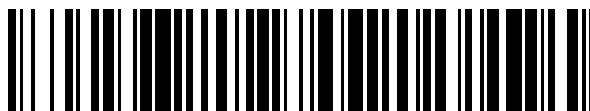


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 812**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2010 PCT/US2010/047654**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11028888**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010 E 10752969 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2473189**

54 Título: **Métodos para reducir la actividad viricida en composiciones de PCV-2 y composiciones de PCV-2 con una inmunogenicidad mejorada**

30 Prioridad:

02.09.2009 US 239192 P
01.03.2010 US 309408 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KOHLER, CAROLINE ANN;
ZHAO, GUOSONG;
KHAZRAEINAZMPOUR, ALI;
EICHENMUELLER, BERND COLIN;
EICHMEYER, MARC;
HAIWICK, GREGORY y
SCHAEFFER, MERRILL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 812 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

Métodos para reducir la actividad viricida en composiciones de PCV-2 y composiciones de PCV-2 con una inmunogenicidad mejorada

Antecedentes

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a métodos y composiciones para reducir la actividad viricida de composiciones que normalmente presentarían algún grado de actividad viricida. Mediante el uso de los métodos de la presente invención, la actividad viricida de dichas composiciones puede reducirse en comparación con la actividad viricida de una composición que no incluye las etapas de la presente invención. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para producir composiciones antigénicas de Circovirus Porcino de Tipo II (PCV-2) de manera que presentan una actividad viricida relativamente escasa o ninguna en comparación con composiciones conocidas en la materia que usan métodos de detección normales y en particular, en comparación con las composiciones no producidas por un método de acuerdo con la presente invención. La presente descripción también se refiere a una nueva composición inmunogénica, preferentemente a una composición que contiene PCV-2 producida de acuerdo con el método proporcionado por la presente solicitud de patente, caracterizada preferentemente por una actividad reducida o no viricida con respecto a composiciones comparables descritas en la materia. De acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno de PCV-2 purificado con una inmunogenicidad mejorada.

Descripción de la técnica anterior

El circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2) es un virus de ADN pequeño (17 - 22 nm de diámetro), icosaédrico, sin envuelta, que contiene un genoma circular monocatenario. El PCV-2 comparte una identidad de secuencia de aproximadamente 80% con la del circovirus porcino de tipo 1 (PCV-1). Sin embargo, a diferencia del PCV-1, que es generalmente no virulento, los cerdos infectados por PCV-2 presentan un síndrome normalmente denominado síndrome debilitante multisistémico post-destete (PMWS). Clínicamente, el PMWS se caracteriza por un debilitamiento, palidez de la piel, un desarrollo poco vigoroso, dificultad respiratoria, diarrea, icterus e ictericia. En algunos cerdos afectados, resultará evidente una combinación de todos los síntomas, mientras que otros cerdos solamente tendrán uno o dos de estos síntomas. Durante la necropsia, también aparecen lesiones microscópicas y macroscópicas en tejidos y órganos múltiples, siendo los órganos linfoides los sitios más comunes de las lesiones. Se ha observado una fuerte correlación entre la cantidad de ácido nucleico de PCV-2 o antígeno y la gravedad de las lesiones linfoides microscópicas. Los índices de mortalidad para los cerdos infectados por PCV-2 pueden acercarse a un 80%. Además del PMWS, el PCV-2 se ha asociado con otras infecciones diversas que incluyen pseudorrabia, síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis post-destete, hepatitis dietética y bronconeumonía supurativa.

Para reducir el impacto de infecciones por PCV-2 en cerdos se encuentran disponibles diversas vacunas. La Patente de Estados Unidos Nº 6.703.023 proporciona una vacuna basada en ADN para la profilaxis de cerdos contra el PMWS. En el documento WO 03/049703 se describe la producción de una vacuna quimérica viva, que comprende el virus PCV1 no patógeno en donde, sin embargo, la proteína ORF2 se sustituye por la proteína ORF2 del PCV-2 patógeno. Los documentos WO 99/18214 y WO 99/29717 proporcionan diversas cepas de PCV-2 y procedimientos para la preparación de una vacuna PVC2 inactivada. La preparación de vacunas subunitarias también se ha descrito en los documentos WO 99/18214 y WO 99/29717. En el documento WO 06/072065 se ha descrito una vacuna subunitaria eficaz basada en ORF2. En el documento WO 07/28823, también se describe otra vacuna subunitaria basada en ORF-2. Sin embargo, ninguna de las vacunas descritas en la técnica anterior incluye un antígeno de PCV-2 no viricida y/o purificado, preferentemente un antígeno ORF2 del PCV-2 muy purificado.

Las composiciones inmunogénicas contra PCV-2 y diversas composiciones inmunogénicas contra otros patógenos a menudo poseen un efecto viricida sobre otros antígenos. Las normas reguladoras actuales (9 CFR 113.35) permiten alguna actividad viricida en composiciones multivalentes, pero esta actividad viricida no produce una pérdida de más de 0,7 logs/ml de un virus vivo o UFC de menos de 0,7 logs/ml de bacterias vivas cuando se combina con los otros componentes de la composición inmunogénica. Las composiciones que poseen más actividad viricida que la permitida no pueden combinarse con otros antígenos para crear una vacuna multivalente.

La proteína del marco abierto de lectura (ORF2) del PCV-2, que posee un peso molecular aproximado de 30 kDa cuando se procesa sobre gel SDS-PAGE, se ha utilizado en el pasado como un componente antigénico en vacunas y composiciones inmunogénicas para PCV-2. Los métodos típicos para obtener una ORF2 para su uso en dichas vacunas y composiciones generalmente consisten en amplificar el ADN del PCV-2 que codifica a la ORF2, que expresa la proteína ORF2 dentro de una célula hospedadora y extraer la proteína ORF2 de la célula hospedadora mediante lisis celular. El lisado celular recuperado con la ORF2 se usa después como la parte antigénica de una composición inmunogénica o vacuna. En algunos casos el lisado celular que contiene la ORF2 se separa de los residuos celulares.

En los documentos WO2006/072065 y WO2007/076520, respectivamente, se describe la obtención de un líquido

que contiene el antígeno de PCV-2, en donde el sobrenadante de células infectadas con baculovirus que expresa la proteína ORF-2 de PCV-2 se separa de las células mediante centrifugación y microfiltrado a través de una membrana de tamaño de poro de 0,45-1,0 µm.

5 En el documento Liu et al. J Vet Med Sci. 66 (3): 237-42 (2004), que se refiere al desarrollo de un ELISA basado en la proteína de la cápside expresada en baculovirus del circovirus porcino tipo 2 como antígeno (título de Liu et al.), se describe un proceso para purificar una proteína ORF-2 con el epítipo V5 y la secuencia de la etiqueta de histidina añadidos en el extremo C en condiciones de desnaturalización. El proceso comienza con la lisis de células cosechadas en tampón de lisis desnaturalizante, seguido de una cromatografía de afinidad en condiciones de desnaturalización y la liberación de la proteína con un tampón de elución desnaturalizante, y finaliza con la diálisis de las fracciones eluidas para la separación de urea y replegamiento de la proteína (página 238, columna de la derecha, párrafo 2 de Liu et al.).

10 Lo que se necesita es un método para reducir la actividad viricida de las composiciones inmunogénicas que contienen en su interior PCV-2 y antígenos de manera que puedan cumplirse los requisitos reguladores y puedan administrarse composiciones multivalentes eficaces. Además se necesitan métodos para disminuir o reducir la actividad y el efecto viricida de las composiciones que contienen PCV-2 en el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV). Además también se necesitan composiciones inmunogénicas que se hayan sometido a los métodos de la presente invención de manera que su actividad viricida se haya reducido a estándares aceptables y que puedan combinarse con otros antígenos para formar composiciones inmunogénicas multivalentes.

Sumario de la invención

20 La realización práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, química de proteínas e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. I, II y III, Segunda Edición (1989); DNA Cloning, Vols. I y II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Animal Cell Culture (R. K. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL press, 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Protein purification methods – a practical approach (E.L.V. Harris y S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); y Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

30 Antes de describir la presente invención con detalle, debe entenderse que esta descripción no se limita a ADN particular, a secuencias polipeptídicas o a parámetros de procesos los cuales, pueden por supuesto variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el propósito de describir aspectos particulares de la descripción únicamente y no pretende ser limitante. Debe observarse que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido dictamine claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más antígenos, la referencia a "un excipiente" incluye mezclas de dos o más excipientes y similares.

40 La presente invención resuelve los problemas intrínsecos en la técnica anterior y proporciona un avance distinto en el estado de la técnica. Generalmente, la presente descripción proporciona método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 y ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2. Preferentemente, el antígeno de PCV-2 se usa como o en la composición antigénica de PCV-2.

La presente invención proporciona:

[1] Un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de:

45 i) obtener un primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 que comprende partículas similares a virus de la proteína ORF-2; y

50 ii) separar al menos una porción del primer líquido del antígeno de PCV-2 que comprende partículas similares a virus de la proteína ORF-2 mediante una etapa de filtración que utiliza un filtro, en donde el filtro incluye una membrana semipermeable que tiene un tamaño de poro promedio que es más pequeño que el antígeno de PCV-2 para evitar así el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y mantener el antígeno de PCV-2 dentro del filtro, en donde la porción del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 mediante un intercambio de la porción del primer líquido contra un segundo líquido, en donde el segundo líquido es diferente del primer líquido, y en donde el intercambio de la porción del primer líquido con el segundo líquido comprende las etapas de:

55 a) adición de líquido que comprende añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2; y

b) concentración del antígeno de PCV-2 de 3X a 50X en comparación con el volumen del primer líquido separando una porción del primer y segundo líquidos; y

iii) mezclar el antígeno de PCV-2 que queda después de la etapa ii) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 5
- [2] El método de acuerdo con [1], en donde la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan de manera sustancialmente simultánea.
- [3] El método según [1] o [2], en donde la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan al menos dos veces.
- 10 [4] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en donde el filtro tiene un tamaño medio de poro que impide el paso de al menos el 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño.
- [5] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en donde la actividad viricida de la composición antigénica de PCV-2 se reduce en al menos 10% en comparación con el líquido que no se ha sometido al método.
- 15 [6] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde la composición antigénica de PCV-2 producida por las etapas i) a ii) causa una pérdida de menos de 1 log TCID₅₀ por ml de virus vivo o menos de 1 log UFC por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezcla con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 o más horas.
- [7] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en donde la composición antigénica de PCV-2 producida por las etapas i) a ii) causa una pérdida de menos de 0,7 log TCID₅₀ por ml de virus vivo o menos de 0,7 log CFU por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezcla con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 o más horas.
- 20 [8] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], en donde el método comprende adicionalmente la etapa de recoger el antígeno de PCV-2 que queda después de la etapa ii).
- [9] El método de acuerdo con [8], en donde el método comprende además la etapa de purificar la cosecha de la etapa ii) que comprende el antígeno de PCV-2, por procedimiento cromatográfico.
- 25 [10] El método según [9], en donde el antígeno de PCV-2 se purifica a un grado de pureza del antígeno de PCV-2 de más del 50% (p/p) con referencia a la cantidad total de proteína.
- [11] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [10], en donde el componente adicional es un adyuvante.
- [12] El método según [11], en donde el adyuvante es Carbomer.
- 30 [13] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12], en donde el método comprende adicionalmente la etapa de combinar la composición antigénica de PCV-2 con al menos un antígeno adicional.
- [14] El método de acuerdo con [13], en donde el al menos un antígeno adicional incluye antígeno de Virus de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino y/o antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 35 Para los fines de la presente invención, un "primer líquido" se refiere a un líquido acuoso, o medio fluido, típicamente usado en combinación con células, antígenos, composiciones inmunogénicas, vacunas y similares. Preferentemente, el primer líquido comprende medios de una composición antigénica, más preferentemente, el primer líquido comprende o consta preferentemente de medios de cultivo celulares usados para la producción de proteínas recombinantes en células hospedadoras cultivadas. Las células hospedadoras cultivadas pueden ser bacterias, levaduras, células de insecto, células de animales y células de mamíferos, prefiriendo particularmente las
- 40 células de insecto y de mamífero. Por tanto, el primer líquido puede comprender o constar de medios para el cultivo de bacterias, levaduras, células de insectos, células de animales o células de mamíferos. Preferentemente, el medio celular es medio celular asérico y más preferentemente el medio de cultivo es medio asérico EX-CELL® 420, en donde usan células de insecto. El medio EX-CELL® 420 es un medio completo sin proteínas y que contiene L-glutamina y se desarrolló y optimizó para el cultivo asérico de líneas celulares de insectos Sf9 y Sf21.
- 45 Para los fines de la presente invención, un "segundo líquido", se refiere a cualquier líquido normalmente usado en combinación con células, antígenos, composiciones inmunogénicas, vacunas y similares, que es diferente al primer líquido. Preferentemente, el segundo líquido es una solución acuosa, incluso más preferentemente es una solución farmacéuticamente aceptable e incluso más preferentemente un tampón, tal como un tampón de solución salina o fosfato y similar. Más preferentemente, el segundo líquido se caracteriza porque no es viricida con respecto a ningún
- 50 virus vivo o ninguna bacteria viva (en el presente documento, salvo que se indique explícitamente o sea evidente a partir del contexto el término "viricida" incluye actividad bactericida), en donde el virus vivo o la bacteria viva se cultiva en o se conserva en dicho líquido.

Para los fines de la presente invención, "parte", se refiere a cualquier cantidad que no incluya toda la cantidad. Por ejemplo, una parte de líquido sería cualquiera menor a un 100% del volumen del líquido, tal como 90% del líquido, 80% del líquido, 70% del líquido y todas las cantidades entre más de 0% y menos de 100%.

5 Un "antígeno de PCV-2" se refiere a cualquier composición de la materia que comprenda al menos un antígeno que pueda inducir, estimular o potenciar la respuesta inmunitaria contra infección por PCV-2, cuando se administra a un animal, preferentemente a un cerdo. Preferentemente, el antígeno de PCV-2 es el virus PCV-2 completo, preferentemente en una forma inactivada, un virus PCV-2 atenuado o modificado vivo, un virus quimérico que comprende al menos una secuencia de aminoácidos inmunogénica de PCV-2, o cualquier otro polipéptido o componente que comprenda al menos una secuencia de aminoácidos inmunogénica de PCV-2, preferentemente ORF2. Las expresiones "proteína inmunogénica", "polipéptido inmunogénico" o "secuencia de aminoácidos inmunogénica", como se usa en el presente documento, se define a cualquier secuencia de aminoácidos de PCV-2, que provoca una respuesta inmunitaria en un hospedador contra PCV-2. Preferentemente, dicha proteína inmunogénica, polipéptido inmunogénico o aminoácido inmunogénico de PCV-2 es cualquiera de los descritos o proporcionados en la Solicitud de Patente Internacional WO 2006/072065, o es cualquier otro polipéptido de PCV-2 conocido en la materia. Por ejemplo, una secuencia representativa de ADN de la ORF2 del PCV-2 comprende la secuencia de nucleótidos con el N° de Acceso Genbank AF086834 (SEQ ID NO: 3) y SEQ ID NO: 4.

10 Sin embargo, los expertos en la materia entienden que esta secuencia podría variar tanto como 1-10% en cuanto a la homología de secuencia y conservar aún las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden calcularse, por ejemplo, mediante el experimento de exposición como se proporciona en el Ejemplo 4 del documento WO 06/072065. Además, las características antigénicas de un antígeno modificado aún se conservan, cuando el antígeno modificado confiere al menos 70%, preferentemente 80%, más preferentemente 90% de la inmunidad protectora, en comparación con la proteína ORF-2 del PCV-2, codificada por la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, como se proporciona en el documento WO 06/072065. Otros antígenos ORF2 del PCV-2 preferidos son los siguientes:

- i) un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 del documento WO 06/072065,
- ii) cualquier polipéptido que sea 80% homólogo y/o idéntico al polipéptido de i),
- iii) cualquier parte inmunogénica de los polipéptidos de i) y/o ii),
- 30 iv) la parte inmunogénica de iii), que comprende al menos 5, preferentemente 8, más preferentemente 10 aminoácidos contiguos de cualquiera de las secuencias de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 del documento WO 06/072065,
- v) un polipéptido codificado por un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 del documento WO 06/072065,
- 35 vi) cualquier polipéptido codificado por un polinucleótido que es al menos 80% homólogo y/o idéntico al polinucleótido de v),
- vii) cualquier parte inmunogénica de los polipéptidos codificados por el polinucleótido de v) y/o vi)
- viii) la parte inmunogénica de vii), en donde el polipéptido que codifica la parte inmunogénica comprende al menos 30 nucleótidos contiguos incluidos en las secuencias de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 del documento WO06/072065.

El listado de secuencias del documento WO06/072065 es idéntico al listado de secuencias adjunto a esta solicitud.

Preferentemente cualquiera de las partes inmunogénicas descritas anteriormente poseen las características antigénicas del antígeno ORF2 del PCV-2 codificado por la secuencia SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 del documento WO06/072065.

45 "Identidad de secuencia", tal y como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, particularmente una secuencia de referencia y una secuencia proporcionada a comparar con la secuencia de referencia. La identidad entre secuencias se determina comparando la secuencia proporcionada con la secuencia de referencia después de haber alineado de forma óptima las secuencias para producir el grado más alto de similitud de secuencia, según se determina por el apareamiento entre las hebras de dichas secuencias. Tras el alineamiento de secuencias se constata sobre una base de posición-a-posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si en esa posición los restos de nucleótidos o de aminoácidos son idénticos. El número total de dichas identidades de posición se divide después entre el número total de nucleótidos o restos en la secuencia de referencia para proporcionar el % de identidad entre secuencias. Como ilustración, para un nucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, 85%, preferentemente 90%, incluso más preferentemente 95% de "identidad entre

secuencias" con una secuencia de nucleótidos de referencia, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido proporcionado es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de nucleótidos proporcionada puede incluir hasta 15, preferentemente hasta 10, incluso más preferentemente hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos que tenga al menos 85%, preferentemente 90%, incluso más preferentemente 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 15%, preferentemente 10%, incluso más preferentemente 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede tener separaciones o estar sustituido con otro nucleótido, o un cierto número de nucleótidos de hasta 15%, preferentemente 10%, incluso más preferentemente 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones terminales 5' ó 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas bien individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, para un polipéptido que posea una secuencia de aminoácidos proporcionada que posea al menos, por ejemplo, 85%, preferentemente 90%, incluso más preferentemente 95% de identidad entre secuencias con una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido proporcionado es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polipéptidos proporcionada puede incluir hasta 15, preferentemente hasta 10, incluso más preferentemente hasta 5 modificaciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptidos dada que tenga al menos 85%, preferentemente 90%, incluso más preferentemente 95% de identidad entre secuencias con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 15%, preferentemente hasta 10%, incluso más preferentemente hasta 5% de los restos aminoácidos en la secuencia de referencia puede tener separaciones o estar sustituido con otro aminoácido, o un cierto número de aminoácidos de hasta 15%, preferentemente hasta 10%, incluso más preferentemente hasta 5% del número total de restos aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas modificaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas se diferencian por sustituciones de aminoácidos conservativas. Sin embargo, las sustituciones conservativas no están incluidas como un apareamiento cuando se determina la identidad entre secuencias.

