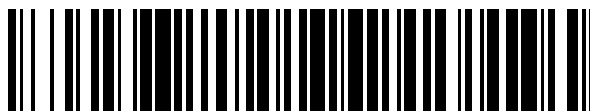


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 903**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2006 PCT/US2006/062662**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2007 WO 2007/094893**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006 E 06850366 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 1976558**

54 Título: **Composición inmunogénica de PCV2 para reducir los síntomas clínicos en cerdos**

30 Prioridad:

29.12.2005 US 755016 P
17.10.2006 US 829809 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP

Observaciones:

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

ES 2 625 903 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición inmunogénica de PCV2 para reducir los síntomas clínicos en cerdos

Listado de secuencias

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

5 Antecedentes de la invención

Campo de la Invención

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

Descripción de la Técnica Anterior

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

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

Blanchard et al (Vaccine 21, 2003, 4565-4575) informan sobre dos ensayos de sensibilización y refuerzo relacionados con una vacuna PCV2. El primer ensayo emplea tres inyecciones: dos inyecciones separadas de ADN que codifican la proteína ORF2 y/u ORF1 y GM-CSF, seguidas por una inyección de ORF2/ORF1 recombinante de PCV2. En el segundo ensayo, los lechones recibieron o bien dos inyecciones con ADN (primer grupo) o dos inyecciones con las subunidades proteicas (segundo grupo), en el que la vacuna de subunidades contenía tanto las proteínas ORF1 como las proteínas ORF2 recombinantes de PCV2. Se informa que ambos protocolos de múltiples inyecciones conducen a efectos protectores contra una provocación con PCV2.

Por consiguiente, lo que se necesita en la técnica es una composición inmunogénica para el tratamiento de varias

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

Descripción de la invención

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

La invención es como se expone en las reivindicaciones.

10 En general, no se observaron sucesos adversos ni reacciones en el sitio de inyección para ninguna de las composiciones inmunogénicas de antígeno de PCV2 tal como se utilizan en esta memoria. Así, las composiciones inmunogénicas utilizadas en esta memoria parecen ser seguras cuando se administran a cerdos jóvenes, preferiblemente a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas, lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas. De acuerdo con una realización adicional, las composiciones inmunogénicas utilizadas en esta memoria para cualquier uso medicinal descrito en esta memoria se administran a cerdos de 3 semanas de edad o mayores, preferiblemente de 2 semanas de edad o mayores, pero lo más preferiblemente no mayores de 15 semanas de edad.

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

20 Así, un aspecto de la presente descripción se refiere al uso de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, para la preparación de un medicamento para la prevención de linfadenopatía en cerdos. Preferiblemente, dicho medicamento es eficaz para la prevención de linfadenopatía asociada con infecciones por PCV2 en cerdos. Todavía más preferiblemente, dicho medicamento es eficaz para la prevención de linfadenopatía asociada con infecciones por PCV2 en cerdos, cuando se administra a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas y, lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas.

30 Se describe además un método para el tratamiento de linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes en cerdos, que comprende la administración de una composición inmunogénica, según se proporciona con la presente, a un cerdo, comprendiendo dicha composición inmunogénica un antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2. Todavía en otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes asociados con una infección por PCV2 en cerdos, que comprende la administración de una composición inmunogénica, según se proporciona con la presente, a un cerdo, comprendiendo dicha composición inmunogénica un antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, dicho tratamiento da como resultado la disminución, reducción, prevención y/o curado de la linfadenopatía, agotamiento linfoide y/o histiocitos multinucleados/gigantes en cerdos que reciben dicha composición inmunogénica. Dichos métodos de tratamiento comprenden, además, la administración de dicha composición inmunogénica a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas, y lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas.

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

45 Así, un aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, para la preparación de un medicamento para la prevención de linfadenopatía, en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, p. ej. aborto, mortalidad perinatal, momificación de fetos,

etc., en cerdos. Preferiblemente, dicho medicamento es eficaz para la prevención de linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas asociados con una infección por PCV2 en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, p. ej. aborto, mortalidad perinatal, momificación de fetos, etc. De acuerdo con un aspecto adicional, dicho medicamento es eficaz para la prevención de linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, p. ej. aborto, mortalidad perinatal, momificación de fetos, etc. en cerdos, cuando se administra a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas, y lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas.

Además, también se describe un método para el tratamiento de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, p. ej. aborto, mortalidad perinatal, momificación de fetos, etc., comprendiendo dicho método la administración de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante, y más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente. Preferiblemente, la descripción también se refiere a un método para el tratamiento de la linfadenopatía en combinación con uno o una multiplicidad de los siguientes síntomas asociados con una infección por PCV2 en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, p. ej. aborto, mortalidad perinatal, momificación de fetos, etc., comprendiendo dicho método la administración de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante, y más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, a un cerdo. Preferiblemente, dicho tratamiento resulta en la disminución o reducción de la linfadenopatía, y uno o más de los siguientes síntomas asociados con una infección por PCV2 en cerdos: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos de la reproducción, p. ej. aborto, mortalidad perinatal, momificación de fetos, etc. Dichos métodos de tratamiento comprenden, además, la administración de la composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante, y más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2, según se proporciona en esta memoria, a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas, y lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas.

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

Así, un aspecto de la descripción se refiere al uso de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente un antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente, proteínas ORF2 de PCV2 según se proporciona con la presente, para la preparación de un medicamento para la prevención, disminución de la gravedad y/o reducción de una lesión similar a Pia, que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis* en cerdos. Dicho medicamento es eficaz para la prevención, disminución de la gravedad y/o reducción de lesiones similares a PIA que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis*, cuando se administra a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas y, lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas.

Además, la descripción también se refiere a un método para el tratamiento de lesiones similares a Pia, que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis*, comprendiendo dicho método la administración de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante y, más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona en esta memoria, a un cerdo. Preferiblemente, dicho tratamiento resulta en la disminución o reducción de las lesiones similares a Pia que se sabe están normalmente asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis*. Los métodos de tratamiento arriba descritos comprenden la administración de la composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, preferiblemente antígeno de PCV2 recombinante, y más preferiblemente proteína ORF2 de PCV2 según se proporciona en esta memoria, a cerdos no mayores de 15 semanas de edad, más preferiblemente no mayores de 6 semanas de edad, incluso más preferiblemente no mayores de 3 semanas y, lo más preferiblemente no mayores de 2 semanas.

La composición inmunogénica

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

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

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

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

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

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

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

proteína ORF2 de PCV2 que provoca una “respuesta inmunológica” en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, esta composición inmunogénica es capaz de provocar o de reforzar una respuesta inmune contra PCV2, confiriendo con ello inmunidad protectora contra una infección por PCV2 y una reducción en la incidencia, gravedad o prevención de uno o más, y preferiblemente de todos los síntomas clínicos asociados con la misma.

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

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

“Identidad de la secuencia”, tal como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, a saber una secuencia de referencia y una secuencia dada a comparar con la secuencia de referencia. La identidad de la secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de haber alineado óptimamente las secuencias para producir el grado más alto de similitud de secuencia, según se determina por el apareamiento entre las hebras de secuencias de este tipo. Tras el alineamiento, la identidad de la secuencia se constata sobre una base de posición-por-posición, p. ej. las secuencias son “idénticas” en una posición particular, si en esa posición los residuos de nucleótidos o aminoácidos son idénticos. El número total de identidades de posición de este tipo se divide luego por el número total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para dar el % de identidad de la secuencia. La identidad de la secuencia se puede calcular fácilmente por métodos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., comp., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., comp., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A.M. y Griffin, H. G., comps., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., comps., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), cuyas enseñanzas se incorporan en esta memoria como referencia. Métodos preferidos para determinar la identidad de la secuencia se diseñan para dar el apareamiento mayor entre las secuencias sometidas a ensayo. Métodos para determinar la identidad de la secuencia son codificados en programas de ordenador públicamente disponibles que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Ejemplos de este tipo de programas incluyen, pero no se limitan al paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible de NCBI y de otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), cuyas enseñanzas se incorporan en esta memoria como referencia). De forma óptima, estos programas alinean secuencias utilizando pesos de huecos por defecto con el fin de producir el nivel más alto de la identidad de secuencia entre las secuencias dada y de referencia. Como ilustración, por un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que tenga al menos, por ejemplo, un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de “identidad de secuencia” con una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado sea idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polinucleótidos dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, incluso más preferiblemente hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos que tenga al menos un 85%, preferiblemente un 90%, incluso más preferiblemente un 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 15%, preferiblemente el 10%, incluso más preferiblemente el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede estar suprimido o sustituido con otro nucleótido, o un cierto número de nucleótidos de hasta el 15%, preferiblemente el 10%, incluso más preferiblemente el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones terminales 5' ó 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezclado individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, por un polipéptido con una

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

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

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

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

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

- i) un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11,
- ii) cualquier polipéptido que es al menos un 80% homólogo con el polipéptido de i),
- iii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos de i) y/o ii),
- iv) la porción inmunogénica de iii), que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos incluidos en las secuencias de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11,
- v) un polipéptido que es codificado por un ADN que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
- vi) cualquier polipéptido que es codificado por un polinucleótido que es al menos un 80% homólogo con el polinucleótido de v),
- vii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos codificados por el polinucleótido de v) y/o vi),
- viii) la porción inmunogénica de vii), en donde el polinucleótido que codifica dicha porción inmunogénica comprende al menos 30 nucleótidos contiguos incluidos en las secuencias de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

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

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

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

El polipéptido ORF2 de PCV2 utilizado en la composición inmunogénica descrita aquí se puede obtener de cualquier modo incluyendo aislamiento y purificación de ORF2 de PCV2, síntesis clásica de proteínas y metodología recombinante. Métodos preferidos para obtener polipéptido ORF2 de PCV2 se proporcionan en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 11/034.797, cuyas enseñanzas y contenido se incorpora aquí por referencia. En síntesis, células susceptibles son infestadas con un vector viral recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF2 de PCV2, el polipéptido ORF2 de PCV2 es expresado por el virus recombinante, y el polipéptido ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración y se inactiva por cualquier método convencional, preferiblemente utilizando etilenimina binaria, que luego se neutraliza para detener el proceso de inactivación.

