacactc gtcgttatga acgcagacgg cgccggtctc  1740
ggcgcaagcg gctaaaacgt gttgcgcgtt caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag  1800
tacagttttg atttgcatat taacggcgat tttttaaatt atcttattta ataaatagtt  1860
atgacgccta caactccccg cccgcgttga ctcgctgcac ctcgagcagt tcgttgacgc  1920
cttcctccgt gtggccgaac acgtcgagcg ggtggtcgat gaccagcggc gtgccgcacg  1980
cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcga aggcacgtcg gcctccaagt  2040
ggcaatattg gcaaattcga aaatatatac agttgggttg tttgcgcata tctatcgtgg  2100
cgttgggcat gtacgtccga acgttgattt gcatgcaagc cgaaattaaa tcattgcgat  2160
tagtgcgatt aaaacgttgt acatcctcgc ttttaatcat gccgtcgatt aaatcgcgca  2220
atcgagtcaa gtgatcaaag tgtggaataa tgttttcttt gtattcccga gtcaagcgca  2280
gcgcgtattt taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc  2340
aataatatat tatgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gcccgttgtc gcatctcaac  2400
acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag cttgcgacgc aacgtgcacg  2460
atctgtgcac gcgttccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca  2520
tgacccccgt agtgacaacg atcacgccca aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt  2580
atgtcggtga cgttaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc  2640
tggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt  2700
agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atcccgatga ttttattgat  2760
aaattgaccc taactccata cacggtattc tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc  2820
ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccgcccacta ttaatgaaat taaaaattcc  2880
aattttaaaa aacgcagcaa gagaaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa  2940
aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg  3000
aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggtatgt acaggaagag gtttatacta  3060
aactgttaca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaagtgtg aaaaccgatg tttaatcaag  3120
gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcat gcatctttta  3180
atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aaatgaaaac tgtcgacaag  3240
ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata  3300
aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa  3360
catttgtagt attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgctgagg taatatttaa  3420
aatcattttc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac  3480
tagacgcctt gtcgtcttct tcttcgtatt ccttctcttt ttcatttttc tcctcataaa  3540
aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aatttttgt  3600
tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtttttc  3660
tgtaatttac aacagtgcta ttttctggta gttcttcgga gtgtgttgct ttaattatta  3720
aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt  3780
acgcagcttc ttctagttca attacaccat tttttagcag caccggatta acataacttt  3840
ccaaaatgtt gtacgaaccg ttaaacaaaa acagttcacc tccctttttct atactattgt  3900
ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaaactaat  3960
atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaat  4020
gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa  4080
aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcgg atcagatctg  4140
cagcggccgc gggaattcga tccgccatga cgtatccaag gaggcgttac cgcagaagaa  4200
gacaccgccc ccgcagccat cttggccaga tcctccgccg ccgcccctgg ctcgtccacc  4260
cccgccaccg ctaccgttgg agaaggaaaa atggcatctt caacacccgc ctctcccgca  4320
ccttcggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctcctgggcg gtggacatga  4380
tgagatttaa tattgacgac tttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac  4440
cctttgaata ctacagaata agaaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tcccccatca  4500
cccagggtga taggggagtg ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa  4560
aggccacagc cctaacctat gacccatatg taaactactc ctcccgccat acaatccccc  4620
aacccttctc ctaccactcc cgttacttca cacccaaacc tgttcttgac tccactattg  4680
attacttcca accaaataac aaaaggaatc agctttggct gaggctacaa acctctagaa  4740
atgtggacca cgtaggcctc ggcactgcgt tcgaaaacag taaatacgac caggactaca  4800
atatccgtgt aaccatgtat gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccacttg  4860
aaccctaaga attctatcac tagtgaattc gcggccgccg gccgctccag aattctagaa  4920
ggtacccggg atcctttcct gggacccggc aagaaccaaa aactcactct cttcaaggaa  4980
atccgtaatg ttaaacccga cacgatgaag cttgtcgttg gatggaaagg aaaagagttc  5040
tacagggaaa cttggacccg cttcatggaa gacagcttcc ccattgttaa cgaccaagaa  5100
gtgatggatg ttttccttgt tgtcaacatg cgtcccacta gacccaaccg ttgttacaaa  5160
ttcctggccc aacacgctct gcgttgcgac cccgactatg tacctcatga cgtgattagg  5220
atcgtcgagc cttcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcagcct ggctaagaag  5280
```