Para los fines de la presente invención, un virus "vivo" o una bacteria "viva" se refiere a un virus o a una bacteria que puede replicarse en un hospedador. Un virus vivo preferido y una bacteria viva preferida de la presente invención son los virus del PRRS y la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* respectivamente. Sin embargo, la expresión virus vivo o bacteria viva no se limita al virus del PRRS ni a la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae*, respectivamente.

La parte del primer líquido puede separarse del antígeno de PCV-2 por un cambio en la parte del primer líquido por un segundo líquido en donde el segundo líquido es diferente del primer líquido (véase la definición de segundo líquido). Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido y en donde el segundo líquido es diferente del primer líquido. Preferentemente, el intercambio de la parte del primer líquido por el segundo líquido comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2 por un intercambio de al menos una parte del primer líquido por un segundo líquido que comprende las etapas a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2.

La parte del primer líquido puede separarse del antígeno de PCV-2 por una etapa de filtración utilizando un filtro. Sin embargo, puede usarse cualquier otro método conocido por un experto en la materia para separar la parte de cualquier líquido, incluyendo el primero y, si fuera aplicable, una parte del segundo líquido del antígeno de PCV-2. Dicho método, por ejemplo, incluye pero sin limitación, centrifugación y/o cromatografía. Sin embargo, se prefiere más la filtración. Un método de filtración preferido para separar la parte del primer líquido o de cualquier otro líquido, cuando sea aplicable, comprende la ultra- y/o dia-filtración. La ultra- y dia-filtración son métodos convencionales conocidos por un experto en la materia, descritos con detalle, por ejemplo, en *Protein Purification Methods - A Practical Approach* – editors: E.L.V. Harris y S. Angel, Oxford University Press 1995. En particular, en el Capítulo 3 de este libro de texto, se describen diversos métodos y tipos de equipos, todos los cuales puede usar un experto habitual en la materia de una manera ilustrativa para los fines de la presente invención. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica PCF-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por filtración, preferentemente por dia- o ultrafiltración. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del

antígeno de PCV-2 por un intercambio de al menos una parte del primer líquido por un segundo líquido que comprende las etapas a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2 .

5 Como se ha definido anteriormente, un segundo líquido preferido para usar en cualquiera de los métodos descritos es un tampón, prefiriéndose preferentemente de manera particular un tampón con solución salina fisiológicamente aceptable. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, por un intercambio por un tampón, preferentemente un tampón fisiológicamente aceptable tal como un tampón con solución salina o fosfato o similar. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por filtración, preferentemente por dia- y/o ultrafiltración. Más preferentemente, la parte de intercambio de al menos una parte del primer líquido por el tampón, preferentemente el tampón fisiológicamente aceptable, tal como tampón con solución salina o fosfato o similar, al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquido que es un tampón, preferentemente un tampón fisiológicamente aceptable, tal como tampón con solución salina o fosfato o similar, del antígeno de PCV-2, preferentemente por filtración, incluso más preferentemente por dia- y/o ultrafiltración.

La etapa de concentración y la etapa de adición de líquido del método como se describe en el presente documento puede realizarse sustancialmente de manera simultánea o alternativa, la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan secuencialmente. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido que comprende las etapas a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2, en donde la etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial. Preferentemente, la parte del primer líquido y en el caso de la adición del segundo líquido, la mezcla del primer y segundo líquido se separa del antígeno de PCV-2 por filtración, preferentemente por diafiltración y/o ultrafiltración.

30 Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Por ejemplo, en un aspecto adicional, la etapa de adición de líquido se produce antes de la etapa de concentración y en un aspecto alternativo, la etapa de concentración se produce antes de la etapa de adición de líquido. La etapa de adición de líquido y la etapa de concentración, independientemente del orden en donde se realicen, pueden realizarse varias veces. Por ejemplo, cada una de estas etapas respectivas puede realizarse al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos 10, hasta tantas veces como se desee. En un aspecto, cada etapa de concentración y etapa de adición de líquido se realiza al menos dos veces. En otro aspecto, cada etapa de concentración y etapa de adición de líquido se realiza al menos tres veces. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 en donde el método comprende generalmente las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2 por un intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido, en donde el intercambio se realiza veces múltiples. Preferentemente, el intercambio de la parte del primer líquido contra una parte del segundo líquido comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2 , en donde la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realizan veces múltiples, por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, etc. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza dos veces, más preferentemente tres veces. Como se ha descrito anteriormente, el método preferido es la filtración para separar una parte del primer líquido o en caso de múltiples etapas de separación, como se describe anteriormente, para separar una parte de la mezcla del primer y segundo líquido, del antígeno de PCV-2.

El filtro puede ser cualquier filtro convencional en la materia. Preferentemente, el filtro incluye una membrana semipermeable. En una forma adicional preferida, la membrana semipermeable tiene un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 para así impedir el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retener el antígeno de PCV-2 en el filtro. En un aspecto adicional, el filtro tiene un tamaño de poro promedio que impide el paso de al menos 90% de las proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, el filtro tiene un tamaño de poro promedio que impide el paso de al menos 90% de las proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño y más preferentemente, el filtro tiene un tamaño de poro promedio que impide el paso de al menos 90% de las proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Se prefiere este tamaño de poro, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. En otro aspecto, la membrana semipermeable incluye un material seleccionado del grupo que consiste en polisulfona, poliétersulfona y celulosa regenerada. Sin embargo, también puede usarse cualquier otro material que permita separar una parte del primer líquido, y en caso de una etapa de proceso múltiple, separar una mezcla del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2. El filtro puede seleccionarse del grupo que consiste en un cartucho, laminas planas o un casete de ultrafiltración de membrana de fibra hueca, prefiriéndose particularmente un cartucho de ultrafiltración de membrana de fibra hueca. Por tanto de acuerdo con un aspecto adicional de la presente solicitud,

se proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 como se ha descrito anteriormente. El método generalmente comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2 por una etapa de filtración, en donde el filtro preferentemente es o comprende una membrana semipermeable. Preferentemente, la membrana semipermeable posee un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos el 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Se prefiere este tamaño de poro, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. Como se ha descrito anteriormente, la etapa de separación incluye en general el intercambio de la parte del primer líquido por una parte del segundo líquido que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2 , en donde la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, etc. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realizan dos veces, más preferentemente tres veces.

La etapa de concentración del método proporcionado en el presente documento se realiza de tal manera que el antígeno de PCV-2 se concentra de 3X a 50X en comparación con el volumen del primer líquido. Más preferentemente, la etapa de concentración se realiza de tal manera que el antígeno de PCV-2 se concentra de 4X a 20X en comparación con el volumen del primer líquido. Más preferentemente, la etapa de concentración se realiza de tal manera que el antígeno de PCV-2 se concentra de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 y en donde el antígeno de PCV-2 se concentra de 3X a 50X, preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 de 3X a 50X, preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces, incluso más preferentemente tres veces. En tal caso, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. Preferentemente, la membrana semipermeable posee un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

En un aspecto adicional, la actividad viricida de la composición antigénica de PCV-2 producida por los métodos del presente documento se reduce al menos 10% en comparación con el líquido que no se somete al método. Más preferentemente, la actividad viricida de la composición antigénica de PCV-2 se reduce en al menos 50% en comparación con el primer líquido que no se somete al método. Aún más preferentemente, la actividad viricida de la composición antigénica de PCV-2 se reduce en al menos 70% en comparación con el primer líquido que no se somete al método.

Para el fin de la presente invención la expresión "actividad viricida" significa, que un líquido, solución o composición inactiva o destruye un virus vivo o bacteria viva a un grado determinado, cuando el líquido, solución o composición se mezcla con dichos virus vivos o bacterias vivas. Por tanto, una reducción de la actividad viricida de un líquido, solución o composición en al menos 10% significa que el índice de supervivencia de un virus vivo o una bacteria viva es 90% superior en un líquido, solución o composición que se ha sometido a cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, en comparación con un líquido, solución o composición, que no se ha sometido a ninguno de los métodos descritos en el presente documento. De acuerdo con la presente invención, el virus PRRS, preferentemente el virus PRRS que posee el número de acceso VR 2332 de la ATCC, es el virus de referencia para la determinación de la actividad viricida. Para determinar la actividad viricida con respecto a una bacteria, se propone el uso de la bacteria *Mycoplasma hyopneumonia*, preferentemente la cepa J de *Mycoplasma hyopneumonia*.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un

antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde la actividad viricida - preferentemente con respecto al virus PRRS- de la composición antigénica de PCV-2 obtenida después de la etapa ii) se reduce al menos 10%, preferentemente al menos 50%, más preferentemente al menos 70%, incluso más preferentemente al menos 90% en comparación con la del primer líquido. Preferentemente, la parte del primer líquido que posee actividad viricida se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces e incluso más preferentemente tres veces. En tal caso, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición de líquido se realizan sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. Preferentemente, la membrana semipermeable posee un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

En un aspecto adicional, el método comprende adicionalmente la etapa de recoger el antígeno de PCV-2 obtenido después de que al menos una parte del primer líquido se haya separado del antígeno de PCV-2.

Como se usa en el presente documento, "recoger" o "recogida" se refiere a recobrar o recuperar el antígeno de PCV-2. Para recuperar el antígeno de PCV-2 puede usarse cualquier procedimiento convencional conocido en la materia bien cuando se produce un antígeno para su uso con los métodos y composiciones de la presente solicitud o bien cuando el antígeno de PCV-2 se somete a lo métodos descritos en el presente documento. De una manera particularmente preferida de recogida, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 mediante una etapa de filtración y el antígeno de PCV-2 se recupera o se recoge del retardo del filtro. En una forma más preferida, el antígeno de PCV-2 se recoge o se recobra o se recupera del retardo de una membrana de una membrana semipermeable que posee el tamaño de poro descrito en el presente documento. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde el antígeno de PCV-2 obtenido después de la etapa ii) se recoge. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir un segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces incluso más preferentemente tres veces. En dichos casos, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente, cada etapa de adición de líquido se realizan sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

El antígeno de PCV-2 restante se somete después a los métodos proporcionados en el presente documento, preferentemente después de haberse recogido del retardo del filtro, se mezcla con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, el componente adicional es un adyuvante, incluso más preferentemente el adyuvante es un polímero de ácido acrílico o metacrílico y aún más preferentemente el adyuvante es Carbómero (el nombre genérico de polímeros sintéticos de alto peso molecular del ácido acrílico).

Como se usa en el presente documento, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" y un "vehículo veterinario

aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la adsorción y similares.

5 El término "adyuvantes", como se usa en el presente documento, puede incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo Quil A, CS-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 puede basarse en particular en aceite ligero de parafina líquida (del tipo de la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide, tal como escualano o escualeno; aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo lineal alquilo más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o alcoholes ramificados, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferentemente tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, que están opcionalmente etoxilados y copolímeros en bloque de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, especialmente L121. Véase Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd et al., *Vaccine 15: 564-570* (1997). Por ejemplo, es posible usar la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editada por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de este mismo libro. Otros adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), copolímero en bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil-lípido A, adyuvante de lípido-amina Avridina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o de otra manera), toxina del cólera, IMS 1314 o muramil dipéptido, entre muchos otros. Entre los copolímeros de derivados de anhídrido maleico y alqueno, se incluyen los copolímeros EMA (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua conduce una solución ácida que se neutralizará, preferentemente a pH fisiológico, para proporcionar la solución adyuvante en donde se incorporará la propia composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna.

Un ejemplo adicional de un adyuvante es un compuesto seleccionado de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de derivados de anhídrido maleico y alqueno. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros del ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialquenoil-éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término Carbomer (Phameuropa Vol. 8, n° 2, junio 1996). Los expertos en la materia también hacen referencia a la patente de EE.UU. n° 2.909.462 que describe dichos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente no más de 8, sustituyéndose los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos por radicales alifáticos insaturados que poseen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los propios radicales insaturados pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos comercializados con el nombre CARBOPOL® ; (BF Goodrich, Ohio, Estados Unidos) son particularmente apropiados. Estos son polímeros de ácido acrílico reticulados con éteres de polialquenoil o divinil glicol o reticulados con alil sacarosa o con alil pentaeritrol. Entre estos, pueden mencionarse CARBOPOL® 974P, 934P y 971P. Se prefiere usar más CARBOPOL® 971P.

Preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. Más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis. más preferentemente el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

Los "diluyentes" pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetracético, entre otros.

Un "conservante", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente anti-microbiológico activo tal como, por ejemplo, gentamicina, mertiolato y similares. En particular, la adición de un conservante se prefiere más para la preparación de una composición multi-dosis. Estos agentes anti-microbiológicos activos se añaden en concentraciones eficaces para impedir que cualquier contaminación microbiana de la composición de interés o para inhibir cualquier crecimiento microbiano dentro de la composición de interés.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, que comprende adicionalmente la etapa de mezclar el antígeno de PCV-2 restante después de la etapa ii) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, cuando el componente adicional es un adyuvante,

incluso más preferentemente cuando el adyuvante es un polímero de ácido acrílico o metacrílico, y aún más preferentemente cuando el adyuvante es Carbomer. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces e incluso más preferentemente tres veces. En dichos casos, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

El antígeno de PCV-2 usado en los métodos descritos anteriormente puede ser cualquier antígeno de PCV-2 como se define en el presente documento. Preferentemente el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2, e incluso más preferentemente el antígeno incluido en INGELVAC CIRCOFLEX®. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente solicitud, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2.

Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces e incluso más preferentemente tres veces. En dichos casos, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

El primer líquido usado que contiene el antígeno de PCV-2 puede obtenerse por cualquier método conocido en la materia. Preferentemente, el primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 así como el antígeno de PCV-2 puede obtenerse por cualquiera de los métodos descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO2006/072065.

En particular, el antígeno de PCV-2, cuando se expresa de manera recombinante in vitro en células hospedadoras, puede obtenerse mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF-2 del PCV-2.

Los vectores y métodos para preparar y/o usar vectores (o recombinantes) para la expresión del antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 pueden ser mediante o análogos a los métodos descritos en: las patentes de Estados Unidos N° 4.603.112, 4.769.330, 5.174.993, 5.505.941, 5.338.683, 5.494.807, 4.722.848, 5.942.235, 5.364.773, 5.762.938, 5.770.212, 5.942.235 y 382.425, las publicaciones PCT WO 94/16716, WO 96/39491 y WO 95/30018, Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93:

11349-11353, octubre de 1996, Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, octubre de 1996, Smith et al., patente de Estados Unidos N° 4.745.051, (baculovirus recombinante), Richardson, C. D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.), Smith et al., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, Dic., 1983, Vol. 3, N° 12, p. 2156-2165; Pennock et al., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector," Molecular and Cellular Biology Mar. 1984, Vol. 4, N° 3, p. 399-406; EPA0 370 573, solicitud de patente de Estados Unidos N° 920,197, presentada el 16 de octubre de 1986, publicación de patente EP N° 265785, patente de Estados Unidos N° 4.769.331 (herpesvirus recombinante), Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, octubre de 1996, Andreansky et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, octubre de 1996, Robertson et al. "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, octubre de 1996, Frolov et al., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, octubre de 1996, Kitson et al., J. Virol. 65,3068-3075,1991; Patentes de Estados Unidos N° 5.591.439, 5.552.143, WO 98/00166, Solicitudes de Estados Unidos concedidas los N° de Serie 08/675,556 y 08/675,566 ambas presentadas el 3 de julio 1996 (adenovirus recombinante), Grunhaus et al., 1992,"Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology (Vol. 3) págs. 237-52, 1993, Ballay et al. EMBO Journal, vol. 4, p. 3861-65, Graham, Tibtech 8,85-87, abril de 1990, Prevec et al., J. Gen Virol. 70,42434, PCT WO 91/11525, Feigner et al. (1994), J. Biol. Chem. 269,2550-2561, Science, 259: 1745-49,1993 y McClements et al., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, octubre de 1996, y las patentes de Estados Unidos N° 5.591.639, 5.589.466 y 5.580.859, así como los documentos WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660, Tang et al., Nature y Furth et al. Analytical Biochemistry, con respecto a vectores de expresión de ADN, entre otros. Véase también el documento WO 98/33510; Ju et al., Diabetologia, 41: 736-739,1998 (sistema de expresión lentiviral); Sanford et al., Patente de Estados Unidos N° 4.945.050; Fischbach et al. (Intracel), documento WO 90/01543; Robinson et al., seminarios de Inmunología vol. 9, págs. 271-283 (1997), (sistemas vectoriales de ADN); Szoka et al., Patente de Estados Unidos N° (método de inserción de ADN en células vivas); McCormick et al., Patente de Estados Unidos N° 5.677.178 (uso de virus citopáticos); y la Patente de Estados Unidos N° 5.928.913 (vectores para la administración de genes), así como otros documentos citados en el presente documento. La expresión del antígeno ORF2 del PCV-2 en células de insecto se describe, por ejemplo, en el documento WO 06/072065. El antígeno ORF2 del PCV-2 de acuerdo con la descripción puede obtenerse mediante diversos métodos conocidos en la materia. En el presente documento se describen métodos preferidos. El antígeno ORF2 del PCV-2 puede producirse de manera recombinante in vitro mediante el método que comprende las etapas i) permitir la infección de células susceptibles en cultivo con un vector viral recombinante que contenga la secuencia codificante de ORF2 del PCV-2, en donde el vector viral recombinante expresa la proteína ORF2 del PCV-2 y ii) después recuperar el antígeno ORF2 del PCV-2 del cultivo celular. El antígeno ORF2 del PCV-2 se recupera recogiendo las SF + células completas (es decir intactas) que expresan el antígeno ORF2 del PCV-2.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente solicitud, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente la ORF-2 del PCV-2 y en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Cuando se usa un vector viral, en particular un baculovirus recombinante que contiene y expresa el antígeno de PCV-2 para producir/obtener el antígeno de PCV-2, el método descrito anteriormente comprende adicionalmente la etapa de inactivar al vector viral, preferentemente al vector viral baculovirus recombinante, con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilenimina binaria. Preferentemente, la etapa de inactivación se realiza después de que al menos una parte del primer líquido se haya separado del antígeno de PCV-2, más preferentemente después de recoger el antígeno de PCV-2. Incluso más preferentemente, la etapa de inactivación se realiza después de que la parte del primer líquido se separe del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. Cuando el intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido se realiza de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2, la etapa de inactivación se realiza después de la etapa de concentración. Cuando la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces, incluso más preferentemente tres veces, la etapa de inactivación se realiza después de la última etapa de adición de líquido y etapa de concentración. Cuando la etapa de concentración se realiza por filtración - preferentemente por dia- u/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable, la etapa de inactivación se realiza después de la etapa de filtración descrita anteriormente, utilizando preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y

retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

La expresión "agente inactivante de ADN", para los fines de la presente descripción, se refiere a cualquier agente químico que desactive el ADN, preferentemente, ADN de un patógeno, de manera que el patógeno no pueda ocasionar una infección activa o ser infeccioso o replicarse, pero que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Preferentemente, el agente inactivante de ADN es formalina.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF-2 del PCV-2, en donde el método comprende adicionalmente la etapa de inactivar el vector viral, preferentemente el vector viral baculovirus recombinante con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilenimina binaria, y en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Preferentemente, la etapa de inactivación se realiza después de que al menos una parte del primer líquido se haya separado del antígeno de PCV-2, más preferentemente después de recoger el antígeno de PCV-2. Incluso más preferentemente, la etapa de inactivación se realiza después de que la parte del primer líquido se separe del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. Cuando el intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido se realiza de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2, la etapa de inactivación se realiza después de la etapa de concentración. Cuando la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces, incluso más preferentemente tres veces, la etapa de inactivación se realiza después de la última etapa de adición de líquido y etapa de concentración. Cuando la etapa de concentración se realiza por filtración - preferentemente por dia- u/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable, la etapa de inactivación se realiza después de la etapa de filtración descrita anteriormente, utilizando preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

En el caso en donde se use un agente inactivante de ADN en el método de acuerdo con la descripción, el método comprende adicionalmente la etapa de añadir una cantidad de un agente que neutralice el agente inactivante de ADN, siendo la cantidad equivalente la cantidad del agente inactivante de ADN en donde el agente que neutraliza al agente inactivante de ADN comprende una solución de tiosulfato de sodio concentrada a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM y en donde el agente de inactivación de ADN es BEI. Preferentemente, la etapa de inactivación se realiza después de que al menos una parte del primer líquido se separe del antígeno de PCV-2.