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

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

La composición inmunogénica, tal como se describe en esta memoria, también se refiere a una composición que comprende **i)** cualesquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas arriba, preferiblemente en las concentraciones descritas arriba, **ii)** al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, **iii)** una porción del cultivo celular, **iv)** y agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 µm. Preferiblemente, BEI está presente en concentraciones eficaces para inactivar el baculovirus. Concentraciones eficaces se describen arriba.

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

tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI.

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

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

"Adyuvantes", tal como se utilizan en esta memoria, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, p. ej. Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (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 polietilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferiblemente tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitan, de manida (p. ej. oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isosteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados, y copolímeros de bloques de polioxipropileno-polioxitileno, en particular los productos Pluronic, en especial L121. Véase Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997).

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 un adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialquenoil-éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, nº 2, junio 1996). Personas expertas en la técnica también pueden aludir a la patente de EE.UU. nº 2.909.462 que describe polímeros acrílicos de este tipo reticulados con un compuesto polihidroxiado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos reemplazados por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, p. ej. vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener por sí mismos otros sustituyentes tal como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE.UU) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alil-sacarosa o con alil-pentaeritritol. Entre ellos se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferido, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

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

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

preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

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

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

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

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

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

Sorprendentemente, se ha encontrado que la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 de PCV2 era muy estable a lo largo de un periodo de 24 meses. También se ha encontrado que las composiciones inmunogénicas son muy eficaces para reducir los síntomas clínicos asociados con infecciones por PCV2. También se descubrió que las composiciones inmunogénicas que comprenden el baculovirus recombinante que expresa proteína ORF2 de PCV2 según se describe arriba, son sorprendentemente más eficaces que una composición inmunogénica que comprende el virus PCV2 completo en una forma inactivada o antígeno de ORF2 de PCV2 viral aislado. En particular, sorprendentemente, se ha encontrado que el baculovirus recombinante que expresa proteína ORF2 de PCV2 es eficaz en concentraciones muy bajas, lo que significa concentraciones de hasta 0,25 µg/dosis. Este alto potencial inmunogénico inesperado de la proteína ORF2 de PCV2 es Carbopol incrementado. Los Ejemplos 1 a 3 describen en detalle la producción de ORF2 de PCV2 que comprende composiciones inmunogénicas.

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere también a Ingelvac® CircoFLEX™, (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, MO, EE.UU.), CircoVac® (Merial SAS, Lyon, Francia), CircoVent

(Intervet Inc., Millsboro, DE, EE.UU.) o Suvaxyn PCV-2 One Dose® (Fort Dodge Animal Health, Kansas City, KA, EE.UU.).

Administración de la composición inmunogénica

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

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

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

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

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

Breve descripción de los dibujos

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

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

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los siguientes ejemplos recogen materiales y procedimientos preferidos de acuerdo con la presente invención.

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

Ejemplo 1

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

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

Después de ser sembrados con el baculovirus, los matraces se incubaron luego a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días y se agitaron también a 100 rpm durante ese tiempo. Los matraces utilizaban tapones ventilados para permitir el flujo de aire. De cada uno de los matraces se tomaron muestras cada 24 horas durante los siguientes 7 días. Después de la extracción, cada una de las muestras se centrifugó y tanto el sedimento como el sobrenadante se separaron y luego se microfiltraron a través de una membrana con un tamaño de poros de 0,45-1,0 μm .

Las muestras resultantes tenían la cantidad de ORF2 presente en ellas, cuantificada a través de un ensayo ELISA. El ensayo ELISA se efectuó con anticuerpo de captura Pab IgG Prot. G anti-PCV2 porcino purificado (diluido a razón de 1:250 en PBS), diluido a razón de 1:6000 en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6). 100 μL del anticuerpo se dispusieron luego en los pocillos de la placa de microtitulación, se sellaron e incubaron durante una noche a 37°C. La placa se lavó después tres veces con una solución de lavado que comprendía 0,5 mL de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100 mL de 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) y 899,5 mL de agua destilada. Subsiguientemente, se añadieron a cada uno de los pocillos 250 μL de una solución de bloqueo (5 g de leche en polvo no grasa Carnation (Nestle, Glendale, CA) en 10 mL de D-PBS QS hasta 100 mL con agua destilada). La etapa siguiente era lavar la placa de ensayo y luego añadir antígeno pre-diluido. El antígeno pre-diluido se produjo añadiendo 200 μL de solución diluyente (0,5 mL de Tween 20 en 999,5 mL de D-PBS) a cada uno de los pocillos en una placa de dilución. La muestra se diluyó luego a una relación de 1:240 y a una relación de 1:480, y 100 μL de

ES 2 625 903 T3

5 cada una de estas muestra diluidas se añadieron después a uno de los pocillos superiores en la placa de dilución (es decir, un pocillo superior recibió 100 µL de la dilución de 1:240 y el otro recibió 100 µL de la dilución de 1:480). Después se hicieron diluciones en serie para el resto de la placa separando 100 µL de cada uno de los pocillos sucesivos y transfiriéndolos al pocillo siguiente de la placa. Cada pocillo se mezcló antes de realizar la siguiente transferencia. El lavado de la placa de ensayo incluía el lavado de la placa durante tres veces con el tampón de lavado. La placa se selló después y se incubó durante una hora a 37°C antes de lavarla tres veces más con el tampón de lavado. El anticuerpo de detección utilizado era anticuerpo monoclonal contra ORF2 de PCV. Se diluyó a razón de 1:300 en solución diluyente y después se añadieron a los pocillos 100 µL del anticuerpo de detección diluido. La placa se selló después y se incubó durante una hora a 37°C antes de lavarla tres veces con el tampón de lavado. Luego se preparó diluyente conjugado añadiendo suero normal de conejo (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a la solución diluyente hasta una concentración del 1%. Anticuerpo conjugado anti-ratón de cabra (H+I)-HRP (Jackson ImmunoResearch) se diluyó en el diluyente de conjugado hasta 1:10.000. 100 µL del anticuerpo conjugado diluido se añadieron entonces a cada uno de los pocillos. La placa se selló después y se incubó durante 45 minutos a 37°C antes de lavarla tres veces con el tampón de lavado. 100 µL de sustrato (Sustrato TMB Peroxidasa, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), mezclados con un volumen igual de Sustrato Peroxidasa B (KPL) se añadieron a cada uno de los pocillos. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. 100 µL de solución de HCl 1 N se añadieron luego a todos los pocillos para detener la reacción. La placa se hizo pasar luego a través de un lector ELISA. Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Tabla 1 que figura a continuación:

20 Tabla 1

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

Estos resultados indican que cuando se prolonga el tiempo de incubación, la expresión de ORF2 en el sobrenadante de las células centrifugadas y los medios es mayor que la expresión en el sedimento de las células centrifugadas y los medios. Por consiguiente, al permitir que la expresión de ORF2 prosiga durante al menos 5 días

y que se recupere en el sobrenadante más que permitir que la expresión prosiga durante menos de 5 días y recuperar ORF2 de las células, proporciona un gran aumento en los rendimientos de ORF2 y una mejora significativa frente a los métodos anteriores.

Ejemplo 2

- 5 Este ejemplo proporciona datos en cuanto a la eficacia de la invención reivindicada en esta memoria. Un matraz de centrifugación de 1000 mL se sembró con aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células Sf+/ml en 300 mL de medio Excell 420. El matraz se incubó luego a 27°C y se agitó a 100 rpm. Subsiguientemente, el matraz se sembró con 10 mL de siembra de virus ORF2 de PCV2/Bac p+6 (el baculovirus recombinante que contiene el gen ORF2 de PCV2 ORF2 pasó 6 veces adicionales en las células de insectos Sf9) con 0,1 MOI después de 24 horas de incubación.
- 10 El matraz se incubó después a 27°C durante un total de 6 días. Después de la incubación, el matraz se centrifugó después y se recogieron e inactivaron tres muestras del sobrenadante resultante. El sobrenadante se inactivó haciendo que su temperatura alcanzara $37 \pm 2^\circ\text{C}$. A la primera muestra, una solución 0,4 M de hidrobromuro de 2-bromoetilenamina que había sido ciclada a etilenimina binaria (EBI) 0,2 M en NaOH 0,3 N se añadió al sobrenadante para dar una concentración final de BEI de 5 mM. A la segunda muestra, BEI 10 mM se añadió al sobrenadante. A la tercera muestra no se añadió BEI al sobrenadante. Las muestras se agitaron luego continuamente durante 48 h. Se añadió una solución de tiosulfato de sodio 1,0 M para dar una concentración mínima final de 5 mM para neutralizar toda BEI residual. La cantidad de ORF2 en cada muestra se cuantificó después utilizando el mismo proceso de ensayo ELISA que el descrito en el Ejemplo 1. Los resultados de este ensayo se pueden ver en la Tabla 2 que figura a continuación:

20 Tabla 2

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

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

Ejemplo 3

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

Tabla 3

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

Ejemplo 4

- 40 Este ejemplo somete a ensayo la eficacia de siete vacunas candidatas de PCV2 y define, además, parámetros de