```
ggcggcggct gcccaataat gaaccttcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagttc  5340
atcgatcgtg tcatctggga gaacttctac aagcccatcg tttacatcgg taccgactct  5400
gctgaagagg aggaaattct ccttgaagtt tccctggtgt tcaaagtaaa ggagtttgca  5460
ccagacgcac ctctgttcac tggtccggcg tattaaaaca cgatacattg ttattagtac  5520
atttattaag cgctagattc tgtgcgttgt tgatttacag acaattgttg tacgtatttt  5580
aataattcat taaatttata atctttaggg tggtatgtta gagcgaaaat caaatgattt  5640
tcagcgtctt tatatctgaa tttaaatatt aaatcctcaa tagatttgta aaataggttt  5700
cgattagttt caaacaaggg ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt  5760
tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc  5820
gtttgtgttt tgttttgtaa taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta  5880
tttctttcat cactgtcgtt agtgtacaat tgactcgacg taaacacgtt aaataaagct  5940
tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattaggcc gattatcgtc gtcgtcccaa  6000
ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta  6060
attgtgtcgg ctaacacgtc cgcgatcaaa tttgtagttg agctttttgg aattatttct  6120
gattgcgggc gtttttgggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac  6180
acgttagaaa gcgatggtgc aggcggtggt aacatttcag acggcaaatc tactaatggc  6240
ggcggtggtg gagctgatga taaatctacc atcggtggag gcgcaggcgg ggctggcggc  6300
ggaggcggag gcggaggtgg tggcggtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct  6360
ttaggcaaca cagtcggcac ctcaactatt gtactggttt cgggcgccgt ttttggtttg  6420
accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag cttccaacaa ttgttgtctg  6480
tcgtctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca  6540
gacatcgatg gtggtggtgg tggtggaggc gctggaatgt taggcacggg agaaggtggt  6600
ggcggcggtg ccgccggtat aatttgttct ggtttagttt gttcgcgcac gattgtgggc  6660
accggcgcag gcgccgctgg ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcttcgagg cagcgcttgg  6720
ggtggtggca attcaatatt ataattggaa tacaaatcgt aaaaatctgc tataagcatt  6780
gtaatttcgc tatcgtttac cgtgccgata tttaacaacc gctcaatgta agcaattgta  6840
ttgtaaagag attgtctcaa gctcgccgca cgccgataac aagccttttc atttttacta  6900
cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgacgta catgtatgct ttgttgtcaa  6960
aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt  7020
tgtcgtaaat gttgtttttg ataatttgcg cttccgcagt atcgacacgt tcaaaaaatt  7080
gatgcgcatc aattttgttg ttcctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc  7140
tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgctgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa  7200
actgcaaaaa cgtcaaaact cggtataaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta  7260
ttttatcgca caagcccact agcaaattgt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt  7320
ttaacgctga cgaaataaaa gttcaccagt taatgagcga ccacccaaat tttataaaaa  7380
tctattttaa tcacggttcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc  7440
ccgatttatt tgaaacacta caaattaaag gcgagctttc gtaccaactt gttagcaata  7500
ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg  7560
acataaaact cgaaaatgtc ttatatttcg aagcacttga tcgcgtgtat gtttgcgatt  7620
acggattgtg caaacacgaa aactcactta gcgtgcacga cggcacgttg gagtatttta  7680
gtccggaaaa aattcgacac acaactatgc acgtttcgtt tgactggtac gcggcgtgtt  7740
aacatacaag ttgctaacgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc  7800
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta  7860
atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa  7920
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat  7980
tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg  8040
agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc  8100
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt  8160
gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag  8220
tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc  8280
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc  8340
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt  8400
cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt  8460
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc  8520
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa  8580
gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa  8640
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg  8700
tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga  8760
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg  8820
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg  8880
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt  8940
```

```
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact  9000
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat  9060
gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg  9120
aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg  9180
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat  9240
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc  9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt  9360
cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc  9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga  9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc  9540
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa  9600
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta  9660
acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg  9720
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg  9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat  9840
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacaa atagggggttc cgcgcacatt  9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa  9960
aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct  10020
ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag  10080
acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc  10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg  10200
cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga  10260
agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc  10320
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc  10380
cagtgcc                                                  10387
```

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

<400> 9

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


His Leu Gly Gln
        20
```

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

<400> 10

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

Thr Leu Ser
```

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

<220>
<223> Esta es una secuencia de aminoácidos para cirovirus porcino de tipo 2, marco de lectura abierto 2.

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225                 230
```

REIVINDICACIONES

1. El uso de una cantidad eficaz de un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) para la preparación de una composición inmunogénica para tratamiento o profilaxis de

a) infección por PCV2 en animales; o

b) para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales,

en donde dichos animales tienen anticuerpos anti-PCV2 con un título de anticuerpos anti-PCV2 mayor que 1:1000 según se determina en un ensayo de inmunofluorescencia indirecta específico de PCV,

en donde dicho antígeno es una proteína PCV2 ORF-2 y dicha composición inmunogénica se administra solo una vez.

2. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) para uso en un método para tratamiento o profilaxis de

c) infección por PCV2 en animales; o

d) para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados con una infección por PCV2 en animales,

en donde dichos animales tienen anticuerpos anti-PCV2 con un título de anticuerpos anti-PCV2 mayor que 1:1000 según se determina en un ensayo de inmunofluorescencia indirecta específico de PCV,

en donde dicho antígeno es una proteína PCV2 ORF-2 y dicha composición inmunogénica se administra solo una vez.

3. El uso o la composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde los anticuerpos anti-PCV2 son anticuerpos de origen materno.

4. El uso o la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el antígeno PCV2 se administra en el día 7 de edad o después.

5. El uso o la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el antígeno PCV-2 se administra en el día 14 de edad o después.

6. El uso o la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el antígeno PCV-2 se administra no después de la semana 7 de edad.

7. El uso o la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para acortar la fase de viremia de 5 o más días comparado con los animales de un grupo control no tratado de la misma especie.

8. El uso o la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho antígeno PCV-2 es un ORF-2 de PCV2 recombinante expresado en un baculovirus.

9. El uso o la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el nivel de inclusión del antígeno PCV2 ORF2 en dicha composición inmunogénica es de 15 a 400 µg.

10. El uso o la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho tratamiento o profilaxis de infección por PCV2 da como resultado una mejora en comparación con animales de un grupo control no tratado de la misma especie respecto a un parámetro de eficacia de la vacuna seleccionado del grupo que consiste en una reducción de la pérdida de ganancia de peso, una menor duración de la viremia, una finalización más temprana de la viremia, una carga de virus más baja, o combinaciones de éstos.

11. El uso o la composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el animal es un cerdo.

Figura 1:

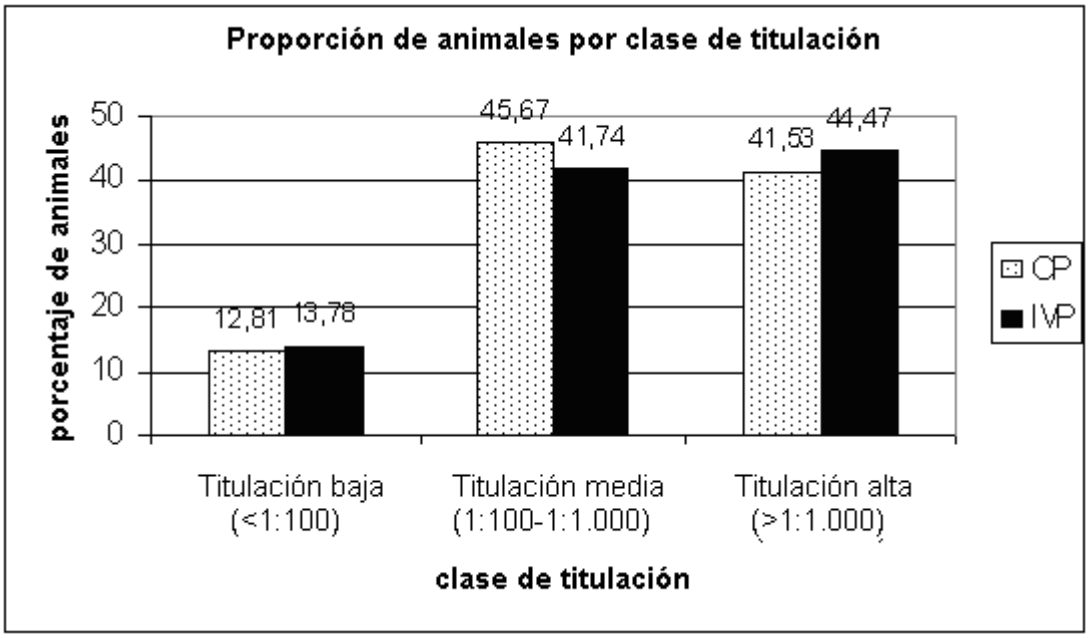


Figura 2:

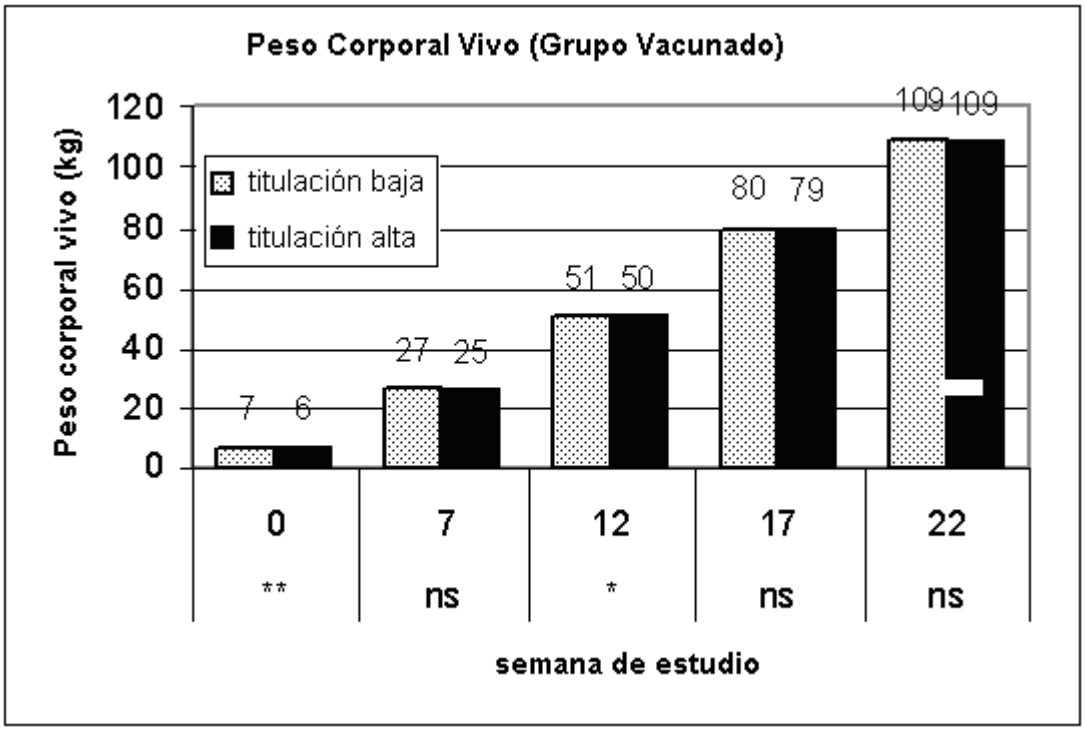
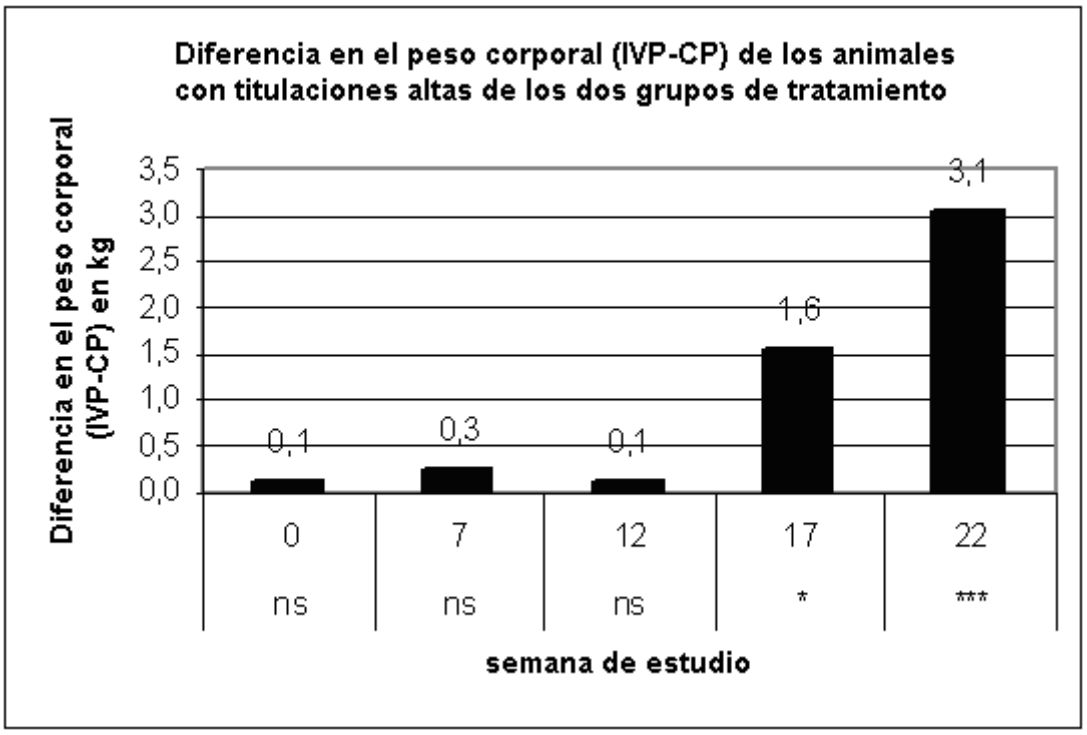


Figura 3:


Diferencia en el peso corporal (IVP-CP) de los animales con titulaciones altas de los dos grupos de tratamiento
Diferencia en el peso corporal (IVP-CP) en kg
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,1
0,3
0,1
1,6
3,1
0
ns
7
ns
12
ns
17
*
22
***
semana de estudio