La expresión "agente que neutraliza al agente inactivante" o "agente neutralizante", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente capaz de neutralizar a los agentes inactivantes indicados anteriormente de manera que el agente inactivante ya no sea capaz de inactivar al ADN. El agente que neutraliza al agente inactivante es preferentemente tiosulfato de sodio.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un antígeno de PCV-2 en un primer líquido en donde el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF2 del PCV-2 y en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2; ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2; iii) inactivar el vector viral baculovirus recombinante con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilenimina binaria; iv) añadir una cantidad de agente neutralizante que neutralice al agente inactivante, siendo la cantidad de agente neutralizante equivalente a la cantidad de agente inactivante, en donde el agente neutralizante

comprende preferentemente una solución de tiosulfato de sodio preferentemente concentrada a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM y en donde el agente inactivante comprende preferentemente BEI. Preferentemente, la etapa de inactivación y neutralización se realiza después de que al menos una parte del primer líquido se haya separado del antígeno de PCV-2, más preferentemente después de recuperar el antígeno de PCV-2. Incluso más preferentemente, la etapa de inactivación y neutralización se realiza después de que la parte del primer líquido se separe del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. Cuando el intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido se realiza de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2, la etapa de inactivación y neutralización se realiza después de la etapa de concentración. Cuando la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces, incluso más preferentemente tres veces, la etapa de inactivación y neutralización se realiza después de la última etapa de adición de líquido y etapa de concentración. Cuando la etapa de concentración se realiza por filtración - preferentemente por dia- u/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable, la etapa de inactivación y neutralización se realiza después de la etapa de filtración descrita anteriormente, utilizando preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

En un aspecto adicional de la presente solicitud, el método descrito anteriormente comprende adicionalmente las etapas de mezclar el antígeno de PCV-2 obtenido después de las etapas de inactivación y neutralización con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un antígeno de PCV-2 en un primer líquido en donde el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF2 del PCV-2 y en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2; ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2; iii) inactivar el vector viral baculovirus recombinante con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilenimina binaria; iv) añadir una cantidad de un agente neutralizante que neutralice al agente inactivante, siendo preferentemente la cantidad de agente neutralizante equivalente a la cantidad de agente inactivante, en donde el agente neutralizante comprende preferentemente una solución de tiosulfato de sodio preferentemente concentrada a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM y en donde el agente inactivante comprende preferentemente BEI. y v) mezclar el antígeno de PCV-2 obtenido en la etapa iv) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Preferentemente, en la etapa ii), la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces incluso más preferentemente tres veces. En tal caso, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

De acuerdo con un aspecto adicional, cualquier método descrito anteriormente para obtener un antígeno de PCV-2 con actividad viricida reducida puede incluir etapas de purificación adicionales para obtener un antígeno de PCV-2 purificado. Sorprendentemente se observó que una composición antigénica o inmunogénica que comprendía un antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente en combinación con un adyuvante, no solo mostraba una actividad viricida reducida como se describe en el presente documento, sino también presentaba una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica, que no comprendía un antígeno de PCV-2 purificado, lo que significa que comprende un antígeno de PCV-2 no purificado o en bruto.

La expresión “antígeno de PCV-2 purificado” significa, que el antígeno de PCV-2 se purifica en una preparación hasta un grado de más de 50% (p/p), preferentemente de más de 60% (p/p), preferentemente de más de 70% (p/p), preferentemente de más de 80% (p/p), preferentemente de más de 85% (p/p), más preferentemente de más de 90% (p/p), incluso más preferentemente de más de 95% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica. En otras palabras, si una preparación comprende un antígeno de PCV-2 con un grado de pureza de 80% (p/p), dicha preparación comprende no más 20% (p/p) de proteínas no PCV-2 con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica. Preferentemente, el grado de pureza se mide en la preparación, es decir en la composición inmunogénica antes de mezclar con adyuvantes o con cualquier otros excipientes o agente inactivante. Sin embargo, si el adyuvante usado en la composición inmunogénica final es un adyuvante no basado en proteínas, la adición del adyuvante no posee ningún efecto de valor sobre la pureza. El grado de pureza del antígeno de PCV-2 puede calcularse por métodos convencionales conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, por Mancha de Proteína Imperial (Pierce) después de preparación en SDS-PAGE, cromatografía de gases, análisis por HPLC, etc. El método preferido de acuerdo con la presente descripción para calcular la pureza o grado de pureza de un antígeno de PCV-2 en una preparación, es decir una composición inmunogénica, es la tinción con Manchas de Proteína Imperial (Pierce), que se realiza de la siguiente manera: La preparación que comprende el antígeno de PCV-2 se separa mediante geles Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen) usando el sistema de tampón MOPS NuPAGE (Invitrogen). Los geles se procesaron en condiciones desnaturizantes (todos los tampones poseían SDS en su interior) y reductoras (el tampón de carga poseía 2-mercaptoetanol). Después de cargar los geles con las muestras, los geles se procesaron durante 55 min a 200 Volts constantes. Una vez completado el procesamiento, los geles se tiñeron usando la Mancha de Proteína Imperial (Pierce) y se destiñeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Por otro lado, la expresión antígeno de PCV-2 “no purificado” o “bruto” se refiere a una preparación en bruto que comprende el antígeno de PCV-2. El antígeno de PCV-2 normalmente se produce in vitro en cultivos celulares. Por tanto, un antígeno de PCV-2 en bruto se refiere a una mezcla de antígeno de PCV-2 y el cultivo celular o el material de cultivo celular usado para la producción del antígeno de PCV-2. Además, un antígeno de PCV-2 no purificado también significa un antígeno de PCV-2 purificado parcialmente, que posee preferentemente un grado de pureza de menos de 50% (p/p), más preferentemente de menos de 40% (p/p), incluso más preferentemente de menos de 30% (p/p), incluso más preferentemente de menos de 20% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica.

Además, las expresiones “inmunogenicidad aumentada o inmunogenicidad mejorada”, como se usa en el presente documento, significa que la respuesta inmunitaria producida por una composición inmunogénica que comprende un antígeno de interés aumenta en comparación con una composición inmunogénica de referencia que comprende un antígeno diferente o un grado de pureza del antígeno diferente, si esta respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por células y/o medida por anticuerpos. De acuerdo con un aspecto preferido, la expresión inmunogenicidad aumentada o inmunogenicidad mejorada significa que la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos provocada por una composición inmunogénica que comprende el antígeno de interés aumenta en comparación con una composición inmunogénica de referencia que comprende un antígeno diferente o un grado de pureza del antígeno diferente. En este sentido, la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos significa, que la producción de anticuerpos, que es específica del antígeno de interés aumenta en comparación con la producción de anticuerpos provocada por una composición inmunogénica de referencia que comprende un antígeno diferente o un grado de pureza del antígeno diferente.

El término “aumentado” significa, que la respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos aumenta al menos 10%, preferentemente al menos 20%, más preferentemente al menos 30%, incluso más preferentemente al menos 40%, incluso más preferentemente al menos 50%, incluso más preferentemente al menos 75%, más preferentemente al menos 100% en comparación con la respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos provocada por una composición inmunogénica de referencia que comprende un antígeno diferente o un grado de pureza diferente del antígeno.

En el conocimiento general de un experto en la materia se encuentra como medir la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos y/o células. En particular, para dicho experto en la materia es evidente comparar la respuesta inmunitaria mediada por células de la composición inmunogénica de interés con la respuesta inmunitaria mediada por células de la composición de referencia o la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos de la composición inmunogénica de interés con la de la composición de referencia, pero ninguna de la respuesta inmunitaria mediada por células de una composición inmunogénica de interés con la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos de la composición de referencia o vice versa. Además, la respuesta inmunitaria mediada por células puede medirse, por ejemplo, midiendo la activación de células T citotóxicas por una composición/inmunogénica/antígeno de interés. La

respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos puede medirse, por ejemplo, midiendo la cantidad de anticuerpos específicos contra antígenos, generados debido a la administración de la composición inmunogénica que comprende dicho antígeno a un animal. La respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos puede medirse, por ejemplo, usando un modelo murino. De acuerdo con la presente descripción, el modelo murino se usa como el método de referencia.

La expresión "composición inmunogénica" significa, pero sin limitación, una composición objeto que comprende al menos un antígeno que provoca una respuesta inmunitaria mediada por células y/o antígenos en un hospedador contra el antígeno de interés. Habitualmente, una "respuesta inmunitaria" incluye, pero sin limitación, 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 gamma-delta, dirigidas específicamente contra un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el hospedador presentará una respuesta inmunitaria terapéutica o protectora, de tal manera que la resistencia a nueva infección se potenciará y/o la gravedad clínica de la enfermedad se reducirá. En tal caso, la composición inmunogénica es una "vacuna". Dicha protección se demostrará por una reducción o ausencia de síntomas mostrados normalmente por un hospedador infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral más bajo en el hospedador infectado.

La purificación adicional del antígeno de PCV-2 puede conseguirse con procedimientos cromatográficos, preferentemente un procedimiento cromatográfico en dos etapas. Si el antígeno de PCV-2 se ensambla con partículas similares a virus (VLP), una etapa, preferentemente la primera etapa, es preferentemente una cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel) que puede realizarse, por ejemplo, usando una matriz Sephacryl S300. En una escala de laboratorio se prefiere más el uso de columnas HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR. Sin embargo, en la técnica puede usarse cualquier otras matrices de cromatografía de exclusión por tamaño conocidas por un experto en la materia que permita, la separación de las VLP de la ORF2 del PCV-2 del filtrado o sobrenadante de cultivo. Se describen matrices adecuadas, por ejemplo, en E.L.V. Harris y S. Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL Press Oxford 1995). La cromatografía de filtración en gel puede realizarse, por ejemplo, cargando la columna con la preparación en bruto que comprende el antígeno de PCV-2 con un caudal de 1,0 ml/min y eluyendo la columna con un volumen de columna de 1,5 de un tampón que comprende Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM. Sin embargo, el antígeno ORF2 del PCV-2 también puede purificarse usando cromatografía de afinidad, por ejemplo, mediante unión selectiva a un anticuerpo específico de ORF2 del PCV-2 inmovilizado, o cualquier otro método conocido por un experto en la materia.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto preferido, la presente descripción proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2 y iii) purificar lo recogido de la etapa ii) que comprende el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 por procedimientos cromatográficos. La cromatografía de exclusión por tamaño se realiza preferentemente como se describe en el presente documento, preferentemente como se describe en el Ejemplo 3. Preferentemente, la exclusión por tamaño da como resultado una composición inmunogénica que posee un grado de pureza de más de 80% (p/p), preferentemente más de 90% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica antes de la mezcla con el adyuvante. El grado de pureza puede calcularse por tinción con Mancha de Proteína Imperial (Pierce) después de SDS PAGE mediante geles Bis-Tris en NuPAGE al 10% (Invitrogen) usando el sistema de tampón MOPS NuPAGE (Invitrogen).

Por tanto, de acuerdo con un aspecto preferido la presente descripción proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2 y iii) purificar lo recogido de la etapa ii) que comprende el antígeno de PCV-2, por cromatografía de exclusión de tamaño (filtración en gel).

Para obtener un grado de pureza más alto puede realizarse una segunda etapa de cromatografía, que sin embargo, es diferente de la primera. Por ejemplo, si la primera etapa de purificación/etapa de cromatografía es de exclusión por tamaño (filtración en gel) la segunda debe ser diferente, por ejemplo, una cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc. Preferentemente, si la primera etapa para purificar el antígeno de PCV-2, preferentemente para purificar el antígeno ORF2 del PCV-2, es una cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel), la segunda etapa puede ser una cromatografía por intercambio iónico, preferentemente cromatografía por intercambio aniónico (AIEX). Una matriz de cromatografía de intercambio aniónico preferida para la purificación del antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2, es Q Sepharose. En una escala pequeña de aproximadamente 50 ml, se prefiere más el uso de columnas HiTrap Q Sepharose HP 5 ml. La cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, sobre la columna AIEX pueden cargarse aproximadamente 50 ml del conjunto de la fracción de volumen inicial de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño a un caudal de 3,0 ml/min. Después de una etapa de lavado usando, por ejemplo, Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM para separar el material no unido, la proteína puede eluirse con una sola etapa de volúmenes de 8 columnas del siguiente tampón (Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM, NaCl 1,0 M). El flujo a través del procesamiento AIEX puede cargarse de nuevo sobre la columna Q Sepharose y eluirse, como se ha descrito anteriormente, para aumentar el rendimiento. Esta técnica en dos etapas (cromatografía exclusión por tamaño seguido de cromatografía de intercambio aniónico) separa eficazmente el antígeno ORF2 del

PCV-2 de la mayoría del resto de componentes de proteínas del material recogido del cultivo.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto preferido, la presente descripción proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2 y iii) purificar el material recogido de la etapa ii) que comprende el antígeno de PCV-2, mediante una cromatografía en dos etapas. Preferentemente la primera etapa de cromatografía es diferente de la segunda etapa. Si la primera etapa es una cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel) la segunda etapa puede ser una cromatografía de intercambio iónico, preferentemente cromatografía de intercambio aniónico (AIX). Preferentemente, en cualquiera de los métodos descritos anteriormente, que incluye una o más etapas de purificación adicionales para obtener un antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente una proteína ORF-2 del PCV-2, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces e incluso más preferentemente tres veces. En dichos casos, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente, cada etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. En formas preferidas, el método para producir una composición antigénica de PCV-2 descrita anteriormente comprende adicionalmente las etapas de i) obtener un antígeno de PCV-2 en un primer líquido en donde el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF2 del PCV-2 y en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2; ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2; iii) inactivar el vector viral baculovirus recombinante con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilendiamina binaria; iv) añadir una cantidad de un agente neutralizante que neutralice al agente inactivante, siendo la cantidad de agente neutralizante equivalente a la cantidad de agente inactivante, en donde el agente neutralizante comprende preferentemente una solución de tiosulfato de sodio preferentemente concentrada a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM y en donde el agente inactivante comprende preferentemente BEI. y v) mezclar el antígeno de PCV-2 obtenido en la etapa iv) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. La purificación adicional, preferentemente, la estrategia de purificación en dos etapas que incluye la etapa de prefiltración dará como resultado una composición inmunogénica que posee un grado de pureza de más de 80% (p/p), preferentemente de más de 85% (p/p), incluso más preferentemente de más de 90% (p/p), más preferentemente o más de 95% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica antes de la mezcla con cualquier adyuvante.

La composición antigénica de PCV-2 producida por el método descrito en el presente documento produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 1 log de un virus vivo o de UFC de menos de 1 log por ml de una bacteria viva, en donde el virus vivo o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante dos horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, más preferentemente durante más de 2 años. Más preferentemente, la composición antigénica de PCV-2 producida por el método descrito en el presente documento produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0.9 log de un virus vivo o de UFC de menos de 0.9 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante dos horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más

preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, más preferentemente durante más de 2 años. Incluso más preferentemente, la composición antigénica de PCV-2 producida por el método descrito en el presente documento produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0,7 log por ml de un virus vivo o menos de UFC de 0,7 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante dos horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, más preferentemente durante más de 2 años. Incluso más preferentemente, la composición antigénica de PCV-2 producida por el método descrito en el presente documento produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0,5 log por ml de un virus vivo o de UFC de menos de 0,5 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante dos horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, más preferentemente durante más de 2 años. Incluso más preferentemente, la composición antigénica de PCV-2 producida por el método descrito en el presente documento produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0,3 log por ml de un virus vivo o de UFC de menos de 0,3 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante dos horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, más preferentemente durante más de 2 años. El virus vivo puede ser cualquier virus vivo, pero preferentemente el virus vivo es el virus del PRRS, preferentemente el virus del PRRS que posee el número de acceso VR 2332 de la ATTC. La bacteria viva puede ser cualquier bacteria, pero es preferentemente la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae*, preferentemente la cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae*. La TCID₅₀ por ml puede calcularse mediante un ensayo de titulación in vitro convencional que permite calcular la cantidad de un virus vivo. La UFC por ml también puede determinarse mediante un ensayo de titulación in vitro convencional que permite calcular la cantidad de una bacteria viva. La expresión "por ml" se refiere preferentemente a 1 ml de un líquido. Dicho antígeno de PCV-2 purificado, no solo muestra actividad viricida reducida, como se define en el presente documento, sino que también muestra una o una inmunogenicidad aumentada en comparación con un antígeno de PCV-2 no purificado como se define en el presente documento, preferentemente dicho antígeno de PCV-2 purificado aumenta la respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos al menos 10%, preferentemente al menos 20%, más preferentemente al menos 30%, incluso más preferentemente al menos 40%, incluso más preferentemente al menos 50%, incluso más preferentemente al menos 75%, más preferentemente al menos 100% en comparación con la respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos provocada por una composición inmunogénica de referencia que comprende un antígeno de PCV-2 no purificado.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde la composición antigénica de PCV-2 obtenida después de la etapa ii) provoca una pérdida de TCID₅₀ de menos de 1 log - preferentemente por ml -, preferentemente una TCID₅₀ de menos de 0,9 log, -preferentemente por ml -, incluso más preferentemente una TCID₅₀ de menos de 0,7 log - preferentemente por ml -, incluso más preferentemente una TCID₅₀ de menos de 0,5 log, -preferentemente por ml -, más preferentemente una TCID₅₀ de menos de 0,3 log - preferentemente por ml - de un virus vivo, preferentemente de un PRRSV vivo o una UFC de menos de 1 log - preferentemente por ml -, preferentemente una UFC de menos de 0,9 log - preferentemente por ml -, incluso más preferentemente una UFC de menos de 0,7 log - preferentemente por ml -, incluso más preferentemente una UFC de menos de 0,5 log - preferentemente por ml -, más preferentemente una UFC de menos de 0,3 log - preferentemente por ml - de una bacteria viva, preferentemente de *Mycoplasma hyopneumoniae*, cuando el virus

vivo, preferentemente el PRRSV o bacteria viva, preferentemente *Mycoplasma hyopneumoniae* se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, más preferentemente durante más de 2 años. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces incluso más preferentemente tres veces. En tal caso, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición de líquido se realizan sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. Cuando el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF2 del PCV-2, el proceso comprende adicionalmente iii) inactivar el vector viral de baculovirus recombinante con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilenimina binaria; iv) añadir una cantidad de agente neutralizante que neutralice al agente inactivante, siendo la cantidad de agente neutralizante equivalente a la cantidad de agente inactivante, en donde el agente neutralizante comprende preferentemente una solución de tiosulfato de sodio preferentemente concentrada a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM y en donde el agente inactivante comprende preferentemente BEI. Preferentemente, las etapas de inactivación y neutralización se realizan después de que al menos una parte del primer líquido se separe del antígeno de PCV-2, más preferentemente después de recoger el antígeno de PCV-2. Incluso más preferentemente, las etapas de inactivación y neutralización se realizan después de que la parte del primer líquido se separe del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. Cuando el intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido se realiza de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2, las etapas de inactivación y neutralización se realizan después de la etapa de concentración. Cuando la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realizan varias veces, preferentemente dos veces e incluso más preferentemente tres veces, dichas etapas de inactivación y neutralización se realizan después de la última etapa de adición de líquido y la etapa de concentración. Cuando la etapa de concentración se realiza por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable, las etapas de inactivación y neutralización se realizan después de la etapa de filtración descrita anteriormente, utilizando preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. Preferentemente, la purificación adicional para obtener un antígeno de PCV-2 purificado, como se define en el presente documento, puede conseguirse realizando una etapa de purificación adicional que comprende iii) purificar el material recogido de la etapa ii) que comprende el antígeno de PCV-2, que se obtiene después de separar una parte del primer líquido, por una etapa de cromatografía. Para obtener un grado de pureza más alto puede realizarse una segunda etapa de cromatografía que, sin embargo, es diferente de la primera. Por ejemplo si la primera etapa de purificación/etapa de cromatografía es por exclusión de tamaño (filtración en gel) la segunda debe ser diferente de esta, por ejemplo, una cromatografía de afinidad,