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

Tabla 4. Diseño de Estudio General

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

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

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

10

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

20

Materiales y Métodos:

25 Este era un estudio de capacidad de provocación frente a la vacunación parcialmente ciego realizado en cerdos CDCD, de 9 a 14 días de edad el Día 0. Para ser incluidos en el estudio, los títulos IFA de PCV2 de cerdas eran ≤ 1:1000. Adicionalmente, el estado serológico de cerdas procedía de una piara PRRS-negativa conocida. Se sometió a ensayo a ventiocho (28) cerdas en cuanto al estado serológico de PCV2. Catorce (14) cerdas tenían un título de

PCV2 de ≤ 1000 y fueron transferidas al primer sitio de estudio. Ciento diez (110) cochinitos fueron proporcionados mediante cirugía por sección cesárea y estaban disponibles para este estudio el Día -4. El Día -3 se pesaron 108 cerdos CDCD en el primer sitio de estudio, se identificaron con etiquetas de oreja, se bloquearon por el peso y se asignaron al azar a 1 de 9 grupos, según se recoge antes en la tabla 4. Si cualquier animal de ensayo que cumplía los criterios de inclusión fue enrolado en el estudio y posteriormente fue excluido por cualquier motivo, el Investigador y Monitor consultó con el fin de determinar el uso de datos recogidos del animal en el análisis final. Se documentó la fecha en la que se excluyó a los cerdos enrolados y el motivo de la exclusión. Inicialmente no se excluyó a ninguna cerda. Un total de 108 de 110 cerdos disponibles fue asignado a uno de 9 grupos el Día -3. Los dos cerdos más pequeños (n^{os} 17 y 19) no fueron asignados a un grupo y estaban disponibles como extras, en caso necesario. Durante el transcurso del estudio, se retiró a varios animales. Cada uno de Cerdo n^o 82 (Grupo 9) el Día -1, Cerdo n^o 56 (Grupo 6) el Día 3, Cerdo n^o 53 (Grupo 9) el Día 4, Cerdo n^o 28 (Grupo 8) el Día 8, Cerdo n^o 69 (Grupo 8) el Día 7 y Cerdo n^o 93 (Grupo 4) el Día 9, fue encontrado muerto antes de la provocación. Estos seis cerdos no fueron incluidos en los resultados del estudio final. El cerdo n^o 17 (uno de los cerdos extra) fue asignado al Grupo 9. El restante cerdo n^o 19 extra fue excluido del estudio.

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

Tabla 5. Actividades de Estudio

Día de Estudio	Actividad de Estudio
-4, 0 a 49	Observaciones generales para la salud global y síntomas clínicos
-3	Pesado; distribuidos al azar en grupos; muestras de sangre tomadas de todos los cerdos
0	Examen de salud; administrados IVP N ^{os} 1-7 a los Grupos 1-7, respectivamente
0-7	Cerdos observados en cuanto a reacciones en los sitios de inyección
14	Grupo 7 reforzado con Vacuna n ^o 7 contra PCV2; muestras de sangre de todos los cerdos
14-21	Grupo 7 observado en cuanto a reacciones en los sitios de inyección
16-19	Tratados todos los cerdos con antibióticos (falta de datos)
19	Cerdos transportados desde el primer sitio de ensayo a un segundo sitio de ensayo
21	Grupos 1-9 tratados con KLH/ICFA
24	Muestras de sangre y de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos; pesados todos los cerdos; Grupos 1-8 enfrentados con material de provocación de PCV2

25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 47	Muestras de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos
27	Grupos 1-9 tratados con KLH/ICFA
31	Muestras de sangre tomadas de todos los cerdos
49	Muestras de sangre y de torunda nasal recogidas procedentes de todos los cerdos; pesados todos los cerdos; necropsia de todos los cerdos; lesiones burdas señaladas con énfasis localizadas en íctero y úlceras gástricas; pulmones evaluados en cuanto a lesiones; guardadas muestras de tejido recientes y fijadas con formalina; completada la fase viva del estudio

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

10 Los animales fueron alojados en el primer sitio de estudio en jaulas individuales en cinco recintos desde el nacimiento hasta aproximadamente 11 días de edad (aproximadamente el Día 0 del estudio). Cada recinto era idéntico en su distribución y consistía en jaulas de acero inoxidable individuales apiladas, siendo suministrado aire calentado y filtrado por separado a cada una de las unidades de aislamiento. Cada recinto disponía de calor y ventilación separados, proporcionando con ello una contaminación cruzada de aire entre los recintos. Los animales fueron alojados en dos edificios diferentes en el segundo sitio de estudio. El Grupo 9 (el grupo control estricto negativo) fue alojado por separado en un edificio de acabado convertido y los Grupos 1-8 fueron alojados en un edificio de crianza convertido. Cada grupo fue alojado en un redil separado (11-12 cerdos por redil) y cada redil proporcionaba aproximadamente 1 metro cuadrado por cerdo. Cada redil se encontraba sobre una cubierta elevada con pisos de lamas de plástico. Un foso debajo de los rediles servía como depósito de excrementos y desechos. 15 Cada edificio tenía sus sistemas calefactores y de ventilación separados, con escasa probabilidad de contaminación cruzada de aire entre los edificios.

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

25 Todos los cerdos de ensayo fueron tratados con vitamina E el Día -2, con inyecciones de hierro el Día -1 y con NAXCEL® (1,0 mL, IM, en jamones alternantes) los Días 16, 17, 18 y 19. Además, el Cerdo nº 52 (Grupo 9) fue tratado con una inyección de hierro el Día 3, el Cerdo 45 (Grupo 6) fue tratado con una inyección de hierro el Día 11, el Cerdo nº 69 (Grupo 8) fue tratado con NAXCEL® el Día 6, el Cerdo nº 74 (Grupo 3) fue tratado con dexametazona y penicilina el Día 14, y el Cerdo nº 51 (Grupo 1) fue tratado con dexametazona y penicilina el Día 13 y con NAXCEL® el Día 14 por diversos motivos de salud.

30 Mientras se encontraban en los dos sitios de estudio, los cerdos se encontraban bajo cuidado veterinario. Exámenes de la salud de los animales se realizaron el Día 0 y se registraron en el Formulario de Registro del Examen de Salud. Todos los animales gozaba de buen estado de salud y nutricional antes de la vacunación, según se determina por observación el Día 0. Se observó que todos los animales de ensayo gozaban de buen estado de salud y nutricional antes de la provocación. Las carcasas y los tejidos fueron desechados mediante vertido. La disposición final de los animales de estudio fue registrada en el Registro de Disposición Animal (Animal Disposition Record). 35

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

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

El Día 24, los cerdos asignados a los Grupos 1-8 recibieron 1,0 mL de material de provocación ISUVDL de PCV2 (5,11 log₁₀ TCID₅₀/mL), IM en la zona izquierda del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una

ES 2 625 903 T3

aguja estéril de 20g x 1". Se administró 1,0 mL adicional del mismo material, IN a cada cerdo (0,5 mL por fosa nasal) utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una cánula nasal.

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

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

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

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

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

45 De cada uno de los 103 cerdos a los que se realizó una necropsia en el segundo sitio de estudio, una muestra de tejido de las tonsilas, pulmones, corazón, hígado, nódulo linfático mesentérico, riñón y nódulo linfático inguinal se dispuso en un solo recipiente con formalina al 10% tamponada; mientras que otra muestra de tejido procedente de los mismos órganos antes mencionados se dispuso en un Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino Unido) y cada Whirl-pak se dispuso en hielo. Cada recipiente se etiquetó apropiadamente. Las recogidas de muestras se registraron en el Formulario de Informe de la Necropsia. Después de ello, muestras de tejido fijado con formalina y el Formulario de Petición de Diagnóstico se suministraron para el ensayo de IHC. El ensayo de IHC se efectuó de acuerdo con procesos de laboratorio estándares ISU para muestras de recepción, preparación de muestras y portaobjetos y técnicas de tinción. Tejidos recientes en Whirl-paks fueron transportados con paquetes de hielo al Monitor del Estudio para el almacenamiento ($-70^\circ \pm 10^\circ$ C) y posible uso futuro. Los tejidos fijados con formalina fueron examinados por un patólogo en cuanto a la detección de PCV2 mediante IHC y se evaluaron utilizando el siguiente sistema de anotación: 0 = ninguno; 1 = tinción escasa positiva, pocos sitios; 2 = tinción moderada positiva, múltiples sitios; y 3 = abundante tinción positiva, difusa por todo el tejido. Debido al hecho de que el patólogo no podía diferenciar positivamente los NL inguinales de los NL mesentéricos, los resultados para estos tejidos fueron etiquetados simplemente como Nódulos Linfáticos y la puntuación daba la puntuación más alta para cada uno de los dos tejidos por animal.