5 cromatografía de intercambio iónico, etc. Preferentemente, si la primera etapa para purificar el antígeno de PCV-2, preferentemente para purificar el antígeno ORF2 del PCV-2, es una cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel) la segunda etapa puede ser una cromatografía de intercambio iónico preferentemente una cromatografía de intercambio aniónico (AIEX). Una matriz de cromatografía de intercambio aniónico preferida para la purificación del antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 es Q Sepharose. En una pequeña escala de aproximadamente 50 ml, se prefiere más el uso de columnas de 5 ml de HiTrap Q Sepharose HP. La cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, sobre la columna AIEX pueden cargarse aproximadamente 50 ml del conjunto de la fracción del volumen inicial de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño a un caudal de 3,0 ml/min. Después de una etapa de lavado usando, por ejemplo, Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM para separar el material no unido, la proteína puede eluirse con una sola etapa de volúmenes de 8 columnas del siguiente tampón (Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM, NaCl 1,0 M). El flujo a través del cual el procesamiento AIEX puede cargarse de nuevo sobre la columna Q Sepharose y eluirse, como se ha descrito anteriormente para aumentar el rendimiento. Esta técnica en dos etapas (cromatografía de exclusión por tamaño seguido de cromatografía de intercambio aniónico) separa eficazmente el antígeno ORF2 del PCV-2 de la mayoría del resto de componentes de proteína del material recogido del cultivo.

La composición antigénica de PCV-2 obtenida de acuerdo con el método descrito anteriormente o el antígeno de PCV-2 usado en la etapa i) del método descrito anteriormente, puede combinarse con al menos un agente adicional, preferentemente un antígeno viral o bacteriano, incluso más preferentemente, un antígeno viral o bacteriano de al menos otro organismo causante de enfermedades porcinas. El antígeno adicional puede ser cualquiera de los descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO2007/094893. En resumen, los antígenos adicionales pueden ser antígenos de cualquier otro organismo causante de enfermedades porcinas. Preferentemente el "otro organismo causante de enfermedades" porcinas se selecciona del grupo que consiste en: *Actinobacillus pleuropneumonia* (1); *Adenovirus* (2); *Alfavirus*, tal como el virus de la encefalomiелitis equina oriental (3); *Bordetella bronchiseptica* (4); *Brachyspira* spp. (5), preferentemente *B. hyodysenteriae* (6); *B. piosicoli* (7); *Brucella suis*, preferentemente las biovariedades 1, 2 y 3 (8); el virus de la fiebre porcina clásica (9); *Clostridium* spp. (10), preferentemente *Cl. difficile* (11), *Cl. perfringens* tipos A, B y C (12), *Cl. novyi* (13), *Cl. septicum* (14), *Cl. tetani* (15); *Coronavirus* (16), preferentemente *Coronavirus* respiratorio porcino (17); *Eperythrozoonosis suis* (18); *Erysipelothrix rhusiopathiae* (19) *Escherichia coli* (20); *Haemophilus parasuis*, preferentemente subtipos 1, 7 y 14 (21); virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante (22); virus de la encefalitis japonesa (23); *Lawsonia intracellularis* (24) *Leptospira* spp. (25), preferentemente *Leptospira australis* (26); *Leptospira canicola* (27); *Leptospira grippotyphosa* (28); *Leptospira icterohaemorrhagiae* (29); y *Leptospira interrogans* (30); *Leptospira pomona* (31); *Leptospira tarassovi* (32); *Mycobacterium* spp. (33) Preferentemente *M. avium* (34), *M. intracellulare* (35) y *M. bovis* (36); *Mycoplasma hyopneumoniae* (37); *Pasteurella multocida* (38); citomegalovirus porcino (39); parvovirus porcino (40); Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (41PRRS); virus de la pseudorrabia (42); rotavirus (43); *Salmonella* spp. (44), preferentemente *S. thyphimurium* (45) y *S. choleraesuis* (46); *Staph. hyicus* (47); *Staphylococcus* spp. (48) preferentemente *Streptococcus* spp. (49), preferentemente *Strep. suis* (50); herpesvirus porcino (51); virus de la gripe porcina (52); virus de la varicela porcina (53); virus de la varicela porcina (54); virus de la estomatitis vesicular (55); virus de exantema vesicular porcino (56); *Leptospira Hardjo* (57); y/o *Mycoplasma hyosynoviae* (58).

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona una composición antigénica de PCV-2 obtenida mediante un método descrito anteriormente que comprende las etapas de i) obtener un antígeno de PCV-2 en un primer líquido; ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2; y combinar el antígeno de PCV-2 con al menos un antígeno adicional, preferentemente un antígeno viral o bacteriano y más preferentemente un antígeno viral o bacteriano a partir de al menos otro organismo causantes de enfermedades porcinas. Preferentemente, el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces incluso más preferentemente tres veces. En dichos casos, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición de líquido se realizan sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro del filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2

se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. La purificación adicional para obtener un antígeno de PCV-2 purificado puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

En formas preferidas, el método para producir una composición antigénica de PCV-2 descrita anteriormente comprende adicionalmente las etapas de i) obtener un antígeno de PCV-2 en un primer líquido en donde el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF2 del PCV-2 y en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2; ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2; iii) inactivar el vector viral baculovirus recombinante con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilenoimina binaria; iv) añadir una cantidad de agente neutralizante que neutralice al agente inactivante, siendo la cantidad de agente neutralizante equivalente a la cantidad de agente inactivante, en donde el agente neutralizante comprende preferentemente una solución de tiosulfato de sodio preferentemente concentrada a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM y en donde el agente inactivante comprende preferentemente BEI. y v) mezclar el antígeno de PCV-2 obtenido en la etapa iv) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional del método, el al menos un agente adicional es un antígeno a viral, preferentemente un antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Incluso más preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino comprende un virus vivo y aún más preferentemente un virus vivo modificado, incluso más preferentemente un virus atenuado vivo modificado. Aún más preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino Vivo modificado comprende una cepa de virus viva modificada con el Número de Acceso VR 2332 de la ATCC, y aún más preferentemente comprende el MLV (Virus Vivo Modificado) del PRRS INGELVAC®. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, y combinar el antígeno de PCV-2 con un antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino comprende un virus vivo, aún más preferentemente un virus vivo modificado e incluso más preferentemente un virus atenuado vivo modificado. Aún más preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino Vivo modificado comprende una cepa de virus viva modificada con el Número de Acceso VR 2332 de la ATCC, y aún más preferentemente comprende MLV del PRRS INGELVAC®. Preferentemente el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, Más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces, incluso más preferentemente tres veces. En tal caso, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente, cada etapa de adición de líquido se realizan sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que preferentemente contiene una membrana semipermeable. Preferentemente, la membrana semipermeable posee un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. La purificación adicional para obtener un antígeno de PCV-2 purificado puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto adicional de la presente solicitud, el al menos un antígeno adicional es un antígeno bacteriano, preferentemente *Mycoplasma hyopneumoniae*. Preferentemente el antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacterina, y más preferentemente, la bacterina *Mycoplasma hyopneumoniae* es INGELVAC® MYCOFLEX. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, y combinar el antígeno de PCV-2 con un antígeno bacteriano, preferentemente con *Mycoplasma hyopneumoniae*. Preferentemente el antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacterina, y más preferentemente, la bacterina *Mycoplasma*

hyopneumoniae es INGELVAC® MYCOFLEX. Preferentemente el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces incluso más preferentemente tres veces. En dichos casos, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. La purificación adicional para obtener un antígeno de PCV-2 purificado puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto adicional de la presente solicitud, el al menos un antígeno adicional incluye un antígeno viral, preferentemente un antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, como se ha descrito anteriormente y un antígeno bacteriano, preferentemente un antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*, como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino comprende un virus vivo, más preferentemente un virus vivo modificado y aún más preferentemente, comprende una cepa del virus vivo modificado con Número de Acceso VR 2332 de la ATCC, y aún más preferentemente comprende el MLV del PRRS INGELVAC®. Preferentemente, el antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacterina, y más preferentemente, la bacterina *Mycoplasma hyopneumoniae* es INGELVAC® MYCOFLEX. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, y combinar el antígeno de PCV-2 con un antígeno viral, preferentemente un antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, como se ha descrito anteriormente y un antígeno bacteriano, preferentemente un antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*, como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino comprende un virus vivo, más preferentemente un virus vivo modificado y aún más preferentemente, comprende una cepa del virus vivo modificado con Número de Acceso VR 2332 de la ATCC, y aún más preferentemente comprende el MLV del PRRS INGELVAC®. Preferentemente el antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacterina, y más preferentemente, la bacterina *Mycoplasma hyopneumoniae* es INGELVAC® MYCOFLEX. Preferentemente el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces e incluso más preferentemente tres veces. En dichos casos, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente, cada etapa de adición de líquido se realizan sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. La purificación adicional para obtener un antígeno de PCV-2 purificado puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

La presente solicitud no solo proporciona métodos para producir composiciones antigénicas de PCV-2, también se refiere a una composición antigénica de PCV-2. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud de patente proporciona adicionalmente una composición antigénica de PCV-2 caracterizada por que la composición antigénica de PCV-2 produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 1 log de un virus vivo o de UFC de menos de 1 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan con la composición antigénica de PCV-2 y se incuban durante 2 horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, y más preferentemente durante más de 2 años. Más preferentemente, la composición antigénica de PCV-2 producida por el método descrito en el presente documento produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0,9 log de un virus vivo o de UFC de menos de 0.9 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 8 meses y más preferentemente durante más de 2 años. Incluso más preferentemente, la composición antigénica produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0.7 log por ml de un virus vivo o UFC de menos 0.7 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 o más horas, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, y más preferentemente durante más de 2 años. Incluso más preferentemente, la composición antigénica produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0.3 log por ml de un virus vivo o de UFC de menos de 0.3 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, y más preferentemente durante más de 2 años. Aun más preferentemente, la composición antigénica de PCV-2 produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0.3 log por ml de un virus vivo o de UFC de menos de 0.3 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus o la bacteria viva se mezclan y se incuban con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, y más preferentemente durante más de 2 años. El virus vivo puede ser cualquier virus vivo, pero preferentemente el virus vivo es el virus del PRRS, preferentemente el virus del PRRS que posee el número de acceso VR 2332 de la ATCC. La bacteria viva puede ser cualquier bacteria, pero es preferentemente la bacteria *Mycoplasma hyopneumonia*, preferentemente la cepa J de *Mycoplasma hyopneumonia*. La TCID₅₀ por ml puede calcularse mediante un ensayo de titulación in vitro convencional que permite calcular la cantidad de un virus vivo. La UFC por ml puede determinarse también mediante un ensayo de titulación in vitro convencional que permite calcular la cantidad de una bacteria viva. La expresión "por ml" se refiere preferentemente a 1 ml de un líquido.

En un aspecto adicional, la composición antigénica de PCV-2 descrita anteriormente comprende un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, el componente adicional es un adyuvante, incluso más

preferentemente el adyuvante es un polímero de ácido acrílico o metacrílico, y aún más preferentemente el adyuvante es Carbomer. Preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis. De manera más preferida el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

La presente solicitud no solo proporciona métodos para producir composiciones antigénicas de PCV-2 y/o las PCV-2 composiciones antigénicas como se ha descrito anteriormente, también se refiere a una composición antigénica de PCV-2 que puede obtenerse por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por tanto, en un aspecto adicional la presente solicitud se refiere a una composición antigénica de PCV-2 que se obtiene por un método que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2. Preferentemente, el antígeno de PCV-2 se usa como o en la composición antigénica de PCV-2. La expresión "una composición antigénica de PCV-2 que se obtiene por un método proporcionado en el presente documento" también significa que la composición antigénica de PCV-2 puede obtenerse por un método proporcionado en el presente documento. De acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud también se refiere a la composición antigénica de PCV-2 que se obtiene separando la parte del primer líquido del antígeno de PCV-2 por un intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido, en donde el segundo líquido es diferente del primer líquido. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a una composición antigénica de PCV-2 obtenida por un método que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido, en donde el segundo líquido es diferente del primer líquido. Preferentemente, el intercambio de la parte del primer líquido con el segundo líquido comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer segundo líquido del antígeno de PCV-2.

De acuerdo con un aspecto adicional, la composición antigénica de PCV-2 se obtiene preferentemente por un método en donde la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por una etapa de filtración utilizando un filtro. Sin embargo, para separar la parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2 puede usarse cualquier otro método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, centrifugación y/o cromatografía. Sin embargo se prefiere más la filtración. Los métodos de filtración preferidos para separar la parte del primer líquido comprenden ultra- y/o dia-filtración. La etapa de concentración y la etapa de adición de líquido del método como se describe en el presente documento puede realizarse sustancialmente de manera simultánea o alternativa, la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan secuencialmente. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a una composición antigénica de PCV-2 obtenida por un método que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido, en donde el segundo líquido es diferente del primer líquido. Preferentemente el intercambio de la parte del primer líquido por el segundo líquido comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2, en donde la etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Por ejemplo, en un aspecto adicional, la etapa de adición de líquido se produce antes de la etapa de concentración y en un aspecto alternativo, la etapa de concentración se produce antes que la etapa de adición de líquido.

En un aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a una composición antigénica de PCV-2 que puede obtenerse usando un método descrito en el presente documento, en donde la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración, independientemente del orden en donde se realice, pueden realizarse varias veces. Por ejemplo, cada una de estas etapas respectivas puede realizarse al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco al menos 10, hasta tantas veces como se desee. En un aspecto, cada etapa de concentración y cada etapa de adición de líquido se realiza al menos dos veces. En otro aspecto, la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza al menos tres veces.

En un aspecto adicional de la presente solicitud la composición antigénica de PCV-2 de la presente descripción se obtiene como se ha descrito anteriormente, en donde la filtración es el método preferido para separar una parte del primer líquido, o en el caso de varias etapas de separación, como se ha descrito anteriormente, una parte de la mezcla del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2. El filtro puede ser cualquier filtro convencional en la materia. Preferentemente, el filtro incluye una membrana semipermeable. En una forma adicional preferida, la membrana semipermeable tiene un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 por lo que impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y el filtro retiene el antígeno de PCV-2. En un aspecto adicional, el filtro tiene un tamaño de poro promedio que impide el paso de al menos 90% de las proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, el filtro tiene un tamaño de poro promedio que impide el paso de al menos 90% de las proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño y más preferentemente, el filtro tiene un tamaño de poro promedio que impide el paso de al menos el 90% de las

5 proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. En un aspecto adicional más, la membrana semipermeable incluye un material seleccionado del grupo que consiste en polisulfona, poliétersulfona y celulosa regenerada. Sin embargo, puede usarse cualquier otro material que permita separar una parte del primer líquido, y en el caso de una etapa de procesos múltiples, separar una mezcla del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2. En un aspecto adicional, el filtro se selecciona del grupo que consiste en un cartucho, láminas planas o un casete de ultrafiltración de membrana de fibra hueca, prefiriéndose particularmente un cartucho de ultrafiltración de membrana de fibra hueca.

10 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a una composición antigénica de PCV-2 que se obtiene usando los métodos como se ha descrito anteriormente, en donde el filtro es preferentemente o comprende una membrana semipermeable. Preferentemente, la membrana semipermeable posee un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. Como se ha descrito anteriormente, la etapa de separación que incluye en general el intercambio de la parte del primer líquido por una parte del segundo líquido comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 separando una parte del primer y segundo líquido del antígeno de PCV-2, en donde la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realizan veces múltiples, por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, etc. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realizan dos veces, más preferentemente tres veces.

15 La etapa de concentración del método proporcionado en el presente documento para obtener composiciones antigénicas de PCV-2 se realiza de tal manera que el antígeno de PCV-2 se concentra de 3X a 50X en comparación con el volumen del primer líquido. Más preferentemente, la etapa de concentración se realiza de tal manera que el antígeno de PCV-2 se concentra de 4X a 20X en comparación con el volumen del primer líquido. Más preferentemente, la etapa de concentración se realiza de tal manera que el antígeno de PCV-2 se concentra desde 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a una composición antigénica de PCV-2 obtenida por un método descrito anteriormente, en donde el antígeno de PCV-2 se concentra de 3X a 50X, preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen de primer líquido. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2 de 3X a 50X, preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente la etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial con la etapa de concentración. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. Preferentemente, la membrana semipermeable posee un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

20 Preferentemente, la purificación adicional para obtener composiciones antigénicas de PCV-2, que comprende un antígeno de PCV-2 purificado, como se define en el presente documento, puede conseguirse realizando etapas de purificación adicionales que comprenden iii) purificar lo recuperado de la etapa ii) que comprende el antígeno de PCV-2 (o cualquier método descrito en el presente documento), que se obtiene después de separar una parte del primer líquido, por una etapa de cromatografía. Para obtener un grado de pureza más alto puede realizarse una segunda etapa de cromatografía que, sin embargo, es diferente de la primera. Por ejemplo si la primera etapa de purificación/etapa de cromatografía es por exclusión de tamaño (filtración en gel), la segunda debe ser diferente de esta, por ejemplo, una cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc. Preferentemente, si la primera etapa para purificar el antígeno de PCV-2, preferentemente para purificar el antígeno ORF2 del PCV-2 es una cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel) la segunda etapa puede ser una cromatografía por intercambio iónico, preferentemente cromatografía por intercambio aniónico (AIEX). Una matriz de cromatografía de intercambio aniónico preferida para la purificación de antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 es Q Sepharose. En una pequeña escala de aproximadamente 50 ml, se prefiere más el uso de columnas de 5 ml de HiTrap Q Sepharose HP. La cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, sobre la columna AIEX pueden cargarse aproximadamente 50 ml del conjunto de la fracción del volumen inicial de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño a un caudal de 3,0 ml/min.

Después de una etapa de lavado usando, por ejemplo, Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM para separar el material no unido, la proteína puede eluirse con una sola etapa de volúmenes de 8 columnas del siguiente tampón (Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM, NaCl 1,0 M). El flujo a través del procesamiento AIEX puede cargarse de nuevo sobre la columna Q Sepharose y eluirse, como se ha descrito anteriormente para aumentar el rendimiento. Esta técnica en dos etapas (cromatografía de exclusión por tamaño seguido de cromatografía de intercambio aniónico) separa eficazmente el antígeno ORF2 del PCV-2 de la mayoría del resto de componentes de proteína del material de recuperación del cultivo.

En un aspecto adicional, la actividad viricida de la composición antigénica de PCV-2 producida por los métodos del presente documento se reduce al menos 10% en comparación con el líquido que no se ha sometido al método. Más preferentemente, la actividad viricida de la composición antigénica de PCV-2 se reduce al menos 50% en comparación con el primer líquido que no se somete al método. Aún más preferentemente, la actividad viricida de la composición antigénica de PCV-2 se reduce al menos 70% en comparación con el primer líquido que no se ha sometido al método.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a una composición antigénica obtenida por un método para que comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2, ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2, en donde la actividad viricida - preferentemente con respecto al virus del PRRS- de la composición antigénica de PCV-2 obtenida después de la etapa ii) se reduce al menos 10%, preferentemente al menos 50%, más preferentemente al menos 70%, incluso más preferentemente al menos 90% en comparación con la del primer líquido. Preferentemente, la parte del primer líquido que posee actividad viricida se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente la etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial con la etapa de concentración como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- y/o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. Preferentemente, la membrana semipermeable posee un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus. La purificación adicional para obtener un antígeno de PCV-2 purificado puede realizarse como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a una composición antigénica de PCV-2 obtenida mediante un método descrito en el presente documento, en donde la composición antigénica de PCV-2 produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 1 log - preferentemente por ml -, preferentemente una TCID₅₀ de menos de 0,9 log, - preferentemente por ml -, incluso más preferentemente una TCID₅₀ de menos de 0,7 log - preferentemente por ml -, incluso más preferentemente una TCID₅₀ de menos de 0,5 log - preferentemente por ml - más preferentemente una TCID₅₀ de menos de 0,3 log - preferentemente por ml - de un virus vivo, preferentemente de un PRRSV vivo o de una UFC de menos de 1 log - preferentemente por ml -, preferentemente una UFC de menos de 0,9 log - preferentemente por ml -, incluso más preferentemente una UFC de menos de 0,7 log - preferentemente por ml -, incluso más preferentemente una UFC de menos de 0,5 log - preferentemente por ml -, más preferentemente una UFC de menos de 0,3 log - preferentemente por ml - de una bacteria viva, preferentemente de *Mycoplasma hyopneumoniae*, cuando el virus vivo, preferentemente PRRSV o bacteria viva, preferentemente *Mycoplasma hyopneumoniae* se mezcla y se incuba con la composición antigénica de PCV durante 2 horas o más, preferentemente durante más de 4 horas, incluso más preferentemente durante más de 12 horas, incluso más preferentemente durante más de 24 horas, incluso más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de 4 días, incluso más preferentemente durante más de 7 días, incluso más preferentemente durante más de 2 semanas, incluso más preferentemente durante más de 4 semanas, incluso más preferentemente durante más de 2 meses, incluso más preferentemente durante más de 3 meses, incluso más preferentemente durante más de 4 meses, incluso más preferentemente durante más de 6 meses, incluso más preferentemente durante más de 9 meses, incluso más preferentemente durante más de 12 meses, incluso más preferentemente durante más de 18 meses, más preferentemente durante más de 2 años. El virus vivo puede ser cualquier virus vivo, pero preferentemente el virus vivo es el virus del PRRS, preferentemente el virus del PRRS que posee el número de acceso VR 2332 de la ATCC. La bacteria viva puede ser cualquier bacteria, pero es preferentemente la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae*, preferentemente la cepa de J de *Mycoplasma hyopneumoniae*. La TCID₅₀ por ml puede calcularse mediante un ensayo de titulación in vitro convencional que permite calcular la cantidad de un virus vivo. La UFC por ml puede determinarse también mediante un ensayo de titulación in vitro convencional que permite calcular la cantidad de una bacteria viva. La expresión "por ml" se refiere

preferentemente a 1 ml de un líquido.

5 En un aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a una composición antigénica de PCV-2 que se obtiene mediante un método descrito anteriormente que comprende adicionalmente la etapa de recoger el antígeno de PCV-2 restante después de la etapa ii). Esta recogida puede realizarse de cualquier manera convencional. De una manera particularmente preferida de recogida, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 mediante una etapa de filtración y el antígeno de PCV-2 se recupera o se recoge del retardo del filtro.

10 En un aspecto adicional, la composición antigénica de PCV-2, obtenida mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mezcla con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, el componente adicional es un adyuvante, incluso más preferentemente el adyuvante es un polímero de ácido acrílico o metacrílico, y aún más preferentemente el adyuvante es Carbomer.

15 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona una composición antigénica de PCV-2 obtenida mediante un método descrito anteriormente, que comprende adicionalmente la etapa de mezclar el antígeno de PCV-2 obtenido por el método descrito en el presente documento, con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, el componente adicional es un adyuvante, incluso más preferentemente el adyuvante es un polímero de ácido acrílico o metacrílico, y aún más preferentemente el adyuvante es Carbomer. Preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis. más preferentemente el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

25 En un aspecto adicional, la composición antigénica de PCV-2 descrita anteriormente comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente solicitud, la presente solicitud proporciona una composición antigénica de PCV-2 obtenida por un método descrito anteriormente en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2.

30 Como se ha mencionado anteriormente, el antígeno de PCV-2 usado en el método descrito en el presente documento puede obtenerse mediante cualquier método conocido en la materia. Preferentemente, el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF2 del PCV-2. En formas preferidas, el antígeno de PCV-2 se obtiene siguiendo los procedimientos descritos en el documento WO2006/072065.

35 Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente solicitud, la presente solicitud proporciona una composición antigénica de PCV-2 obtenida mediante un procedimiento descrito anteriormente, en donde el antígeno de PCV-2 se obtiene mediante un vector viral, preferentemente un vector viral baculovirus recombinante, que contiene y expresa el antígeno de PCV-2, preferentemente, la ORF2 del PCV-2 y en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF2;

45 En un aspecto adicional de la presente solicitud, la composición antigénica de PCV-2 se obtiene mediante el método descrito anteriormente y comprende adicionalmente la etapa de inactivar el vector viral baculovirus recombinante con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilenimina binaria. En formas preferidas, el método comprende adicionalmente la etapa de añadir una cantidad de una agente que neutralice el agente inactivante de ADN, siendo la cantidad equivalente a la cantidad de agente inactivante en donde el agente que neutraliza al agente inactivante de ADN comprende una solución de tiosulfato de sodio concentrada a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM y en donde el agente inactivante de ADN es BEI. Preferentemente, la etapa de inactivación se realiza después de que al menos una parte del primer líquido se separe del antígeno de PCV-2.

50 En un aspecto adicional de la presente solicitud, la composición antigénica de PCV-2 se obtiene mediante el método descrito anteriormente que comprende adicionalmente las etapas de mezclar el antígeno de PCV-2 obtenido después de las etapas de inactivación y neutralización. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente solicitud proporciona una composición antigénica de PCV-2 obtenida mediante un método descrito anteriormente que comprende las etapas de i) obtener un antígeno de PCV-2 en un primer líquido; ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2; iii) inactivar el vector viral baculovirus recombinante con un agente inactivante de ADN, preferentemente en presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de etilenimina binaria; iv) añadir una cantidad de agente neutralizante que neutralice al agente inactivante, siendo la cantidad de agente neutralizante equivalente a la cantidad de agente inactivante, en donde el agente neutralizante comprende preferentemente una solución de tiosulfato de sodio preferentemente concentrada a una concentración final de

aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM y en donde el agente inactivante comprende preferentemente BEI; y, preferentemente la etapa v) que comprende mezclar el antígeno de PCV-2 obtenido en la etapa iv) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables.

5 En un aspecto adicional de la presente solicitud, la composición antigénica de PCV-2 descrita anteriormente, obtenida preferentemente por los métodos descritos anteriormente, comprende adicionalmente al menos un agente adicional, preferentemente un antígeno viral o bacteriano y más preferentemente un antígeno viral o bacteriano de al menos otro organismo distinto causante de enfermedades porcinas . En un aspecto adicional el al menos un antígeno adicional es el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Incluso más preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino comprende un virus vivo, y aún más preferentemente un virus vivo modificado. Aún más preferentemente, el antígeno del Virus Reproductivo y Respiratorio Porcino comprende una cepa de virus vivo modificado de Número de Acceso VR 2332 de la ATCC, y aún más preferentemente comprende el MLV del PRRS INGELVAC®. En un aspecto adicional de la presente solicitud, el al menos un antígeno adicional es *Mycoplasma hyopneumoniae*. Preferentemente el antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacterina, y más preferentemente, la bacterina *Mycoplasma hyopneumoniae* es INGELVAC® MYCOFLEX. En un aspecto adicional de la presente solicitud, la composición antigénica de PCV-2 descrita anteriormente, obtenida preferentemente por los métodos descritos anteriormente comprende adicionalmente el antígeno del Virus Reproductivo y Respiratorio Porcino, preferentemente un Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino vivo modificado, aún más preferentemente, el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino que tiene el Número de Acceso VR 2332 de la ATCC, o el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino incluido en el MLV del PRRS INGELVAC® o ATP del PRRS INGELVAC®. En un aspecto adicional de la presente solicitud, la composición antigénica de PCV-2 descrita anteriormente, obtenida preferentemente por los métodos descritos anteriormente comprende adicionalmente *Mycoplasma hyopneumoniae*, preferentemente la bacterina *Mycoplasma hyopneumoniae* y más preferentemente INGELVAC® MYCOFLEX o la bacterina *Mycoplasma hyopneumoniae* incluida en INGELVAC® MYCOFLEX. En un aspecto adicional, la composición antigénica de PCV-2 descrita en el presente documento, comprende un Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, preferentemente cualquiera de los descritos anteriormente y una *Mycoplasma hyopneumoniae*, preferentemente cualquiera de las descritas anteriormente.

30 Cuando la composición antigénica de PCV-2 comprende al menos un antígeno adicional de al menos otro organismo causante de enfermedades porcinas como se ha descrito anteriormente, preferentemente el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino y/o *Mycoplasma hyopneumoniae* se obtiene por un método descrito en el presente documento, el método comprende las etapas de i) obtener un antígeno de PCV-2 en un primer líquido; ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2; y combinar el antígeno de PCV-2 con al menos un antígeno adicional, preferentemente un antígeno viral o bacteriano y más preferentemente un antígeno viral o bacteriano de al menos otro organismo causante de enfermedades porcinas. Preferentemente, el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2, más preferentemente la proteína ORF-2 recombinante del PCV-2, y aún más preferentemente partículas similares a virus de la proteína ORF-2. Preferentemente, la parte del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de una parte del primer líquido por un segundo líquido. El intercambio se realiza preferentemente de tal manera que comprende las etapas de a) añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 y b) concentrar el antígeno de PCV-2, preferentemente de 3X a 50X, incluso más preferentemente de 4X a 20X, e incluso más preferentemente de 7X a 10X en comparación con el volumen del primer líquido separando una parte del primer y segundo líquidos del antígeno de PCV-2. Preferentemente, la etapa de adición de líquido y la etapa de concentración se realiza varias veces, preferentemente dos veces incluso más preferentemente tres veces. En tales casos, no solo se separa el primer líquido, sino también una mezcla del primer y segundo líquido. Preferentemente cada etapa de adición de líquido se realiza sustancialmente de manera simultánea o secuencial como se ha descrito anteriormente. Cuando la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realiza secuencialmente, el orden de las etapas no importa. Además, la etapa de concentración se realiza preferentemente por filtración - preferentemente por dia- o ultrafiltración, utilizando un filtro, que contiene preferentemente una membrana semipermeable. La membrana semipermeable posee preferentemente un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 e impide el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retiene el antígeno de PCV-2 dentro el filtro para la recuperación o recogida. Preferentemente, el tamaño de poro promedio de la membrana semipermeable o de cualquier otro filtro que se use en el presente documento, impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño, más preferentemente, al menos 90% de proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamaño, y más preferentemente al menos 90% de proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamaño. Este tamaño de poro se prefiere, cuando el antígeno de PCV-2 se produce como un virus completo o como partículas similares a virus.

La presente descripción como se define anteriormente, proporciona nuevos métodos para producir un antígeno de PCV-2 y composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno de PCV-2, en donde el antígeno de PCV-2 presenta una actividad viricida reducida y/o inmunogenicidad aumentada (definida cada una en el presente documento), en donde el método comprende las etapas de i) obtener un primer líquido que contenga un antígeno de PCV-2 , ii) separar al menos una parte del primer líquido del antígeno de PCV-2. Además, la presente descripción también proporciona un antígeno de PCV-2 así como composiciones inmunogénicas que comprenden dicho

antígeno de PCV-2 que muestra una actividad viricida reducida y/o inmunogenicidad aumentada (cada una como se define en el presente documento). De acuerdo con un aspecto adicional, el antígeno de PCV-2, así como las composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno de PCV-2 purificado que muestra una actividad viricida reducida y/o una inmunogenicidad aumentada puede, de manera alternativa, obtenerse mediante el siguiente procedimiento (II). El antígeno de PCV-2 purificado de acuerdo con la descripción, preferentemente el antígeno de la ORF2 del PCV-2 purificado, puede obtenerse mediante la purificación de una preparación del virus PCV-2 en particular por la purificación del virus completo. Las preparaciones de virus completos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 99/18214 o WO 03/049703. Además, el antígeno de PCV-2 purificado también puede obtenerse por la purificación de un antígeno de PCV-2 expresado recombinante, preferentemente por la purificación de un antígeno de la ORF2 del PCV-2 recombinante. Los sistemas de expresión para la producción de antígenos PCV-2 recombinantes, preferentemente para la producción de antígenos ORF2 del PCV-2 recombinantes se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, sistemas de expresión bacterianos, sistemas de expresión de levaduras, sistemas de expresión en células de insecto o de mamífero. Los vectores y métodos para preparar y/o usar vectores (o recombinantes) para la expresión de los antígenos PCV-2 se describen en cualquier parte de la solicitud.

Las células preferidas son aquellas susceptibles de infección con un vector viral recombinante apropiado que contiene un ADN de la ORF2 del PCV-2 y que expresa la proteína ORF2 del PCV-2. Preferentemente, las células son células de insecto y, más preferentemente, incluyen las células de insecto comercializadas con el nombre comercial células de insecto Sf+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT). Los cultivos de células preferidos tienen un recuento celular entre aproximadamente $0,3-2,0 \times 10^6$ células/ml, más preferentemente de aproximadamente $0,35-1,9 \times 10^6$ células/ml, aún más preferentemente de aproximadamente $0,4-1,8 \times 10^6$ células/ml, incluso más preferentemente de aproximadamente $0,45-1,7 \times 10^6$ células/ml, y más preferentemente de aproximadamente $0,5-1,5 \times 10^6$ células/ml.

Los vectores virales preferidos incluyen baculovirus, tal como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), en particular siempre y cuando las células en producción sean células de insecto. Aunque se prefiere el sistema de expresión de baculovirus, los expertos en la materia entienden que pueden usarse otros sistemas de expresión, incluyendo los descritos anteriormente, que funcionarán para los fines de la presente descripción, concretamente para la expresión del antígeno ORF2 del PCV-2.

Los medios de cultivo apropiados también podrán determinarlos los expertos en la materia, siendo un medio de cultivo preferido el medio asérico de células de insecto, tal como Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) y similares.

El vector viral recombinante que contiene las secuencias de ADN de la ORF2 del PCV-2 posee una multiplicidad de infección (MOI) preferida de entre aproximadamente 0,03 - 1,5, más preferentemente de aproximadamente 0,05 - 1,3, aún más preferentemente de aproximadamente 0,09 - 1,1, y más preferentemente de aproximadamente 0,1 - 1,0, cuando se usa para la infección de las células susceptibles. Preferentemente, los valores MOI mencionados anteriormente se refieren a un ml del líquido de cultivo celular. Preferentemente, el método descrito en el presente documento comprende la infección de $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/ml, aún más preferentemente de aproximadamente $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/ml, incluso más preferentemente de aproximadamente $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/ml, y más preferentemente de aproximadamente $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/ml en donde un vector viral recombinante contiene un ADN de la ORF2 del PCV-2 y que expresa la proteína antigénica de ORF2 del PCV-2 que posee un valor MOI (multiplicidad de infección) de entre aproximadamente 0,03 - 1,5, más preferentemente de aproximadamente 0,05 - 1,3, aún más preferentemente de aproximadamente 0,09 - 1,1, y más preferentemente de aproximadamente 0,1 - 1,0.

Las células infectadas se incuban después durante un periodo de hasta diez días, más preferentemente de aproximadamente dos días a aproximadamente diez días, aún más preferentemente de aproximadamente cuatro días a aproximadamente nueve días, y más preferentemente de aproximadamente cinco días a aproximadamente ocho días. Las condiciones de incubación preferidas incluyen una temperatura entre aproximadamente 22-32°C, más preferentemente de aproximadamente 24-30°C, aún más preferentemente de aproximadamente 25-29°C, incluso más preferentemente de aproximadamente 26-28°C, y más preferentemente de aproximadamente 27°C. Preferentemente, las células Sf+ se observan después de la inoculación para determinar los cambios característicos inducidos por baculovirus. Dicha observación puede incluir controlar las tendencias de densidad celular y la disminución en cuanto a la viabilidad durante el periodo posterior a la infección. Se encontró que la titulación viral máxima se observaba 3-5 días después de la infección y la producción de antígeno ORF2 del PCV-2 máxima en las células se obtenía entre los días 5 y 8, después de la infección y/o cuando la viabilidad celular disminuía a menos de un 10%.