Resultados

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	ADWG - kg/día (Día 24 a Día 49) o ajustada para cerdos muertos antes del Día 29
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	$0,39 \pm 0,13$ kg/día
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	$0,32 \pm 0,14$ kg/día
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	$0,22 \pm 0,09$ kg/día
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	$0,38 \pm 0,14$ kg/día
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	$0,43 \pm 0,09$ kg/día
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	$0,33 \pm 0,11$ kg/día
7	KV (2 dosis)	12	$0,23 \pm 0,07$ kg/día
8	Controles de Provocación	10	$0,34 \pm 0,09$ kg/día
9	Controles Estrictos Negativos	11	$0,48 \pm 0,08$ kg/día

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

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

Tabla 7. Sumario del Grupo de Títulos IFA de PCV2

TÍTULO IFA MEDIO						
Grupo	Tratamiento	Día -3	Día 14	Día 24	Día 31**	Día 49***
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	50,0	529,2	4400,0	7866,7	11054,5
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	50,0	500,0	3466,7	6800,0	10181,8
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	50,0	187,5	1133,3	5733,3	9333,3
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	50,0	95,5	1550,0	3090,9	8000,0
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	50,0	75,0	887,5	2266,7	7416,7

6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	50,0	50,0	550,0	3118,2	10570,0
7	KV (2 dosis)	50,0	204,2	3087,5	4620,8	8680,0
8	Controles de Provocación	50,0	55,0	50,0	50,0	5433,3
9	Controles Estrictos Negativos	50,0	59,1	59,1	54,5	6136,4

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

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

**Día de Provocación

***Día de la Necropsia

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

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Comportamiento Anormal ¹	Comportamiento Anormal ²	Tos ³	Diarrea ⁴
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	4/12 (33,3%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	1/12 (8,3%)
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	8/12 (66,7%)	0/12 (0%)	2/12 (16,7%)	1/12 (8,3%)
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)

ES 2 625 903 T3

6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 dosis)	12	7/12 (58.3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)
8	Controles de Provocación	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	Controles Estrictos Negativos	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

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

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

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

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con Síntomas Clínicos ¹	Tasa de Incidencia
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	5	41,7 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	5	41,7 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	8	66,7 %
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	11	4	36,4 %
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	1	9,1 %
7	KV (2 dosis)	12	7	58,3 %
8	Controles de Provocación	10	4	40 %
9	Controles Estrictos Negativos	11	0	0 %

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Muertes Post-provocación	Tasa de Mortalidad
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	12	1	8,3 %
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	12	0	0 %

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

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

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

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

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

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

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

Grupo	Tratamiento	Íctero	Úlceras Gástricas	% Medio de Lesiones Pulmonares	Incidencia de Lesiones Pulmonares Anotadas
1	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,40 ± 0,50%	10/12 (83%)
2	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,41 ± 20,2%	10/12 (83%)
3	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	9,20 ± 20,9%	10/12 (83%)
4	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	1,5 ± 4,74%	4/11 (36%)
5	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,68 ± 1,15%	9/12 (75%)
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2,95 ± 5,12%	7/11 (64%)
7	KV (2 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,27 ± 22,9%	9/12 (75%)
8	Controles de Provocación	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9,88 ± 29,2%	8/10 (80%)
9	Controles Estrictos Negativos	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

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

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

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

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

ES 2 625 903 T3

6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	11	4	36,4 %
7	KV (2 dosis)	12	5	41,7 %
8	Controles de Provocación	10	9	90,0 %
9	Controles Estrictos Negativos	11	10	90,9 %
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado				

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

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

Grupo	N	Tratamiento	ADWG (kg/día)	Comportamiento Anormal	Tos	Incidencia Global de Síntomas Clínicos
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	$0,39 \pm 0,13\%$	2/12 (16,7%)	3/12 (25%)	41,7 %
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	$0,32 \pm 0,14\%$	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)	41,7 %
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	$0,22 \pm 0,09\%$	8/12 (66,7%)	2/12 (16,7%)	66,7 %
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	$0,38 \pm 0,14\%$	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	36,4 %
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	$0,43 \pm 0,10\%$	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	8,3 %
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	$0,33 \pm 0,11\%$	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	9,1 %
7	12	KV (2 dosis)	$0,23 \pm 0,07\%$	7/12(58,3)	0/12 (0%)	58,3 %
8	10	Controles de Provocación	$0,34 \pm 0,09\%$	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40 %
9	11	Controles Estrictos Negativos	$0,48 \pm 0,07\%$	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0 %
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado						

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

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

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

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

Discusión

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

De manera interesante, el Grupo 4, que recibió una dosis más alta de antígeno rORF2 que el Grupo 5, no se comportó tan bien ni mejor que el Grupo 5. El Grupo 4 tenía una ADWG ligera menor, una mayor incidencia de comportamiento anormal, una mayor incidencia de síntomas clínicos globales, una mayor tasa de secreción nasal

de PCV2, un mayor % medio de lesiones pulmonares y una mayor tasa de tejidos IHC positivos que el Grupo 5. Los análisis estadísticos, que pueden indicar que las diferencias entre estos dos grupos no eran estadísticamente significativas, no se realizaron en estos datos, pero existía una tendencia observada de que el Grupo 4 no se comportaba tan bien como el Grupo 5.

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

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

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

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

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

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

60 Todavía en otro aspecto de la presente invención, se determinó la eficacia de una dosis máxima de 2 ml/2 dosis de vacuna convencional PCV2 matada en el modelo de cerdos CDCD en la cara de una provocación con PCV2. De las siete vacunas evaluadas en este estudio, se comportaba de la peor manera la vacuna contra PCV2 de células enteras matadas. Cochinitos que recibían dos dosis de vacuna contra PCV2 de células enteras matadas tenían la

ADWG más baja, la segunda tasa más alta de comportamiento anormal (58,3%), la segunda incidencia global más alta de síntomas clínicos (58,3%), la tasa de mortalidad más alta (16,7%), la segunda incidencia más alta de secreción nasal (41,7%), el % medio más alto de lesiones pulmonares (9,88 ± 29,2%), una alta incidencia de lesiones pulmonares anotada (75%) y una tasa moderada de incidencia de IHC en tejidos (41,7%). Sin embargo, seguía siendo eficaz para crear una respuesta inmune.

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

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

Ejemplo 5

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

Tabla 16. Diseño de Estudio General

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

6	15	Vacuna 3 contra PCV2 1 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
7	15	Vacuna 3 contra PCV2 0,25 µg rORF2 – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
8	15	Vacuna 4 contra PCV2 > 8,0 log KV – Carbopol	0 y 14	+	+	+	+
9	15	Controles de Provocación	N/A	+	+	+	+
10	15	Ninguno - Grupo Control Negativo Estricto	N/A	+	-	+	+
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado							

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

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

ES 2 625 903 T3

conservados en formalina para su examen por inmunohistoquímica (IHC) para la detección posterior de antígeno de PCV2.

Materiales y Métodos:

5 Este era un estudio de capacidad de provocación frente a la vacunación parcialmente ciego realizado en cerdos CDCD, de 6 a 16 días de edad el Día 0. Para ser incluidos en el estudio, los títulos IFA de PCV2 de cerdas eran \leq 1:1000. Adicionalmente, el estado serológico de cerdas procedía de una piara PRRS-negativa conocida. Se sometió a ensayo a dieciseis (16) cerdas en cuanto al estado serológico de PCV2 y las dieciseis (16) tenían un título de PCV2 de \leq 1000 y fueron transferidas al primer sitio de estudio. Ciento cincuenta (150) cochinitos fueron proporcionados mediante cirugía por sección cesárea y estaban disponibles para este estudio el Día -3. El Día -3, se pesaron 150 cerdos CDCD en el primer sitio de estudio, se identificaron con etiquetas de oreja, se bloquearon por el peso y se asignaron al azar a 1 de 10 grupos, según se recoge antes en la tabla 16. Muestras de sangre fueron tomadas de todos los cerdos. Si cualquier animal de ensayo que cumplía los criterios de inclusión fue enrolado en el estudio y posteriormente fue excluido por cualquier motivo, el Investigador y Monitor consultó con el fin de determinar el uso de datos recogidos del animal en el análisis final. Se documentó la fecha en la que se excluyó a los cerdos enrolados y el motivo de la exclusión. No se excluyeron cerdas que cumplieran con los criterios de inclusión, seleccionadas para el estudio y fueron transportadas al primer sitio de estudio. No se excluyeron cochinitos del estudio, y antes de terminar no se retiró del estudio a ningún animal de ensayo. La Tabla 17 describe los intervalos de tiempo para las actividades clave de este Ejemplo.

Tabla 17. Actividades de Estudio

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

50	27-5-03	Muestra tomadas de sangre, pesados y sometidos a necropsia a todos los cerdos; se registraron lesiones burdas; los pulmones se evaluaron en cuanto a lesiones; se guardaron muestras de tejido recientes y fijadas con formalina; se completó la fase viva del estudio
----	---------	--

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

Los animales fueron alojados en el primer sitio de estudio en jaulas individuales en siete recintos desde el nacimiento hasta aproximadamente 11 días de edad (aproximadamente el Día 0 del estudio). Cada recinto era idéntico en su distribución y consistía en jaulas de acero inoxidable individuales apiladas, siendo suministrado aire calentado y filtrado por separado a cada una de las unidades de aislamiento. Cada recinto disponía de calor y ventilación separados, proporcionando con ello una contaminación cruzada de aire entre los recintos. Los animales fueron alojados en dos edificios diferentes en el segundo sitio de estudio. El Grupo 10 (el grupo control estricto negativo) fue alojado por separado en un edificio de acabado convertido y los Grupos 1-9 fueron alojados en un edificio de parto convertido. Cada grupo fue alojado en un redil separado (14-15 cerdos por redil) y cada redil proporcionaba aproximadamente 1 metro cuadrado por cerdo. Los Grupos 2, 4 y 8 fueron alojados en tres rediles adyacentes en un lado del pasadizo y los Grupos 1, 3, 5, 6, 7 y 9 fueron alojados en seis rediles adyacentes en el otro lado del pasadizo. La separación de los Grupos era debida a la preocupación del Monitor del Estudio de que vacunas administradas a los Grupos 2, 4 y 8 no habían sido inactivadas por completo. Cada redil se encontraba sobre una cubierta elevada con pisos de lamas de plástico. Un foso debajo de los rediles servía como depósito de excrementos y desechos. Cada edificio tenía sus sistemas calefactores y de ventilación separados, con escasa probabilidad de contaminación cruzada de aire entre los edificios.

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

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

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

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

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

El Día 25, los cerdos asignados a los Grupos 1-9, recibieron 1,0 mL de material de provocación ISUVDL de PCV2 (3,98 log₁₀ TCID₅₀/mL), IM en la zona derecha del cuello utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una aguja estéril de 20g x 1". Se administró 1,0 mL adicional del mismo material, IN a cada cerdo (0,5 mL por fosa nasal) utilizando una jeringa Luer-lock estéril de 3,0 mL y una cánula nasal.

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

Los cerdos de ensayo fueron observados diariamente en cuanto a la salud general y sucesos adversos el Día -3 y desde el Día 0 al Día 21. Cada uno de los cerdos fue puntuado en cuanto a comportamiento normal o anormal,

- respiración o tos. Las observaciones se registraron en el Registro de Observación Clínica. Todos los cerdos de ensayo fueron observados desde el Día 0 hasta el Día 7, y el Grupo 7 fue observado adicionalmente desde el Día 14 hasta el 21, en cuanto a las reacciones del sitio de inyección. La ganancia de peso media diaria se determinó pesando a cada cerdo sobre una escala calibrada los Días -3, 25 y 50, o el día en que se encontró muerto a un cerdo después de la provocación. Los pesos corporales se registraron en el Formulario de Peso Corporal. Los pesos corporales del Día -3 se utilizaron para bloquear a los cerdos antes del reparto aleatorio. Los datos de peso del Día 25 y del Día 50 se utilizó para determinar la ganancia de peso media diaria (ADWG) para cada cerdo durante estos momentos. Para los cerdos que murieron después de la provocación y antes del Día 50, la ADWG se ajustó para representar la ADWG desde el Día 25 hasta el día de su muerte.
- Con el fin de determinar la serología de PCV2, sangre entera venosa se recogió de cada cochinito del seno venoso orbital los Días -3 y 14. Para cada cochinito, la sangre se tomó del seno venoso orbital insertando un tubo capilar estéril en el canto medial de uno de los ojos y drenando aproximadamente 3,0 mL de sangre entera en un Tubo Separador de Suero (SST) de 4,0 mL. Los Días 25, 32 y 50 se tomó sangre entera venosa de cada cerdo de la vena cava anterior utilizando una aguja estéril 20g x 1 ½" Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey), un soporte de aguja Vacutainer® y un SST de 13 mL. Las tomas de sangre en cada instante se registraron en el Registro de Toma de Muestras. Se dejó que se coagulara la sangre en cada SST, cada SST fue centrifugado y se recolectó el suero. El suero recolectado fue transferido a un tubo con tapón de cierre rápido estéril y se almacenó a $-70 \pm 10^\circ \text{C}$ hasta que se sometió a ensayo con posterioridad. Las muestras de suero fueron sometidas a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos de PCV2 por parte del personal de BIVI-R&D.
- Los cerdos fueron observados una vez al día desde el Día 22 al Día 50 en cuanto a síntomas clínicos y fueron puntuados en cuanto al comportamiento normal o anormal, la respiración o tos. Las observaciones clínicas se registraron en el Registro de Observación Clínica.
- Los cerdos n°s 46 (Grupo 1) y 98 (Grupos 9) murieron en el primer sitio de estudio. Estas dos muertes fueron catalogadas como muertes por hemorragia y no se realizaron necropsias en estos dos cerdos. En el segundo sitio de estudio, se realizó una necropsia a los cerdos que morían después de la provocación y antes del Día 50, y a los cerdos sometidos a eutanasia el Día 50. Se anotaron cualesquiera lesiones burdas y los porcentajes de lóbulos pulmonares con lesiones se registraron en el Formulario de Informe de la Necropsia.
- De cada uno de los cerdos a los que se realizó una necropsia en el segundo sitio de estudio, una muestra de tejido de las tonsilas, pulmones, corazón, hígado, nódulo linfático mesentérico se dispuso en un solo recipiente con formalina al 10% tamponada; mientras que otra muestra de tejido procedente de los mismos órganos antes mencionados se dispuso en un Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino Unido) y cada Whirl-pak® se dispuso en hielo. Cada recipiente se etiquetó apropiadamente. Las recogidas de muestras se registraron en el Formulario de Informe de la Necropsia. Después de ello, muestras de tejido fijado con formalina y el Formulario de Petición de Diagnóstico se suministraron para el ensayo de IHC. El ensayo de IHC se efectuó de acuerdo con procesos de laboratorio estándares para muestras de recepción, preparación de muestras y portaobjetos y técnicas de tinción. Tejidos recientes en Whirl-paks® fueron transportados con paquetes de hielo al Monitor del Estudio para el almacenamiento ($-70^\circ \pm 10^\circ \text{C}$) y posible uso futuro.
- Los tejidos fijados con formalina fueron examinados por un patólogo en cuanto a la detección de PCV2 mediante IHC y se evaluaron utilizando el siguiente sistema de anotación: 0 = ninguno; 1 = tinción escasa positiva, pocos sitios; 2 = tinción moderada positiva, múltiples sitios; y 3 = abundante tinción positiva, difusa por todo el tejido. Para fines analíticos, una puntuación de 0 se consideró "negativa," y una puntuación mayor que 0 se consideró "positiva."

Resultados

- Se dan seguidamente los resultados para este ejemplo. Se anota que los Cerdos n° 46 y 98 murieron los días 14 y 25, respectivamente. Estas muertes fueron catalogadas como muertes por hemorragia. El Cerdo n° 11 (Grupo 1) resollaba con rápida respiración el Día 15. Por lo demás, todos los cerdos eran normales en cuanto al comportamiento, la respiración y la tos durante este periodo de observación y no se señalaron sucesos adversos sistémicos con ninguno de los grupos. No se señalaron reacciones en el sitio de inyección después de la vacunación el Día 0. Después de la vacunación el Día 14, siete (7) de catorce (14) cerdos del Grupo 1 (50,0%) tenía una hinchazón con una puntuación de "2" el Día 15. Cuatro (4) de catorce (14) cerdos del Grupo 1 (28,6%) seguía teniendo una hinchazón de "2" el Día 16. Ninguno de estos otros grupos experimentó reacciones en el sitio de inyección después de cualquier vacunación.
- Los resultados de la ganancia de peso media diaria (ADWG) se presentan a continuación en la Tabla 18. De los resultados del grupo se excluyó a los Cerdos n°s 46 y 98 que murieron de hemorragia. El Grupo 4, que recibía una dosis de 16 µg de vORF2 – Carbopol, tenía la ADWG más alta ($0,52 \pm 0,12 \text{ kg/día}$), seguido de los Grupos 1, 2, 3, 5, 6 y 10 que tenían ADWGs que oscilaban entre $0,48 \pm 0,10 \text{ kg/día}$ a $0,50 \pm 0,12 \text{ kg/día}$. El Grupo 9 tenía la ADWG más baja ($0,40 \pm 0,13 \text{ kg/día}$), seguido de los Grupos 8 y 7, que tenían ADWGs de $0,42 \pm 0,14 \text{ kg/día}$ y $0,41 \pm 0,19 \text{ kg/día}$, respectivamente.

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

Grupo	Tratamiento	N	ADWG kg/día (Día 25 a Día 50) o ajustada para cerdos muertos antes del Día 50
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	0,48 ± 0,14 kg/día
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,50 ± 0,07 kg/día
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,48 ± 0,09 kg/día
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	0,52 ± 0,12 kg/día
5	rORF2 – 4 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,48 ± 0,12 kg/día
6	rORF2 – 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,50 ± 0,12 kg/día
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	0,45 ± 0,20 kg/día
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	0,42 ± 0,15 kg/día
9	Controles de Provocación	14	0,36 ± 0,13 kg/día
10	Controles Estrictos Negativos	15	0,48 ± 0,10 kg/día

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

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

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

Tabla 19. Sumario del Grupo de Títulos IFA de PCV2

Grupo	Tratamiento	Día -3	Día 14**	Día 25***	Día 32	Día 50****
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	50	64	646	3326	4314
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	50	61	1867	3933	4533

ES 2 625 903 T3

6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	50	70	490	2360	5740
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	50	73	63	382	5819
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	50	97	4617	7619	10817
9	Controles de Provocación	50	53	50	129	4288
10	Controles Estrictos Negativos	50	50	50	78	11205

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

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

**Día de Provocación

***Día de la Necropsia

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

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Comportamiento Anormal ¹	Comportamiento Anormal ²	Tos ³
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7,1 %)
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)

ES 2 625 903 T3

4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	15	1/15 (6,7 %)	1/15 (6,7 %)	0/15 (0%)
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7 %)	1/15 (0,67 %)
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	1/15 (6,7 %)	1/15 (6,7 %)	0/15 (0%)
9	Controles de Provocación	14	1/14 (7,1 %)	1/14 (7,1 %)	2/14 (14/3%)
10	Controles Estrictos Negativos	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

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

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con Síntomas Clínicos ¹	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	1	7,1 %
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	0	0,0 %
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	15	2	13,3 %
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	2	13,3 %
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	2	13,3 %
9	Controles de Provocación	14	2	14,3 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	0	0,0 %

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Muertes Post-provocación	Tasa de Mortalidad
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	14	0	0,0 %
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	1	6,7 %
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	0	0,0 %
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	2	13,3 %
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
9	Controles de Provocación	14	2	14,3 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	0	0,0 %