El antígeno ORF2 del PCV-2 puede purificarse a partir del material recogido mediante métodos convencionales conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, por los descritos en Protein purification methods – una estrategia práctica (E.L.V. Harris y S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press). Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la separación por centrifugación y/o filtración, precipitación, cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel) cromatografía por afinidad, cromatografía de quelatos metálicos, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía covalente, cromatografía de interacción hidrófoba, etc.

El proceso de recuperación del antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno de la ORF2 del PCV-2, comienza preferentemente con la separación de los residuos celulares del antígeno ORF2 del PCV-2 mediante una etapa de separación. Las etapas de separación preferidas incluyen filtración, centrifugación a velocidades de hasta aproximadamente 20.000 x g, centrifugación de flujo continuo, separación cromatográfica usando intercambio iónico o filtración en gel, y métodos de inmunoafinidad convencionales. Los expertos en la materia conocen estos métodos por ejemplo (E.L.V. Harris y S. Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL press Oxford 1995). Los métodos de separación más preferidos incluyen la centrifugación a velocidades de hasta aproximadamente 20.000 x g y la filtración. Los métodos de filtración preferidos incluyen microfiltración frontal y filtración de flujo tangencial (o flujo cruzado), incluyendo la microfiltración frontal de filtración en fibra hueca. De éstas, se prefiere la microfiltración frontal. Los tamaños de poro preferidos para la microfiltración frontal son entre aproximadamente 0,30 - 1,35 µm, más preferentemente entre aproximadamente 0,35 - 1,25 µm, aún más preferentemente entre aproximadamente 0,40 - 1,1 µm, y más preferentemente entre aproximadamente 0,45 - 1,0 µm. Se cree que en cualquier membrana de filtración convencional funcionará para los fines de la presente descripción, y se prefieren membranas de poliétersulfona. Durante la etapa de filtración se separa cualquier especie de ácido nucleico de bajo peso.

La purificación adicional del antígeno de PCV-2, preferentemente del antígeno ORF2 del PCV-2, puede conseguirse con procedimientos de cromatografía, preferentemente un procedimiento de cromatografía de dos etapas. Sin embargo, en el caso en donde el material de carga no comprenda residuos celulares, también es posible comenzar con el procedimiento de cromatografía.

Si el antígeno de PCV-2 está ensamblado a partículas similares a virus (VLP), la primera etapa es preferentemente es una cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel) que puede realizarse, por ejemplo, usando una matriz Sephacryl S300. En una escala de laboratorio se prefiere más el uso de columnas HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR. Sin embargo, puede usarse cualquier otra matriz de cromatografía de exclusión por tamaño conocida por un experto en la materia que permita la separación de las VLP de la ORF2 del PCV-2 del filtrado o del sobrenadante de cultivo. Se describen matrices adecuadas, por ejemplo, en E.L.V. Harris y S. Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL Press Oxford 1995). La cromatografía de filtración en gel puede realizarse, por ejemplo, cargando la columna con la preparación en bruto que comprende el antígeno de PCV-2 con un caudal de 1,0 ml/min y eluyendo la columna con un volumen de columna de 1,5 de un tampón que comprende Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM. Sin embargo, el antígeno de la ORF2 del PCV-2 también puede purificarse usando cromatografía de afinidad, por ejemplo, mediante la unión selectiva a un anticuerpo específico de la ORF2 del PCV-2 inmovilizado, o cualquier otro método conocido por un experto en la materia.

Por tanto de acuerdo con un aspecto preferido, la composición inmunogénica que comprende un antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente un antígeno ORF2 del PCV-2 purificado y el adyuvante se puede obtener mediante un proceso que comprende las etapas

- a) Expresar el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 en una célula hospedadora;
- b) Recoger el cultivo celular para obtener el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2;
- c) Purificar el material recogido que comprende el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 mediante cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel);
- d) Mezclar el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 con un adyuvante.

De acuerdo con un aspecto preferido, la cromatografía de exclusión por tamaño se realiza como se describe en el presente documento, preferentemente como se describe en el Ejemplo 3. Preferentemente, la exclusión por tamaño da como resultado una composición inmunogénica que posee un grado de pureza de más de 80% (p/p), preferentemente más de 90% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica antes de la mezcla con el adyuvante. El grado de pureza puede calcularse por tinción con Mancha de Proteína Imperial (Pierce) después de SDS PAGE mediante geles Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen) usando el sistema de tampón MOPS NuPAGE (Invitrogen).

Para obtener un grado de pureza mayor puede realizarse una segunda etapa de cromatografía que sin embargo es diferente de la primera. Por ejemplo si la primera etapa de purificación / etapa de cromatografía es por exclusión de tamaño (filtración en gel) la segunda debe ser diferente de esta, por ejemplo, una cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.

Preferentemente, si la primera etapa para purificar el antígeno de PCV-2, preferentemente para purificar el antígeno ORF2 del PCV-2 es una cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel), la segunda etapa puede ser una cromatografía de intercambio iónico, preferentemente cromatografía de intercambio aniónico (AIEX). Una matriz de cromatografía de intercambio aniónico preferida para la purificación del antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 es Q Sepharose. En una pequeña escala de aproximadamente 50 ml, se prefiere más el uso de columnas HiTrap Q Sepharose HP de 5 ml. La cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, aproximadamente 50 ml del volumen inicial de la fracción agrupada de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño puede cargarse sobre la columna AIEX a un caudal

de 3,0 ml/min. Después de una etapa de lavado usando, por ejemplo Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM para separar el material no unido, la proteína puede eluirse con una sola etapa de volúmenes de 8 columnas del siguiente tampón (Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM, NaCl 1,0 M). El flujo a través del procesamiento AIEX puede cargarse de nuevo sobre la columna Q Sepharose y eluirse, como se ha descrito anteriormente, para aumentar el rendimiento. Esta técnica en dos etapas (exclusión por tamaño seguido de cromatografía de intercambio aniónico) separa eficazmente el antígeno ORF2 del PCV-2 de la mayoría de los otros componentes de proteína de la recuperación del cultivo.

Por tanto de acuerdo con un aspecto preferido, la composición inmunogénica que comprende un antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 purificado y el adyuvante, puede obtenerse mediante un proceso que comprende las etapas

- 5 a) Expresar el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 en una célula hospedadora;
- b) Recoger el cultivo celular para obtener el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2;
- c) Purificar el material recogido que comprende el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 mediante cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel); seguido por cromatografía de intercambio aniónico; y
- 15 d) Mezclar el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 con un adyuvante.

De acuerdo con un aspecto preferido, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio aniónico se realiza como se describe en el presente documento, preferentemente como se describe en el Ejemplo 3. Preferentemente, la estrategia de purificación en dos etapas da como resultado una composición inmunogénica que posee un grado de pureza de más de 90% (p/p), preferentemente más de 95% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica antes de la mezcla con el adyuvante. El grado de pureza puede calcularse por tinción con Mancha de Proteína Imperial (Pierce) después de SDS PAGE mediante geles Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen) usando el sistema de tampón MOPS NuPAGE (Invitrogen).

Como se ha descrito anteriormente, el proceso de recuperación del antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 comienza con la separación de los residuos celulares del antígeno ORF2 del PCV-2 expresado mediante una etapa de separación. Una etapa de separación preferida incluye una microfiltración a través de un filtro que posee un tamaño de poro de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2 μm , que posee preferentemente un tamaño de poro de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,2 μm .

Por tanto la composición inmunogénica que comprende un antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2, y el adyuvante, puede obtenerse mediante un proceso que comprende las etapas

- 30 a) Expresar el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 en una célula hospedadora;
- b) Recoger el cultivo celular para obtener el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2;
- c) Filtrar el recogido obtenido en la etapa b) a través de un filtro que posee un tamaño de poro de 0,6 a 2,0 μm .
- d) Purificar el filtrado que comprende el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 y obtenido en la etapa c) por cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel) opcionalmente seguido de cromatografía de intercambio aniónico; y
- 35 e) Mezclar el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 con un adyuvante.

De acuerdo con un aspecto preferido, la microfiltración, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio aniónico se realizan como se describe en el presente documento, preferentemente como se describe en el Ejemplo 3. Preferentemente, la estrategia de purificación en dos etapas incluyendo la etapa de filtración previa da como resultado una composición inmunogénica que posee un grado de pureza de más de 90% (p/p), preferentemente de más de 95% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica antes de la mezcla con el adyuvante. El grado de pureza puede calcularse por tinción con Mancha de Proteína Imperial (Pierce) después de SDS PAGE mediante geles Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen) usando el sistema de tampón MOPS NuPAGE (Invitrogen).

Las composiciones inmunogénicas que comprenden el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno de ORF2 del PCV-2 descrito en el presente documento, preferentemente las obtenidas por los métodos descritos en el presente documento se caracterizan por una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que no comprende dicho antígeno de PCV-2 purificado o antígeno de ORF2 del PCV-2 purificado.

En el caso en que se usen vectores virales, tales como poxvirus, adenovirus o baculovirus recombinantes, para producir el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2, se recomienda inactivar el ácido nucleico viral mediante un tratamiento de inactivación apropiado. Dicha inactivación puede producirse en cualquier momento durante la purificación del antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2. Por tanto, la inactivación puede producirse inmediatamente después de recoger el líquido del cultivo celular que comprende el

antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2, o después de la microfiltración del antígeno de PCV-2, preferentemente del antígeno ORF2 del PCV-2, si la microfiltración se realiza antes o después de la etapa de purificación, por ejemplo, antes de o después de la filtración en gel, y antes de o después de la cromatografía de intercambio aniónico si esta se realizase.

5 Para los fines de la presente descripción puede usarse cualquier método de inactivación convencional. Así, la inactivación puede realizarse mediante tratamientos químicos y/o físicos. En formas preferidas, se determina el volumen de los líquidos recogidos y la temperatura se lleva a un intervalo entre aproximadamente 32-42°C, más preferentemente entre aproximadamente 34-40°C y más preferentemente entre aproximadamente 35-39°C. Los métodos de inactivación preferidos incluyen la adición de etilenimina binaria (BEI) ciclada, preferentemente a una
10 concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM y más preferentemente de aproximadamente 5 mM. Por ejemplo, la inactivación incluye la adición de una solución de 2-bromoetilenamina bromhidrato, preferentemente de aproximadamente 0,4 M, que se ha ciclado a etilenimina binaria (BEI) 0,2 M en NaOH 0,3 N para proporcionar líquidos a una concentración final de aproximadamente 5 mM de BEI. preferentemente, los
15 líquidos después se agitan continuamente durante 2 - 96 horas y los líquidos recogidos inactivados pueden conservarse congelados a -40°C o menos o entre aproximadamente 1 - 7°C. Después completarse la inactivación, se añade una solución de tiosulfato de sodio, preferentemente a 1,0 M para neutralizar cualquier BEI residual. Preferentemente, el tiosulfato de sodio se añade en una cantidad equivalente en comparación con la BEI añadida antes para la inactivación. Por ejemplo, en el caso en donde añadida BEI a una concentración final de 5 mM, se añade una solución de tiosulfato de sodio 1,0 M para proporcionar una concentración mínima final de 5 mM para neutralizar cualquier BEI residual.

25 Antes de mezclar con un adyuvante el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2, también se recomienda dializar el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2, frente a una solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 o cualquier otro tampón fisiológico.

Los métodos descritos anteriormente dan como resultado un antígeno de PCV-2 con una actividad viricida reducida como se define en el presente documento así como una inmunogenicidad mejorada, si el antígeno de PCV-2 posee un grado de pureza de más de 50% (p/p), preferentemente de más de 70% (p/p), incluso más preferentemente de más de 80% (p/p), incluso más preferentemente de más de 85% (p/p), incluso más preferentemente de más de 90%
30 (p/p), más preferentemente de más de 95% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica antes de mezclar con cualquier adyuvante. Sin embargo, el antígeno de PCV-2 purificado que puede obtenerse de acuerdo con este método II también puede mezclarse y usarse junto con un adyuvante, preferentemente con cualquiera de los adyuvantes descritos en el presente documento. El adyuvante preferido es un Carbpol, preferentemente una concentración de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml, más preferentemente a una concentración de 0,5 a 5 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 1 mg/ml de la composición inmunogénica final.

De nuevo, la presente descripción no solo proporciona cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, incluyendo el método alternativo II, también proporciona un antígeno de PCV-2, preferentemente un antígeno de PCV-2 purificado, más preferentemente una proteína ORF-2 del PCV-2 purificada que puede obtenerse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, incluyendo el método alternativo. Además, la presente descripción también proporciona composiciones antigénicas de PCV-2 que comprenden un antígeno de PCV-2, preferentemente un antígeno de PCV-2 purificado, más preferentemente una proteína ORF-2 del PCV-2 purificada que puede obtenerse mediante cualquiera de los métodos descrito en el presente documento, incluyendo el método alternativo II. La cantidad del antígeno de PCV-2, en particular del antígeno ORF2 del PCV-2, en la
45 composición inmunogénica final, debe estar en el intervalo de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 400 µg por dosis con respecto a la composición inmunogénica final. Preferentemente, la composición inmunogénica final debe incluir una cantidad de antígeno de PCV-2, preferentemente de antígeno ORF2 del PCV-2 en un intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 µg/dosis, incluso más preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 150 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 µg/dosis,
50 aún más preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 60 µg/dosis, incluso más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 50 µg/dosis, incluso más preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 µg/dosis, incluso aún más preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 32 µg/dosis, incluso más preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 24 µg/dosis, y de manera más preferida de
55 aproximadamente 8 a aproximadamente 16 µg/dosis.

Las composiciones inmunogénicas proporcionadas con el presente documento incluyen aquellas que pueden obtenerse mediante el método II que comprende uno o más antígenos adicionales de otro organismo causante de enfermedades. Estos "otros organismos causantes de enfermedades" se han definido anteriormente. Preferentemente el antígeno adicional es el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Incluso más preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino comprende un virus vivo y aún más preferentemente un virus vivo modificado. Aún más preferentemente, el antígeno del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino Vivo modificado comprende una cepa del virus vivo modificado con el Número

de Acceso VR 2332 de la ATCC, y aún más preferentemente comprende el MLV del PRRS INGELVAC®. En un aspecto adicional de la presente solicitud, el antígeno adicional es *Mycoplasma hyopneumoniae*. Preferentemente el antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacterina, y más preferentemente, la bacterina *Mycoplasma hyopneumoniae* es INGELVAC® MYCOFLEX. Las más preferidas son las combinaciones con el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino y *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Debido a la inmunogenicidad aumentada de la composición inmunogénica que incluye el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 proporcionado en el presente documento, las composiciones inmunogénicas pueden usarse para reducir la frecuencia o reducir la gravedad de síntomas clínicos causados por o que están asociados con infecciones por PCV-2 en comparación con un animal que no recibe esta composición inmunogénica.

La expresión “reducción de la frecuencia o de la gravedad de indicios clínicos” significará que cualquiera de estos indicios se reducen en cuanto a la frecuencia o gravedad en animales que reciben una administración de la vacuna en comparación con un “grupo de control” de animales cuando ambos se han infectado con o se han expuesto al patógeno del cual deriva el componente (o componentes) inmunológicamente activo en la vacuna y en donde el grupo de control no ha recibido ninguna administración de la vacuna o composición inmunogénica. En este contexto, el término “disminución” o “reducción” significa una reducción de al menos 10%, preferentemente 25%, incluso más preferentemente 50%, más preferentemente de más de 100% en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control no vacunado.

Como se usa en el presente documento, “síntomas clínicos” o “indicios clínicos” se referirá a indicios de infección de un patógeno que puede observarse directamente a partir de un animal vivo tales como síntomas. Los ejemplos representativos dependerán del patógeno seleccionado pero pueden incluir cosas tales como secreción nasal, aletargamiento, tos, fiebre alta, aumento o pérdida de peso, deshidratación, diarrea, hinchazón, cojera y similares. Los indicios clínicos por PCV-2 pueden incluir debilitamiento, palidez de la piel, desarrollo poco vigoroso, dificultad respiratoria, diarrea, icterus y ictericia.

La reducción de la frecuencia o de la gravedad de indicios clínicos producida por o asociada con infecciones por PCV-2 en un animal puede conseguirse por la administración de una sola dosis de dicha composición inmunogénica a un animal que necesita dicho tratamiento. Sin embargo, la composición inmunogénica proporcionada en el presente documento también puede administrarse en dos o más dosis, con un intervalo de 2 a 4 semanas entre la administración de la primera dosis y cualquier dosis posterior. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica proporcionada en el presente documento que incluye el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 puede administrarse en una, dos o más dosis a un animal que lo necesita.

En particular, en un aspecto adicional de la presente solicitud, como se ha descrito anteriormente se proporciona una composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 en donde cuando la composición inmunogénica, se administra a un animal, reduce el empobrecimiento linfoide y la inflamación al menos un 80% en un animal en comparación con un animal que recibe la composición inmunogénica. Por tanto, en un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2, como se ha descrito anteriormente, y la composición inmunogénica reduce el empobrecimiento linfoide y la inflamación al menos un 80% en un animal que ha recibido una administración de la composición inmunogénica en comparación con un animal que no ha recibido la composición inmunogénica.

En un aspecto adicional de la presente solicitud, como se ha descrito anteriormente, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 en donde cuando la composición inmunogénica se administra a un animal reduce las lesiones pulmonares al menos un 80% en un animal en comparación con un animal que no recibe la composición inmunogénica. Por tanto, en un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2, como se ha descrito anteriormente y la composición inmunogénica se administra a un animal reduce lesiones pulmonares al menos un 80% en un animal en comparación con un animal que no recibe la composición inmunogénica.

En un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2, como se ha descrito anteriormente, en donde después de la administración de una dosis de la composición inmunogénica, la composición inmunogénica induce una respuesta inmunoprotectora contra PCV-2. La composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 puede ser de cualquier volumen incluyendo 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml y mayor. En formas preferidas, 2 ml de la composición inmunogénica comprende una dosis del antígeno de PCV-2. Por tanto, en un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una composición inmunogénica, como se ha descrito anteriormente, en donde después de la administración de una dosis de la composición inmunogénica la composición inmunogénica comprende una composición antigénica de PCV-2 que incluye una respuesta inmunoprotectora contra el PCR-2. En un aspecto adicional, 2 ml de la composición inmunogénica comprende una dosis del antígeno de PCV-2.

Como se usa en el presente documento, a “una respuesta inmunoprotectora” se refiere a una frecuencia reducida o

gravedad reducida de indicios o síntomas clínicos, patológicos o histopatológicos de infección procedente de un patógeno de interés hasta incluyendo la prevención completa de dichos indicios o síntomas.