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

- 5 El Sumario del Porcentaje Medio de Lesiones Pulmonares y la Diagnóstico Tentativa se da a continuación en la Tabla 23. El Grupo 9, el grupo control de provocación, tenía el porcentaje más alto de lesiones pulmonares con una media de $10,81 \pm 23,27\%$, seguido del Grupo 7, que recibía 0,25 µg de rORF2–Carbopol y tenía una media de $6,57 \pm 24,74\%$, el Grupo 5, que recibía 4 µg de rORF2–Carbopol y tenía una media de $2,88 \pm 8,88\%$, y el Grupo 8, que recibía la vacuna de KV y tenía una media de $2,01 \pm 4,98\%$. Los restantes seis (6) grupos tenían un porcentaje medio de lesiones pulmonares que oscilaba entre $0,11 \pm 0,38\%$ y $0,90 \pm 0,15\%$.
- 10 El diagnóstico tentativo de neumonía variaba entre los grupos. El Grupo 3, que recibía dos dosis de 16 µg de rORF2–Carbopol, tenía el diagnóstico tentativo de neumonía más bajo, con 13,3%. El Grupo 9, el grupo control de provocación, tenía al 50% del grupo diagnosticado tentativamente de neumonía, seguido del Grupo 10, el grupo control estricto negativo y el Grupo 2, que recibieron dos dosis de 16 µg de vORF2–Carbopol, con 46,7% de 40%, respectivamente, diagnosticado tentativamente de neumonía.
- 15 Los Grupos 1, 2, 3, 5, 9 y 10 tenían el 0% del grupo diagnosticado tentativamente como infestado con PCV2; mientras que el Grupo 8, que recibía dos dosis de vacuna KV, tenía la más alta tasa en el grupo del diagnóstico tentativo de infección por PCV2, con el 20%. El Grupo 7, que recibía dos dosis de 0,25 µg de rORF2–Carbopol, y el Grupo 4, que recibía una dosis de 16 µg de vORF2–Carbopol tenían diagnósticos de grupo tentativos de infección por PCV2 en el 13,3% y 6,7% de cada grupo, respectivamente.
- 20 Úlceras gástricas fueron sólo diagnosticadas en un cerdo en el Grupo 7 (6,7%); mientras que los otros 9 grupos permanecieron exentos de úlceras gástricas.

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

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que secretó durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	15	0	0 %
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	2	13,3 %
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	6	40,0 %
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	7	46,7 %
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	12	80 %
9	Controles de Provocación	14	14	100,0 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	14	93,3 %

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

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

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

Grupo	Tratamiento	N	Nº de cerdos que secretó durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 dosis	15	0	0 %
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	1	6,7 %
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 dosis	15	3	20,0 %
4	vORF2 – 16 µg – Carbopol 1 dosis	15	2	13,3 %
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 1 dosis	15	3	20,0 %

ES 2 625 903 T3

6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 dosis	15	6	40,0 %
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol 2 dosis	15	7	46,7 %
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 dosis	15	12	80 %
9	Controles de Provocación	14	14	100,0 %
10	Controles Estrictos Negativos	15	14	93,3 %
vORF2 = ORF2 viral aislado; rORF2 = ORF2 expresado en baculovirus recombinante; KV o mató virus de células completos = virus PCV2 desarrollado en un cultivo celular adecuado				

Discusión

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

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

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

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

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

contexto de este estudio no había una diferencia suficiente entre grupos para basar la futura eficacia de la vacuna sobre la ADWG.

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

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

Lesiones burdas en cerdos con PMWS secundaria a la infección por PCV2 consistía típicamente en linfadenopatía generalizada en combinación con uno o más de lo siguiente: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o íctero, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis. En la necropsia (Día 50), no se observó en ninguno de los grupos íctero, hepatitis ni nefritis. Una úlcera gástrica fue observada en un cerdo del Grupo 7, pero no se examinó específicamente una linfadenopatía. En base a la presencia de lesiones que eran consistentes con una infección por PCV2, tres grupos tenían al menos un cerdo diagnosticado tentativamente con PCV2 (PMWS). El Grupo 8, que recibía dos dosis de vacuna matada, tenía un 20% diagnosticado tentativamente con PCV2, mientras que el Grupo 7 y el Grupo 4 tenían 13,3% y 6,7%, respectivamente, diagnosticado tentativamente con PCV2. El % medio de puntuaciones de lesiones pulmonares variaba entre grupos en la necropsia. Los Grupos 1, 2, 3, 4, 6 y 10 tenían un bajo % de puntuación de lesiones pulmonares que oscilaba entre 0,11 ± 0,38% y 0,90 ± 0,15%. Como era de esperar, el Grupo 9, el grupo control de enfrentamiento tenía el % medio más alto de puntuaciones de lesiones pulmonares (10,81 ± 23,27%). En los cuatro grupos, el % medio de puntuaciones de lesiones pulmonares se elevó debido a uno hasta tres cerdos en cada uno de estos grupos que tenían puntuaciones muy altas de lesiones pulmonares. Las lesiones pulmonares eran rojas/púrpura y estaban consolidadas. Típicamente, las lesiones pulmonares asociadas con PMWS se describen como de color canela y no colapsables con edema interlobular. Las lesiones pulmonares observadas en este estudio no se asociaron con una infección por PCV2 o puede estar presente un segundo agente infeccioso pulmonar. Dentro del contexto de este estudio, el % de puntuación de lesiones pulmonares no reflejan, probablemente, una medida verdadera de la cantidad de infección pulmonar debida a PCV2. De igual manera, también se puede haber sobre-utilizado un diagnóstico tentativo de neumonía. Cualquier cerdo con lesiones pulmonares, algunas tan pequeñas como del 0,10%, fueron listados con un diagnóstico tentativo de neumonía. En este ejemplo no había diferencia suficiente entre grupos con respecto a lesiones burdas y el % de lesiones pulmonares en las que basar la eficacia de la vacuna.

Los resultados de IHC mostraron las mayores diferencias entre grupos. El Grupo 1 (16 µg de rORF2 – IMS 1314) tenía los resultados IHC positivos más bajos para el antígeno de PCV2 (0%); mientras que los Grupos 9 y 10 tenían los resultados IHC positivos más altos con tasas de incidencia de 100% y 93,3%, respectivamente. Los Grupos 3, 5, 6 y 7, que recibían 16, 4, 1 ó 0,25 µg de antígeno rORF2, respectivamente, adyuvados con Carbopol, tenían tasas IHC positivas de 20%, 20%, 40% y 46,7%, respectivamente. El Grupo 2, que recibía dos dosis de 16 µg de rORF2 adyuvado con Carbopol tenía una tasa IHC positiva de 6,7%, mientras que el Grupo 4, que recibía solamente una dosis de la misma vacuna, tenía una tasa IHC positiva de 13,3%. Debido a la naturaleza objetiva de este ensayo y al hecho de que los resultados de IHC se correlacionaban con los resultados esperados, el ensayo de IHC es probablemente uno de los mejores parámetros en los que basar la eficacia de la vacuna.

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

positivos, la dosificación protectora mínima de antígeno rORF2 administrada dos veces es de aproximadamente 4 µg.

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

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

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

Listado de secuencias

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

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

<130> 34816-CIP1

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

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

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

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

<400> 1

ccgccatg 8

<210> 2

ES 2 625 903 T3

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

5 <220>
 <223> Esta es una secuencia Eco R1 recombinante.

<400> 2

10 gaattc 6

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

15

<400> 3
 cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttggga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcc tctccgcac cttcggatat actgtggaga 180
 aggaaaaatg gcatcttcaa cacccgcctc tccegcacct tcggatatac tgtgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctataacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccaactattga ttacttcaa ccaataaaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggcctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttaa accctaagt aat 713

20

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

25

<400> 4
 ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttggga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcc tctccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
 ctaaccacagt cacacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctataacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccaactattga ttacttcaa ccaataaaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggcctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttga accctaagaa ttc 713

30

<210> 5
 <211> 233
 <212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 5

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
    
```

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

10

<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

5

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

ES 2 625 903 T3

5 <210> 7
 <211> 756
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Esta secuencia procede de circovirus porcino tipo 2, marco de lectura abierto 2, junto con una porción procedente del vector pGEM T-easy.

10 <400> 7