5 La expresión indicios "patológicos" se referirá a indicios de infección que pueden observarse a nivel microscópico o molecular, mediante ensayo bioquímico o a simple vista tras necropsia. Para el PCV-2, los síntomas patológicos incluirán lesiones microscópicas y macroscópicas en tejidos y órganos múltiples, siendo los órganos linfoides los sitios más frecuentes para la lesiones.

La expresión indicios "histopatológicos" se referirá a indicios de cambios tisulares resultantes de la infección.

Las expresiones, "síntomas clínicos" o "indicios clínicos" se han definido anteriormente.

10 En un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 y un antígeno PRRS, preferentemente cualquiera de los antígenos PRRS descritos en el presente documento, como se ha descrito anteriormente, en donde la composición inmunogénica induce una respuesta inmunoprotectora contra el virus del PRRS después de la administración de una dosis de la composición inmunogénica inmunogénica. De nuevo, puede producirse cualquier volumen de dosificación, pero en formas preferidas, 2 ml de la composición inmunogénica comprende una dosis del antígeno PRRS y una dosis del antígeno de PCV-2. Por tanto, en un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una composición inmunogénica, como se ha descrito anteriormente, que comprende un PRRSV y una composición antigénica con PCV-2 como se ha descrito anteriormente, en donde la composición inmunogénica induce una respuesta inmunoprotectora contra el PRRS después de la administración de una dosis de la composición inmunogénica. En un aspecto adicional, 2 ml de la composición inmunogénica comprende una dosis del antígeno PRRS y una dosis del antígeno de PCV-2.

15 En un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una composición antigénica con PCV-2 como se ha descrito en el presente documento y el antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* como se ha descrito anteriormente, en donde la composición inmunogénica induce una respuesta inmunoprotectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae* después de una administración de una dosis de la composición inmunogénica. De nuevo, puede producirse cualquier volumen de dosificación, pero en formas preferidas, 2 ml de la composición inmunogénica comprende una dosis de antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* y una dosis de antígeno de PCV-2. Por tanto, en un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una composición inmunogénica como se ha descrito anteriormente en donde la composición inmunogénica induce una respuesta inmunoprotectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae* después de la administración de una dosis de la composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 como se ha descrito en el presente documento y un antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae*. En un aspecto adicional, 2 ml de la composición inmunogénica comprende una dosis del antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae*.

20 En un aspecto adicional de la presente solicitud, se prepara una composición inmunogénica, como se ha descrito anteriormente, para la administración de 2 ml por dosis.

25 En un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona un método para reducir uno o más síntomas clínicos de una infección por PCV-2 en un animal en comparación con un animal que no recibe la composición inmunogénica. En general, el método comprende la etapa de administrar a un animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno de PCV-2 o composición como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, después de la administración de una sola dosis de la composición inmunogénica se reducen uno o más síntomas clínicos de una infección por PCV-2. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona un método para reducir, en un animal, uno o más síntomas clínicos de una infección por PCV-2 en comparación con un animal que no recibe la composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 como se describe en el presente documento. En general, el método comprende la etapa de administrar a un animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas que comprenden una composición antigénica con PCV-2 descritas anteriormente, en donde uno o más síntomas clínicos de una infección por PCV-2 se reducen preferentemente después de la administración de una sola dosis de la composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 como se describe en el presente documento.

30 En un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona un método para reducir uno o más síntomas clínicos de una infección por PRRS en un animal en comparación con un animal que no recibe la composición inmunogénica. En general, el método comprende la etapa de administrar a un animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente que comprenden una composición antigénica de PCV-2 como se describe en el presente documento y un virus del PRRS como se describe en el presente documento. Preferentemente, uno o más síntomas clínicos de infección por PRRS se reducen después de una administración de una sola dosis de la composición inmunogénica que comprende una composición antigénica con PCV-2 como se describe en el presente documento y un virus del PRRS como se describe en el presente documento. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona un método para reducir, en un animal, uno o más síntomas clínicos de una infección por PRRS en comparación con un animal que no recibe la composición inmunogénica que comprende una composición antigénica con PCV-2 como se describe en el presente documento y un virus de PRRS como se describe en el presente documento. Los indicios clínicos del Virus del Síndrome

Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) incluyen, pero sin limitación, inapetencia, fiebre, aborto, alteración del color transitoria, anestro prolongado, tos, indicios respiratorios, mastitis, agalactia, aletargamiento, lechones momificados, mortinatos, lechones débiles al nacer, reducción de la tasa de partos, parto prematuro, diarrea, debilitamiento, estornudos, secreción ocular, palidez de piel, mortalidad y combinaciones de las mismas.

- 5 En un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona un método para reducir, en un animal, uno o más síntomas clínicos de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*, en comparación con un animal que no recibe la composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 como se describe en el presente documento y un antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* como se describe en el presente documento. En general, el método comprende la etapa de administrar a un animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente. Preferentemente, después de la administración de una sola dosis de la composición inmunogénica se reducen uno o más síntomas clínicos de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* que comprende una composición antigénica con PCV-2 como se ha descrito en el presente documento y un antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* como se describe en el presente documento. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente solicitud, se proporciona un método para reducir uno o más síntomas clínicos de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* en un animal en comparación con un animal que no recibe la composición inmunogénica que comprende una composición antigénica con PCV-2 como se describe en el presente documento y un antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* como se describe en el presente documento. Los indicios clínicos de infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) incluyen, pero sin limitación, tos seca, rendimiento alterado y lesiones pulmonares.
- 20 La composición inmunogénica que comprende el antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2 como se proporciona en el presente documento, posee inmunogenicidad mejorada. Por lo tanto, la composición inmunogénica proporcionada en el presente documento es adecuada para mejorar la respuesta inmunitaria en un animal, que recibe dicha composición inmunogénica. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para mejorar la respuesta inmunitaria en un animal contra PCV-2 que comprende la etapa de: administrar, a un animal que lo necesite, la composición inmunogénica, como se describe en el presente documento, y poseer un antígeno de PCV-2 purificado, preferentemente una proteína ORF-2 del PCV-2 purificada, como se proporciona en el presente documento. De acuerdo con un aspecto preferido, el antígeno de PCV-2, preferentemente el antígeno ORF2 del PCV-2, usado en dicho método, se purifica a un grado de más de un 60% (p/p), preferentemente más de 60% (p/p), incluso más preferentemente más de 70% (p/p), incluso más preferentemente más de 80% (p/p), incluso más preferentemente más de 90% (p/p), más preferentemente más de 95% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica. El grado de pureza puede calcularse por tinción con Mancha de Proteína Imperial (Pierce) después de SDS PAGE mediante geles Bis-Tris NuPAGE al 10% (Invitrogen) usando el sistema de tampón MOPS NuPAGE (Invitrogen). El PCV-2, y preferentemente la ORF2 del PCV-2 puede purificarse usando métodos convencionales bien conocidos por un experto en la materia.

Descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente algunos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de la realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

LaFIG. 1 presenta los resultados de ultrafiltración a una escala de configuración piloto usando geles Bis-Tris/MOPS al 10% que demuestran la presencia de la ORF-2 después del proceso de filtración. Los carriles se cargaron de la siguiente manera: (1) marcador; (2) n/a; (3) n/a; (4) 24 - 180/181 Conc. Previa - 20 µl; (5) 25 - 180/181 1x antígenos - 20 µl; (6) 26 - 180/181 lavado en filtro - 20 µl; (7) 27 - PCV 504 conc. previa - 8 µl; (8) 28 - PCV 504 Perm - 20 µl; (9) 29 - PCV 504 1X - 20 µl; (10) 092704PD - 20 µl; (11) marcador;

Descripción detallada

Los siguientes ejemplos exponen materiales y procedimientos preferidos de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ilustración, y nada en su interior debe considerarse como una limitación sobre el alcance global de la invención.

50 Ejemplo 1

Este ejemplo describe un proceso a escala de laboratorio y a escala piloto para preparar el antígeno ORF2 del PCV-2 concentrado que tendrá una actividad viricida reducida en comparación con un proceso de fabricación que no incluye las etapas de la presente invención. Específicamente, se determinarán los efectos que posee la presente invención sobre la actividad viricida del antígeno ORF2 del PCV-2 sobre el virus PRRS.

55

ES 2 657 812 T3

Materiales y Métodos

Producción de antígeno:

Escala de laboratorio:

PCV SUB037 H1-F, 18,94 kg

5 PCV 1025, 20,6 kg

PCV 180/181, 20,0 kg

PCV SUB 504PD, 40 kg

Escala piloto:

PCV SUB 506PD, 362 kg

10 PCV SUB 507PD, 384 kg

PCV SUB512PD, 430 kg

PCV SUB 513PD, 405 kg

Cartuchos de ultrafiltración: GE Healthcare, Esterilización en sitio (Steam-In-Place (SIP)), cartuchos de membrana de fibra hueca.

15 UFP-100-E-55-STM: 100.000 NMWC, tubito de 1 mm de diámetro; usado en UF-002 en X109, escala de laboratorio.

UFP-300-E-55-STM: 300.000 NMWC, tubito de 1 mm de diámetro; usado en UF-002 en X109, escala de laboratorio.

UFP-100-E-65-MSM: 100.000 NMWC, tubito de 1 mm de diámetro; usado en UF-B2614, en APU-1, escala piloto.

UFP-300-E55-SMO: 300.000 NMWC, tubito de 1 mm de diámetro; usado en UF-2713 en VP-1, escala piloto.

En la evaluación de viabilidad y desarrollo de proceso inicial se usó el siguiente equipo de ultrafiltración:

20 Tabla 1. Equipo

Etapa de Proceso	Procedimiento	Equipo	Identificación
Ultrafiltración	Concentración de antígeno	Concentrador Flex-Stand	UF-002 en X109, escala de laboratorio
		Rodillo de UF	UF-B2614 en APU-1, escala piloto
		Rodillo de UF	UF-2713 en VP-1, escala piloto:

Proceso de Fabricación:

Configuración de la ultrafiltración (UF): Escala de laboratorio:

25 En el proceso de concentración se usaron bombonas de 50 litros que contenían material ORF2 del PCV-2 filtrado, inactivado, neutralizado, generado en construcción P con el Flex Stand de tamaño 30 l (Amersham) GE Healthcare, rodillo de UF N° 002.

30 El proceso de concentración inicial usó un esquema de diafiltración "discontinuo" mediante el cual aproximadamente 20 kg de material de antígeno se transfirió al rodillo de UF y se concentró a través de un cartucho de fibra hueca de 100.000 NMWC (UFP-100-E-55-STM). El proceso de concentración de 100.000 NMWC uso lotes de ORF2 del PCV-2 de material SUB037PD y PCV1025 de PD y Manufacturing, respectivamente.

Estos dos procesos iniciales se concentraron aproximadamente a 4x del volumen original y se determinó la cantidad suficiente (C.S.) en el tanque de alimentación de nuevo al volumen de transferencia original. El material concentrado se trató de esta manera durante un total de 2 concentraciones por número de lote, recuperando la tercera concentración y la concentración final como un concentrado y una parte de C.S. determinada a 1X del volumen original. Las muestras se extrajeron antes de la concentración previa en cada etapa de concentración y en cada etapa de determinación de C.S. Las muestras filtradas se extrajeron durante cada etapa de concentración.

Los siguientes dos procesamientos consecutivos concentraron el antígeno ORF2 del PCV-2 sin lavado con solución salina. El material concentrado se muestreo aproximadamente 4x y después a una concentración final. Aproximadamente 20 kg de material de antígeno se transfirió al tanque de contención de rodillo de UF y se concentró a través de un cartucho de fibra hueca de 300.000 NMWC (UFP-300-E-55-STM). Se añadió un segundo volumen de 20 L al tanque de contención con el concentrado de los primeros 20 L. Esto se concentró a un volumen final. El proceso de concentración a 300.000 NMWC usó lotes de ORF2 del PCV-2 del grupo PCV 180/181 y SUB504PD generado por Manufacturing y PD, respectivamente. Las muestras se extrajeron antes de la concentración y en cada etapa de concentración. Las muestras filtradas se extrajeron durante cada etapa de concentración.

Configuración de la ultrafiltración: Escala piloto:

El proceso de escala piloto utilizó SUB lotes 506PD, 512PD y 513PD. Los volúmenes de concentración previa de antígeno variaban de aproximadamente 350 L a 430 L. Los lotes SUB506PD y SUB513PD se transfirieron a DSP (procesamiento corriente abajo) 2602 y se concentró con UF-B2614 en APU-1 usando un filtro de 100.000 NMWC (UFP-100-65-E-MSM), con un área de superficie de 4,2 m². SUB512PD se transfirió a DSP 2701 y se concentró con UF-2713 usando un filtro de 300.000 NMWC (UFP-300-E-SMO) con un área de superficie de 2,1 m² al cuadrado. Por cada lote, se recuperó el material concentrado final y se conservó a 4°C para análisis.

Resultados y Conclusiones

Configuración de la ultrafiltración (UF): Escala de laboratorio:

La filtración con filtros de 100.000 NMWC (100 kDa) frente a 300.000 NMWC (300 kDa) fue comparable en tiempos de concentración y fue factible cuando se consideraba un proceso a escala completa. Los tiempos de filtración para el filtro de 100 kDa, concentración 4X, con aproximadamente 18 L a 26 L, variaron de 14 minutos a 32 minutos, obteniendo menores tiempos a partir de las etapas de lavado con solución salina (Tabla 2). Los tiempos de filtración para el filtro de 300 kDa, concentración 3,2X, 7X para PCV180/181y 21,5X para SUB504PD con aproximadamente 40 l de material concentrado en dos volúmenes consecutivos de 20 L produjeron 3,2X a los 25 minutos, 7X a los 23 minutos y 21,5X a los 32 minutos. Debido al tiempo empleado para conseguir un proceso de concentración para una presión transmembrana (PTM) diana de 10,25 psi se esperaba algún tiempo de variación.

Los valores de flujo del proceso variaron de 27,43 lmh a 32,00 lmh para el lote PCV180/181, obteniéndose el valor 32,00 lmh a partir de un aumento hacia el final del proceso de concentración. Los valores de flujo para el material SUB 504PD fueron 28,57 lmh durante la concentración de los 20 L primeros y 35,71 lmh durante la concentración de los 20 L segundos.(Tablas 3 y 4)

Tabla 2. Datos del proceso

Lote N°	Volumen de concentración de partida	Conc. X	Tiempo para el Concentrado (min)
PCV 037 QS-0 (100kDa)	18,94	4,17	24
PCV 037 QS-1 (100kDa)	18,76	4,75	16
PCV 037 QS-2 (100kDa)	19,05	4,70	14
PCV 1025 QS-0 (100kDa)	20,59	4,39	28
PCV 1025 QS-1 (100kDa)	20,24	4,65	29
PCV 1025 QS-2 (100kDa)	18,71	3,6	17
PCV 180/181 conc-1 (300kDa)	20	3,50	25
PCV 180/181 conc-2 (300kDa)	26,01	7,00	23
SUB 504PD conc-2 (300kDa)	24,72	21,50	32

Tabla 3. Datos del proceso

PCV 180/181: Filtro de 300.000 NMWC				
	TIEMPO	PTM	CAUDAL DE INFILTRADO (ml/min)	FLUJO (lmh)
Conc-1	9:55	9	N/A	N/A
Conc-2	10:23	12,5	N/A	N/A
Conc-2	10:30	12,5	960	27,43
Conc-2	10:33	14,5	960	27,43
Conc-2	10:36	10,5	1120	32,00
Conc-2	10:39	11	810	23,14

Tabla 4. Datos del proceso

SUB504PD: Filtro de 300.000 NMWC				
	TIEMPO	PTM	CAUDAL DE INFILTRADO (ml/min)	FLUJO (lmh)
Conc-1	15:29	9,5	1000	28,57
Conc-2	16:00	10,25	1250	35,71

- 5 Se observó que cuando el material concentrado era de nuevo una C.S. a un volumen 1X, el cambio en la fuerza después de la filtración no cambiaba, así como con el material reconstituido SUB 037 y el material PCV 1025 reconstituido. Los valores del contenido del antígeno concentrado desplazaron los límites del ensayo por debajo de los validados aproximadamente un límite 64 µg, como se observa en los valores en las tablas 5 a 8 en los que las cantidades del contenido del antígeno se comparan con las cantidades calculadas esperadas. Los valores del
- 10 infiltrado de las concentraciones realizadas usando los antígenos SUB 037, PCV 180/181 y SUB 504PD mostraron pérdida de material no significativa debido a la filtración. Todas las cantidades del contenido de antígeno infiltrado se incluyeron en el intervalo indetectable del ensayo. No se recobraron cantidades de contenido de antígeno infiltrado del antígeno PCV 1025.

Tabla 5. Cambio de SUB 037 en el Contenido de Antígeno PCV-2 (en µg)

Lote Número /vol	Conc PrevContenido de antígeno,	Conc Post Contenido de antígeno	Factor de concentración	Contenido de antígeno Calc	Cambio del contenido de antígeno calculado	Aumento/pérdida del RP calc
SUB 037 (18,94 kg)-- 4,7x—100 kDa--PDX	56	137,6	4,7	263,2	-125,6	pérdida
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina: CS-1	56	61,6	1	56	5,6	aumento
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina: CS-2	56	62,7	1	56	6,7	aumento
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina: CS-3	56	55,8	1	56	-0,2	pérdida
Filtrados 1, 2, 3 de SUB 037	--	0			Sin pérdida	

Tabla 6. Cambio de PCV 1025 en el Contenido de Antígeno PCV-2 (en µg)

Lote Número /vol	Conc PreContenido de antígeno,	Conc Post, Contenido de antígeno	Factor de concentración	Contenido de antígeno Calc	Cambio de contenido de antígeno calculado	Aumento/pérdida del RP calc
1025 (20,46 kg)-- 4,5X--100 kDa-- PDX	70,88	288,64	4,5	318,96	-30,32	pérdida
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-1	S/M _(SIN MUESTRA)	S/M	1	S/M	S/M	sin muestra
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-2	70,88	66,24	1	70,88	-4,64	pérdida
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-3	70,88	76,00	1	70,88	5,12	aumento
Filtrado 1025	--	S/M			S/M	

Tabla 7. Cambio en el Contenido de Antígeno PCV-2 (en µg)

Lote Número /vol	Conc PreContenido de antígeno,	Conc Post Contenido de antígeno,	Factor de concentración	Contenido de antígeno Calc	Cambio de contenido de antígeno calculado	Aumento/pérdida del RP calc
180/181 (40,3 kg)--3,5X--300 kDa--PDX	43,36	90,8	3,5	151,76	-60,96	pérdida
180/181 7,2X	43,36	247,04	7,2	312,19	-65,15	pérdida
Filtrado 180/181	--	0			Sin pérdida	N/E

Tabla 8. Cambio en el Contenido de Antígeno PCV-2 (en µg)

Lote Número /vol	Conc PreContenido de antígeno,	Conc Post Contenido de antígeno,	Factor de concentración	Contenido de antígeno Calc	Cambio de contenido de antígeno calculado	Aumento/pérdida del RP calc
SUB504 (40,43 kg) 4,3X—300 kDa--PDX	22,24	68,16	4,3	95,63	-27,47	pérdida
SUB504 20X	22,24	448,48	20	444,8	3,68	aumento
Infiltrado SUB504	--	0			Sin pérdida	

5 Los geles SDS-PAGE se procesaron con material de PCV 180/181 y SUB 504PD en R&D. La banda de ORF2 que se encontraba a aproximadamente 27 kDa en la Figura 1 fue coherente con el modelo de banda de la referencia en el carril 10. Previamente, se había demostrado que este tamaño de banda era de la ORF2. El material infiltrado de SUB 504PD, concentración de filtración de 300 kDa, mostró una ausencia de banda en el sitio de 27 kDa. Aparentemente no se perdió ninguna proteína ORF2 con este filtro de tamaño de poro. El gel se procesó en

10 condiciones reductoras.
 La actividad viricida del antígeno preconcentrado, antígeno concentrado, antígeno reconstituido e infiltrado por filtración se ensayó contra la vacuna del virus PRRS. Los resultados iniciales del Control de Calidad (CC) para SUB 037 no fueron satisfactorios para el material preconcentrado ni para el concentrado (filtro de 100 kDa), que de nuevo se había reconstituido a 1X con solución salina. Sin embargo, cuando el material concentrado se formuló en vacunas, concentraciones hasta un 80% de inclusión en la vacuna redujeron esta actividad viricida a un nivel satisfactorio muy por debajo del límite de aceptación de pérdida de titulación de virus PRRS de 0,7 log/ml. El material infiltrado de SUB 037 mostró un límite pasando a niveles no satisfactorios de actividad viricida. Véase la tabla 9.