```

gcgggcgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcggtaccg cagaagaaga 60
caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcgcgc gccctggct cgtccacccc 120
cgccaccgct accggtggag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctcccgcacc 180
ttcgatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgcctt cctgggcggt ggacatgatg 240
agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc 300
tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggcctgctc ccccatcacc 360
cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaag 420
gccacagccc taacctatga cccstatgta aactactcct cccgccatac aatcccccaa 480
cccttctcct accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat 540
tacttccaac caaataacaa aaggaaatcag ctttgctga ggctacaac ctctagaat 600
gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat 660
atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc taaagacc cccacttgaa 720
ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggccgc 756
  
```

15 <210> 8
 <211> 10387
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Este es el circovirus porcino tipo 2, construcción ORF2, que incluye secuencias codificadoras de baculovirus y pGEM T-easy.

<400> 8

ES 2 625 903 T3

aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catathtagt tgcgtttatg agataagatt 60
 gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgctg tggcacaact atttacaatg cggccaagtt 120
 ataaaagatt ctaatctgat atgtttttaa acacctttgc ggcccgagtt gtttgcgtac 180
 gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacsgatag taaaacaaaa ccctagtatt 240
 ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aatattatg atgggtgtgca tttttgcgg 300
 gcgggctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgcgcc tgaagcata 360
 gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccgg catgttggg 420
 ggcgtgact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtcag atatttaastg 480
 cacacctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac 540
 aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc 600
 ttaacaaat actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaacta 660
 tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttcaa tcgacggtag 720
 gattagccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttacgt ttatgctttt 780
 ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgtca 840
 cgcacaacac cggatgttt cgcttgcctc cggggtattg aaccgcgcca tccgacaaat 900
 ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttcgtctt 960
 tcttttgcac ggtttcctgg aagccggtgt acatgagggt tagatcagtc atgacgcgcg 1020
 tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgccttgat ggcaacgatg cgttcaataa 1080
 actcttgctt ttaacaagt tectcggtt tttgcgccac caccgcttgc agcgcgtttg 1140
 tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tctcccgtt 1200
 gtttgatcgc gggatcgtac ttgccggtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa 1260
 gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc 1320
 cggatttagt aatgagcact gtatgaggct gcaaatacag cgggtcgccc ctttccacga 1380
 cgctgttaga ggtagggccc ccattttgga tggctctgctc aaataacgat ttgtatztat 1440
 tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaaacg ttagcgacgt 1500
 ccttggccac gaaccggacc tgttggtcgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat 1560
 cttctccaaa ttaaatctt ccaattttaa cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat 1620
 tttgcaacaa ctattgtttt ttaacgcaa ctaaacttat tgtggtagc aataattaa 1680
 tatgggggaa catgcgccgc tacaacactc gtcgttatga acgcagacgg cgccggtctc 1740
 ggcgcaagcg gctaaaacgt gttgcgcgct caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag 1800

tacagttttg atttgcata taacggcgat tttttaatt 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 cgaattaaa tcattgcgat 2160
tagtgcgatt aaaacgttgt acatcctcgc ttttaatcat gcgctcgatt aaatcgcgca 2220
atcgagtcas gtgatcaaag tgtggaataa tgttttcttt gtattcccga gtcaagcgca 2280
gcgctgattt taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc 2340
aataatata t atgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gcccgttgtc gcatctcaac 2400
acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag cttgcgacgc aacgtgcacg 2460
atctgtgcac gcgttccggc acgagcttgg attgtaataa gtttttacga agcgtgaca 2520
tgacccccgt agtgacaacg atcacgccca aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt 2580
atgtcgtga cgtaaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc 2640
tggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt 2700
agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atcccgatga ttttattgat 2760
aaattgaccc taactccata cacggatttc tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc 2820
ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccgccacta ttaatgaaat taaaaattcc 2880
aattttaaaa aacgcagcaa gagaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa 2940
aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg 3000
aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggtatgt acaggaagag gtttatacta 3060
aactgttaca ttgcaaacgt ggttctgtgt gccaaagtgt aaaaccgatg tttaatcaag 3120
gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgagtcac gcatctttta 3180
atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aaatgaaaac tgtcgacaag 3240
ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggc ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata 3300
aaacaattat aatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa 3360
cattttagt attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgtgagg taatatttaa 3420
aatcattttc aatgattca cagtttaatt gcgacaatat aattttattt tcacataaac 3480
tagacgcctt gtcgtcttct tcttctgatt ccttctcttt ttcatttttc tctcataaa 3540
aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt 3600
tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtttttc 3660
tgtaatttac aacagtgcta ttttctggta gttcttcgga gtgtgttgc ttaattatta 3720

ES 2 625 903 T3

aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt 3780
acgcagcttc ttctagtcca attacacccat ttttagcag caccggatta acataacttt 3840
ccaaaatggt gtacgaaccg ttaaacaaaa acagttcacc tcccttttct atactattgt 3900
ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaactaat 3960
atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaat 4020
gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa 4080
aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgagg atcagatctg 4140
cagcggccgc ggaattcga tccgccatga cgtatccaag gaggcgttac cgcagaagaa 4200
gacaccgcc cgcagccat cttggccaga tcctccgccc cgcgccctgg ctctccacc 4260
cccgccaccg ctaccgttg agaaggaaaa atggcatctt caacaccgc ctctccgca 4320
ccttcggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctctggggcg gtggacatga 4380
tgagatttaa tattgacgac tttgttcccc cgggaggggg gaccaaaaa atctctatac 4440
cctttgaata ctacagaata agaaaggta aggtgaatt ctggccctgc tccccatca 4500
cccaggggta taggggagt ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa 4560
aggccacagc cctaacctat gaccatattg taaactact ctcccgcct acaatcccc 4620
aacccttct ctaccactcc cgttacttca caccacaacc tgttcttgac tccactattg 4680
attacttcca accaataaac aaaaggaatc agctttgget gaggctacaa acctctagaa 4740
atgtggacca cgtaggctc ggactgcgt tcgaaaacag taaatcagc caggactaca 4800
atatcctgt aaccatgtat gtacaattca gagaattta tcttaagac cccccactg 4860
aaccctaaga attctatcac tagtgaattc gcgccgccc gccgctccag aattctagaa 4920
ggtagccgg atcctttcct gggaccggc aagaacaaa aactcactct ctcaaggaa 4980
atccgtaatg ttaaaccgca cacgatgaag cttgtcgtg gatggaaagg aaaagagtc 5040
tacagggaaa cttggaccgg ctatcatgaa gacagcttc ccattgtta cgeccaagaa 5100
gtgatggatg tttccttgt tgtaaacatg cgtccaota gaccaaccg ttgttataaa 5160
ttcctggccc aacacgctct gcgttgcgac ccgactatg tacctcatga cgtgattag 5220
atcgtcagc cttcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcagcct ggctaagaag 5280
ggcggggct gcccaataat gaacctcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagtc 5340
atcgatcgtg tcctctggga gaacttctac aagccatcg ttacatcgg taccgactct 5400
gctgaagagg aggaaattct cctgaagt ttccctggtg tcaaagtsaa ggagtttga 5460

ccagacgac ctctgttcac tggccggcg tattaacaa cgatacttg ttattagtag 5520
atattaaag cgctagattc tgtgcgttgt tgattacag acaattgtg tacgtatttt 5580

aataattcat taaatttata atcttttaggg tggatggtta gagcgaaaat caaatgattt 5640
tcagcgtcctt tatactctgaa tttaaatatt aaatcctcaa tagattttgta aaatagggtt 5700
cgattagttt caaacaaggg ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt 5760
tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc 5820
gtttgtgttt tgttttgtaa taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta 5880
tttctttcat cactgctggt agtgtacaat tgactcgacg taaacacggt aaataaagct 5940
tggacatatt taacatcggg cgtgtagct ttattaggcc gattatcgtc gtcgtcccaa 6000
ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta 6060
attgtgctcg ctaacacgtc cgcgatcaaa tttgtagttg agctttttgg aattatttct 6120
gattgctggc gtttttggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac 6180
acgttagaaa gcgatggtgc aggcgggtgt aacatttcag acggcaaatc tactaatgct 6240
ggcgtggtg gagctgatga taaatctacc atcgggtggag gcgcagggcg ggctggcggc 6300
ggaggcggag gcggaggtg tggcgggtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct 6360
ttaggcaaca cagtccggac ctcaactatt gtactggttt cgggcgcgct ttttggtttg 6420
accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag cttccaacaa ttgttgtctg 6480
tcgtctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca 6540
gacatcgatg gtggtggtg tggtagggc gctggaatgt taggcacggg agaaggtggt 6600
ggcggcggg ccgccggtat aatttgttct ggtttagttt gttcgcgcac gattgtgggc 6660
accggcgcag gcgccgctgg ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcttcgagg cagcgtttgg 6720
ggtggtgcca attcaatatt ataattggaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt 6780
gtaatttcgc tatcgtttac cgtgccgata tttaacaacc gctcaatgta agcaattgta 6840
ttgtaaagag attgtctcaa gctcgcgca cgcgataac aagcctttc attttacta 6900
cagcattgta gtggcagac acttcgctgt cgtcgcgta catgtatgct ttgttgtcaa 6960
aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt 7020
tgtogtaaat gttgtttttg ataatttgcg ctccgcagc atcgcacacg tcaaaaaatt 7080
gatgcgcatc aattttgtg ttctattat tgaataata agattgtaca gattcatatc 7140
tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgtcgaaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200
actgcaaaaa cgtcaaaact cgttataaaa taatcaacgg gcgctttggc aaatatcta 7260
ttttatcgca caagcccaact agcaaattgt atttgcagaa aacaatttgc gcgcacaatt 7320
ttaacgctga cgaataaaaa gttcaccagt taatgagcga ccacccaat tttataaaaa 7380
tctattttaa tcacggttcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc 7440
ccgatttatt tgaacaacta caaattaaag gcgagcttcc gtaccaactt gttagcaata 7500

ES 2 625 903 T3

ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg atttgacaaa gcacaatttc atacacaacg 7560
 acataaaact cgaaaatgtc ttatatttcg aagcacttga tcgctgtgat gtttgcgatt 7620
 acggattgtg caaacacgaa aactcactta gcgtgcacga cggcacgttg gagtatttta 7680
 gtcgggaaaa aattcgacac acaactatgc acgtttcgtt tgactggtac gggcggtgtt 7740
 aacatacaag ttgctaactg aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa atgtttatcc 7800
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 7860
 atgagtgagc taactcacat taattgctt gcgctcactg cccgotttcc agtcgggaaa 7920
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 7980
 tgggcgctct tccgcttcc cgtcactga ctgctgcgc tcggtcgtc ggtgcggcg 8040
 agcggtatca gtcactcaa agcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8100
 aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 8160
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8220
 tcagaggtgg cgaaccgga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8280
 cctcgtgcgc tctcctgtc cgaccctgcc gcttaccgga taectgtccg cctttctccc 8340
 ttccggaaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt 8400
 cgttcgctcc aagotgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 8460
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaacc ggtaagacac gaattatcgc cactggcagc 8520
 agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8580
 gtggtgacct aactacgctt aactagaag gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa 8640
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 8700
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 8760
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt aacgaaaact cacgttaagg 8820
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 8880
 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 8940
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgctgact 9000
 ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 9060
 gataccgcca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9120
 aaggcccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9180
 ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcggc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9240
 tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccggttc 9300
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 9360
 cggtcctccg atcgttgcga gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 9420


```

agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga cggagttgct cttgcccggc 9540
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 9600
acgttctctg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9660
accactcgt gcaccecaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggasatggtg 9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatapta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9840
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgccacacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct cgcccggttc ggtgatgacg gtgaaaacct 10020
ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg cggggagcag 10080
acaagcccg t cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtga ccatatgagg tgtgaaatac cgcacagatg 10200
cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga 10260
agggcgatcg gtgcgggctt cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 10320
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtea cgacgttgta aaacgacggc 10380
cagtgcc 10387

```

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <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

```

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

15 <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

```

20 <210> 11
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>

ES 2 625 903 T3

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

<400> 11

5

```

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

```

ES 2 625 903 T3

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

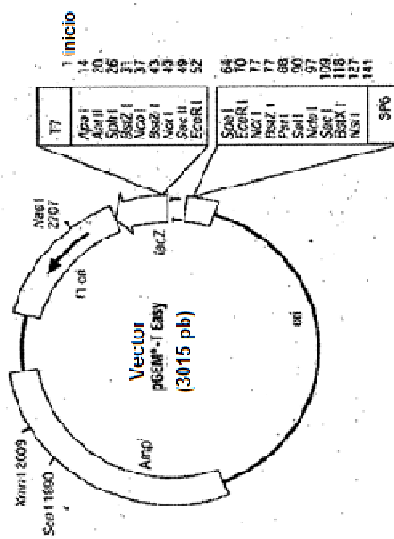
REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica para uso en un método para prevenir la linfadenopatía asociada con la infección por PCV2 en cerdos, en la que la composición es para administrarse una vez en cerdos, comprendiendo dicha composición 4 µg a 200 µg de proteína ORF2 de PCV2 recombinante como el componente antigénico y de 100 µg a 10 mg de adyuvante por dosis, en la que dicha proteína ORF2 de PCV2 recombinante se ha obtenido de manera que (a) las células susceptibles son infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene secuencias codificantes de ADN de ORF2 de PCV2, (b) el polipéptido de ORF2 de PCV2 es expresado por dicho baculovirus recombinante, y (c) el polipéptido de ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante por filtración y el vector de baculovirus se inactiva.
2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el adyuvante se selecciona de la clase de polímeros de ácido acrílico o metacrílico, que están reticulados.
3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el adyuvante es Carbopol y en la que la composición inmunogénica comprende 500 µg a 5 mg de Carbopol por dosis.
4. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición comprende 8 µg a 200 µg de proteína ORF2 de PCV2 recombinante.
5. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición inmunogénica es para administrarse a cerdos no mayores de 6 semanas.
6. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición comprende además un baculovirus recombinante que expresa la proteína ORF2 de PCV2 y el sobrenadante de cultivo celular.
7. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición inmunogénica es estable durante un período de 24 meses.
8. Uso de una composición inmunogénica que comprende 4 µg a 200 µg de proteína ORF2 de PCV2 recombinante como el componente antigénico y 100 µg a 10 mg de adyuvante por dosis, en el que dicha proteína ORF2 de PCV2 recombinante se ha obtenido de manera que (a) las células susceptibles son infectadas con un vector de baculovirus recombinante que contiene secuencias codificantes de ADN de ORF2 de PCV2, (b) el polipéptido de ORF2 de PCV2 es expresado por dicho baculovirus recombinante, y (c) el polipéptido de ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante por filtración y el vector de baculovirus se inactiva, para la fabricación de un medicamento para la prevención de la linfadenopatía asociada con la infección por PCV2 en cerdos, en el que el medicamento se debe administrar una vez en cerdos.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha administración debe hacerse por vía intramuscular.

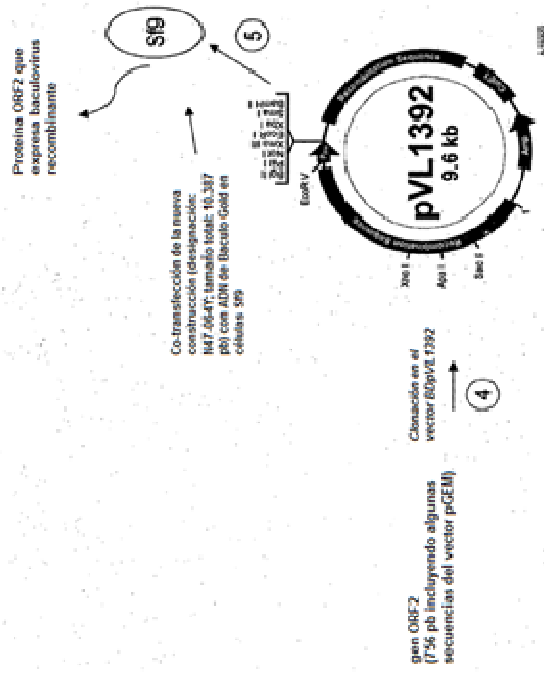
Fig. 1
Cepa de campo de PCV2 aislada

1 Etapa de amplificación de PCR de ORF2
 → Introducción de una etapa de consenso 5' de Kozak
 → Introducción de un sitio 3' EcoRI

2 gen ORF2 (713 pb)
 Clonación en el sitio colgante T del vector pGEM-T-Easy de Promega



3 Escisión de pGEM-T-Easy en el sitio de restricción NotI



4 Clonación en el vector pPVL1392

Proteína ORF2 que expresa bacteriofago recombinante

Co-transfección de la nueva construcción (estación: 147,66-AT; tamaño total: 10,387 pb) con ADN de bacterio-fago en células SP6

FIG. 2(a)

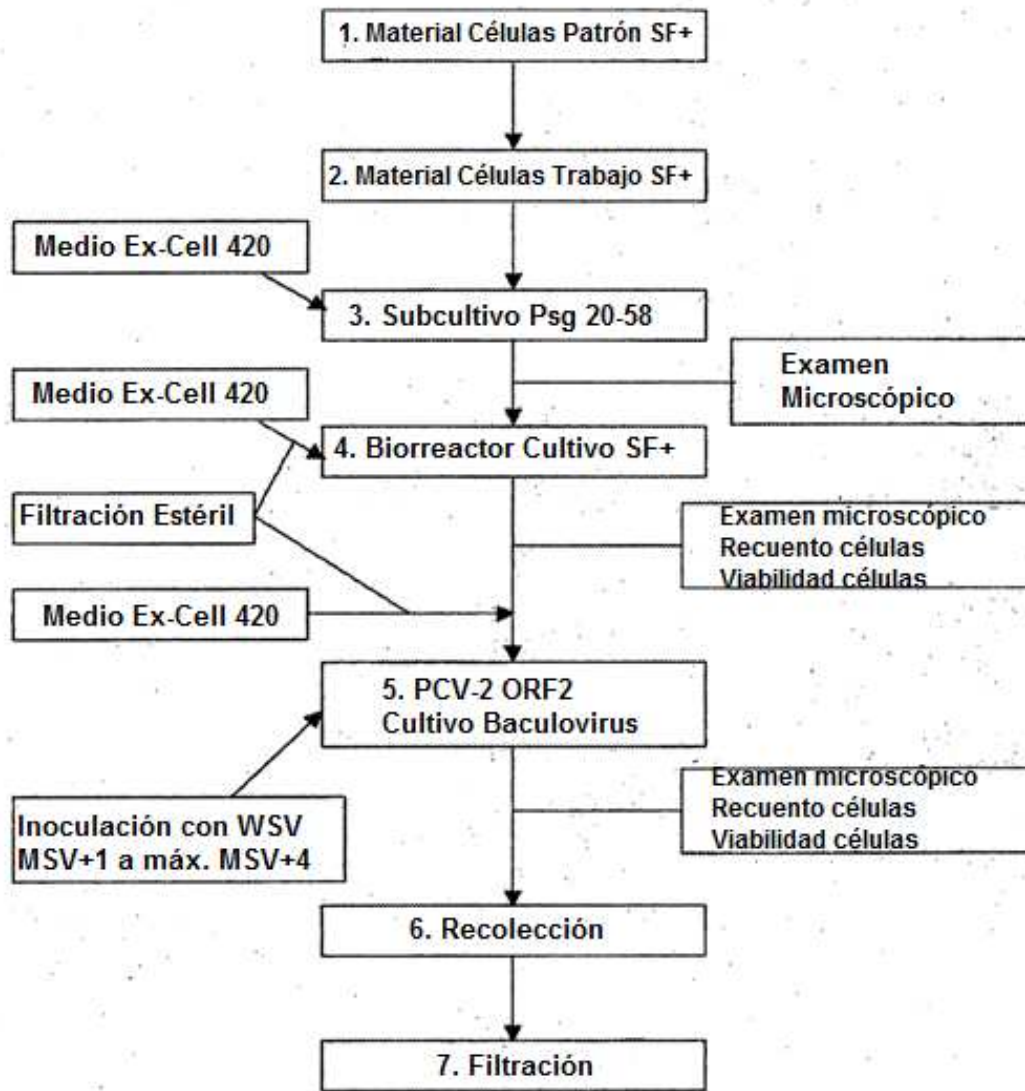


FIG. 2(b)