15 Se observó que el material preconcentrado de PCV 1025 era insatisfactorio para la actividad viricida contra el PRRS con pérdida en la titulación de PRRS a una pérdida de 1,5 log/ml. Los tres materiales concentrados reconstituidos con solución salina (filtro de 100 kDa) se pasaron a una pérdida de 0,5 log/ml y a una pérdida de 0,6 log/ml con uno de los concentrados reconstituidos satisfactorios "sin cambios" en la titulación del PRRS. Las muestras de infiltrados no se ensayaron para este lote. Véase la tabla 10.

El material de vacuna preconcentrado de PCV 180/181 no fue satisfactorio para la actividad viricida contra el PRRS

ES 2 657 812 T3

para 2 de las 3 vacunas preparadas. Los niveles de inclusión de antígeno en porcentaje variaron de 37,0% a 55,5%. Se observó que la vacuna preconcentrada de inclusión con un % mayor era satisfactoria.

5 Las vacunas preparadas de material 1X (concentrado reconstituido a 1X con solución salina) se encontró que eran satisfactorias para la actividad viricida contra el virus PRRS. Los niveles de inclusión de antígeno en porcentaje variaron de un 44% a un 66%. Véase la tabla 11.

10 Las vacunas SUB 504PD preparadas a partir del antígeno preconcentrado con inclusión de vacuna a un 79,5% fueron satisfactorias para la actividad viricida contra el virus PRRS. Las vacunas preparadas a partir del antígeno concentrado 4,3X con inclusión de vacuna de 23,5-35% y de antígeno concentrado 21,5X con inclusión de vacuna de 3,5-5,5% también fueron satisfactorias. Por último, se encontró que el antígeno de lavado con filtro preparado con niveles de inclusión a un 72% era satisfactorio para la actividad viricida contra el virus PRRS.

Tabla 9. Actividad Viricida de SUB 037

ID Muestra	Cambio de fuerza log/ml	Sat/Insat
SUB 037 (18,94 kg)-4,7x--100 kDa--PDX Contenido de antígeno 56 pre / 137,6 post	1,4	insat
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-1	0,8	insat
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-2	1,3	insat
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-3	1,3	insat
Infiltrado-1 SUB 037	0,6	sat
Infiltrado-2 SUB 037	1,0	insat
Infiltrado-3 SUB 037	0,5	sat
Vacuna: 20% inclusión Ames**	-0,2	sat
Vacuna: 40% inclusión Ames**	-0,2	sat
Vacuna: 60% inclusión Ames**	0,2	sat
Vacuna: 80% inclusión Ames**	0,1	sat

Tabla 10. Actividad Viricida de PCV 1025

ID Muestra	Cambio de fuerza log/ml	Sat/Insat
Conc Pre de PCV1025 (20,46 kg)--4,5x--100 kDa--PDX Contenido de antígeno 70,8 pre / 288,64 post	1,5	insat
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-1	0,6	sat
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-2	sin cambios	sat
Concentrado y Reconstituido con Solución Salina-3	0,5	sat
Infiltrado 1025	sin registro	s/m

ES 2 657 812 T3

Tabla 11. Actividad Viricida de PCV 180/181

ID Muestra	% de Inclusión de vacuna	Cambio de fuerza log/ml	Sat/Insat
PCV180/181 (49,3 kg)--3,5X--300 kDa--PDX Contenido de antígeno = 43,36 µg pre/Contenido de antígeno (1) 90,88 µg/Contenido de antígeno (2) 247,04 µg	n/a	s/m	s/m
Preconcentrado de vacuna Contenido de antígeno = 16 µg/8,8 µg real	37,0	1,2 log/ml pérdida	insat
Preconcentrado de vacuna Contenido de antígeno = 19,2 µg/8,8 µg real	44,5	1,2 log/ml pérdida	insat
Preconcentrado de vacuna Contenido de antígeno = 24 µg/15,36 µg real	55,5	0,8 log/ml aumento	sat
7X reconstituido a 1x vacuna Contenido de antígeno = 16 µg/8,48 µg real	44,0	0,6 log/ml aumento	sat
7X reconstituido a 1x vacuna Contenido de antígeno = 19,24 µg/12,32 µg real	53,0	sin cambios	sat
7X reconstituido a 1x vacuna Contenido de antígeno = 24 µg/14,08 µg real	66,0	0,3 log/ml aumento	sat

Tabla 12. Actividad Viricida de SUB 504

ID Muestra	% de Inclusión de vacuna	Cambio de fuerza log/ml	Sat/Insat
SUB504PD (~40 kg) 4,3X--300 kDa--PDX Contenido de antígeno = 22,24 µg pre/Contenido de antígeno (1) 68,16 µg/Contenido de antígeno (2) 448,48 µg	n/a	n/a	n/a
Preconcentrado de vacuna Contenido de antígeno = 16 µg/10,24 µg real	79,5	0,3 log/ml pérdida	sat
Vacuna 4.3X Contenido de antígeno = 16 µg/18,56 µg real	23,5	0,1 log/ml aumento	sat
Vacuna 4.3X Contenido de antígeno = 19,2 µg/3,04 µg real	28,0	0,7 log/ml aumento	sat
Vacuna 4.3X Contenido de antígeno = 24 µg/5,28 µg real	35,0	0,1 log/ml aumento	sat
Vacuna 21.5X Contenido de antígeno = 16 µg/10,08 µg real	3,5	0,1 log/ml pérdida	sat
Vacuna 21.5X	4,5	0,1 log/ml aumento	sat

ES 2 657 812 T3

Contenido de antígeno = 19,2 µg/15,2 µg real			
Vacuna 21.5X Contenido de antígeno = 24 µg/3,36 µg real	5,5	0,3 log/ml aumento	sat
Lavado del filtro Contenido de antígeno = 16 µg/12,96 µg real	72,0	0,7 aumento	sat

Tabla 13. Datos del proceso

SUB 506: FILTRO DE 100.000 NMWC			
TIEMPO	PTM (psi)	CAUDAL INFILTRADO (ml/min)	FLUJO (lmh)
13:25	12	800	11,43
13:59	11,5	3300	47,14
15:09	12,5	3800	54,29
15:29	12	2100	30,00

Tabla 14. Datos del proceso

SUB 513: FILTRO DE 100.000 NMWC			
TIEMPO	PTM (psi)	CAUDAL INFILTRADO (ml/min)	FLUJO (lmh)
6:49	11,5	2,600	37,14
8:06	11,5	2700	38,57

5

Tabla 15. Datos del proceso

SUB 512: FILTRO DE 300.000 NMWC			
TIEMPO	PTM (psi)	CAUDAL INFILTRADO (ml/min)	FLUJO (lmh)
15:25	16	5,000	142,86
18:00	13	800	22,86
20:03	17,5	3,500	100,00
21:05	17,5	3000	85,71
21:47	18	2500	71,43
21:59	12,5	4000	114,29

Análisis

10 El vector baculovirus inactivado, de Tipo 2, de la vacuna de Circovirus Porcina es un producto global fabricado por Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., in St. Joseph, Missouri y usado en el producto INGELVAC CIRCOFLEX®. En la recogida, los líquidos del virus se filtran asépticamente a través de uno o más prefiltros de 2-15 µm y después un filtro de 0,8-1,0 µm para una filtración final. Se añade solución madre BEI (etilenimina binaria) a los líquidos recogidos a una concentración final de BEI 5 mM. Los líquidos se agitan continuamente durante un mínimo de 72

horas y un máximo de 96 horas y pueden conservarse congelados a \square 40°C o a 4°C \pm 3°C. Se añade una solución de tiosulfato de sodio 1,0 M a una concentración final de 5 mM para neutralizar cualquier BEI residual.

5 El antígeno neutralizado se mezcla con una solución de Carbopol de 0,5% a 20% v/v con el contenido de la proteína ORF2 del PCV-2 en el producto final ajustado por la adición de solución salina para cumplir los requisitos de liberación mínimos de una fuerza relativa menor que o igual a 1,0. Después de la masificación, la serie puede conservarse a 4°C o se cargarse.

10 El material ORF2 del PCV-2 se concentró después de la neutralización mediante ultrafiltración en cartucho de fibra hueca. El material concentrado se procesó adicionalmente con dos volúmenes de diafiltración de solución salina. Se determinó el tamaño de poro de límite nominal de peso molecular (NMWC) preferido para la ultrafiltración para incluir 100.000 NMWC y 300.000 NMWC, cada uno con un diámetro luminal de tubo de 1,0 mm. Ambos tamaños de poro se incluyeron para proporcionar flexibilidad en la fabricación en el caso de suministro interrumpido de cartuchos de filtro por parte del fabricante. Los geles de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS PAGE) y los datos de fuerza indicaron que había ninguna diferencia en la proteína antigénica o en la fuerza entre los dos tamaños de poro de filtro.

15 Ejemplo 2

Este ejemplo compara los rendimientos relativos de la ORF2 usando los métodos de la presente descripción con métodos conocidos en la técnica anterior. Se entiende que este ejemplo representa uno de los muchos métodos posibles para obtener la ORF2 del PCV-2 para el uso con los métodos y composiciones de la presente invención.

Materiales y Métodos

20 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 medio asérico de insecto, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). El cultivo celular maestro se identificó como solución madre de célula maestra de SF+ (*Spodoptera frugiperda*), pase 19, Lote n° N112-095W. Las células utilizadas para generar la solución madre de célula maestra de SF+ se obtuvieron de Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. La línea de células SF+ para este ejemplo se confinó entre los
25 pases 19 y 59. Otros pases funcionarán para los fines de la presente descripción, pero con el fin de aumentar la escala del procedimiento para una producción a gran escala, serán necesarios, probablemente, al menos 19 pases, y pases 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 agitación constante. Los cultivos se hicieron crecer en matraces de centrifugación de 100 ml a 250 ml con 25 a 150 ml de medio asérico Excell 420. Cuando las células se habían multiplicado hasta una densidad celular de $1,0-8,0 \times 10^6$ células/ml, estas se dividieron en nuevos recipientes con una densidad de siembra de $0,5-1,5 \times 10^6$ células/ml. Los cultivos por expansión posteriores se cultivaron 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.

35 Después de la siembra, los matraces se incubaron a 27°C durante cuatro horas. Posteriormente, cada matraz se sembró con un baculovirus recombinante que contenía el gen ORF2 del PCV-2 (SEQ ID NO: 4). El baculovirus recombinante que contenía el gen ORF2 del PCV-2 se generó de la siguiente manera: el gen ORF2 del PCV-2 procedente de una cepa norteamericana de PCV-2 se amplificó por PCR que contenía una secuencia de Kozak 5' (SEQ ID NO: 1) y un sitio 3' EcoR1 (SEQ ID NO: 2), se clonó en el vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI).
40 Después, se escindió posteriormente y se subclonó en el vector de transferencia pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). La parte subclonada se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 7. El plásmido pVL1392 que contenía el gen ORF2 del PCV-2 se denominó N47-064Y y cotransfectó 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 del PCV-2. La nueva construcción se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 8. El baculovirus recombinante que contenía el gen ORF2 del PCV-2 se purificó en placa y el Virus de Semilla Maestra (VSM) se propagó en la línea de celular SF+, se dividió alícuotas y se conservó a -70°C. El VSM se identificó positivamente como baculovirus de ORF2 del PCV-2 por PCR-RFLP usando cebadores específicos de baculovirus. Las células de insecto infectadas con baculovirus de ORF2 del PCV-2 para generar el VSM o virus de Semilla de Trabajo expresaron el antígeno ORF2 del PCV-2, según se detecta mediante suero policlonal o anticuerpos monoclonales en un ensayo de anticuerpos fluorescente indirecto.
50 Adicionalmente, la identidad del baculovirus de ORF2 del PCV-2 se confirmó por secuenciación de aminoácidos N-terminal. El VSM del baculovirus del ORF2 del PCV-2 también se ensayó para determinar la pureza de acuerdo con 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28 y 113.55. Cada baculovirus recombinante se sembró en los matraces de centrifugación que tenían diversas multiplicidades de infección (MOI). El matraz 1 se sembró con 7,52 ml de siembra 0,088 MOI; el matraz 2 se sembró con 3,01 ml de siembra 0,36 MOI; el matraz 3 se sembró con 1,5 ml de siembra 0,18 MOI; y el matraz 4 se sembró con 0,75 ml de siembra 0,09 MOI.

Después de sembrar con el baculovirus, los matraces se incubaron después a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días y se agitaron también a 100 rpm durante ese tiempo. Los matraces usaron tapas con ventilación para permitir el flujo del aire. De cada uno de los matraces se tomaron muestras cada 24 horas durante los siguientes 7 días. Después de la

extracción, cada muestra se centrifugó y tanto el sedimento como el sobrenadante se separaron y después se microfiltraron a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,45-1,0 µm.

Resultados y Conclusiones

Después, las muestras resultantes que poseían la cantidad de ORF2 presente en su interior, se cuantificaron mediante un ensayo ELISA. El ensayo ELISA se realizó con el anticuerpo porcino de captura anti-PCV-2 Pab IgG Prot. G purificado (diluido 1:250 en PBS), se diluyó a 1:6000 en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6). Después, se pusieron 100 µl del anticuerpo en los pocillos de la placa de microtitulación, se cerraron herméticamente y se 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. Posteriormente, a cada uno de los pocillos se añadieron 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 Q.S. hasta 100 ml con agua destilada). La etapa siguiente era lavar la placa de ensayo y luego añadir antígeno pre-diluido. El antígeno pre-diluido se produjo añadiendo 200 µl de solución diluyente (0,5 ml de Tween 20 en 999,5 ml de D-PBS) a cada uno de los pocillos en una placa de dilución. La muestra se diluyó luego a una relación de 1:240 y a una relación de 1:480, y 100 µl de cada una de estas muestra diluidas se añadieron después a uno de los pocillos superiores en la placa de dilución (es decir, un pocillo superior recibió 100 µl de la dilución de 1:240 y el otro recibió 100 µl de la dilución de 1:480). Después se hicieron diluciones en serie para el resto de la placa separando 100 µl de cada uno de los pocillos sucesivos y transfiriéndolos al pocillo siguiente de la placa. Cada pocillo se mezcló antes de realizar la siguiente transferencia. El lavado de la placa de ensayo incluía el lavado de la placa durante tres veces con el tampón de lavado. Después, la placa se cerró herméticamente y se incubó durante una hora a 37°C antes de lavar 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. Después, la placa se cerró herméticamente 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%. El anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado (H+)-HRP (Jackson Immunoresearch) se diluyó en el diluyente de conjugado hasta 1:10.000. Después, a cada uno de los pocillos se añadieron 100 µl del anticuerpo conjugado diluido. Después, la placa se cerró herméticamente 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 y 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. Después, 100 µl de solución de HCl 1 N se añadieron a todos los pocillos para detener la reacción. La placa se hizo pasar después a través de un lector ELISA.

Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Tabla 17 que figura a continuación:

Tabla 17

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

Día	Matraz	ORF2 en el sedimento (µg)	ORF2 en el sobrenadante (µg)
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

5 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 en lugar de permitir que la expresión prosiga durante menos de 5 días y recuperar la ORF2 de las células, se proporciona un gran aumento en los rendimientos de ORF2 y una mejora significativa sobre los métodos anteriores.

Ejemplo 3

10 La purificación de ORF2 se consiguió mediante proceso de microfiltración seguido por un esquema de cromatografía en dos etapas. El material recogido obtenido en el Ejemplo 1 se filtró a través de una membrana de microfiltración que poseía un tamaño de poro de 1,2 µm. El microfiltrado se purificó después por exclusión de tamaño (filtración en gel) usando una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR. Una muestra de partida de 20 ml del filtrado que comprendía la ORF2 del PCV-2 se cargó sobre la columna HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR a un caudal de 1,0 ml/min y después se eluyó con volúmenes de 1,5 columnas de Tampón A (Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM). Se
15 recobraron fracciones de ocho mililitros durante la etapa de dilución. Las fracciones nº 10 - 16 (10 a 16 mililitros del eluato) de la cromatografía de exclusión por tamaño se agruparon y se utilizaron como la muestra de partida para la cromatografía de intercambio aniónico (AIEX). Estas fracciones representan el volumen inicial del calibre de la columna, que es donde eluye la ORF2 del PCV-2 debido al gran peso molecular de la proteína ORF2 del PCV-2. Esta técnica separa eficazmente la ORF2 de la mayoría de los otros componentes de proteína de la muestra de
20 antígeno.

AIEX se realizó usando una columna de 5 ml HiTrap Q Sepharose HP. Aproximadamente 48 ml del volumen inicial del conjunto de la fracción del volumen inicial del experimento de exclusión por tamaño se cargaron en la columna AIEX HiTrap Q Sepharose HP a un caudal de 3,0 ml/min. Después de una etapa de lavado con Tampón de carga A (Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM) para separar el material no unido, se eluyó la proteína con una sola etapa de volúmenes de 8 columnas de Tampón B (Tris 20 mM, pH 6,5, DTT 5 mM, NaCl 1,0 M) y se recobraron fracciones de 5 ml. Las fracciones pico nº 8 y 9 se recobraron y se agruparon. El flujo a través del procesamiento AIEX se cargó de nuevo sobre la columna Q Sepharose y se eluyó como se ha descrito anteriormente. Para el segundo proceso, las fracciones nº 7, 8 y 9 se agruparon con las fracciones del primer proceso. Un tercer proceso del material a través de flujo no dio como resultado ninguna fracción pico significativa en el eluato, de manera que no se guardaron fracciones de este proceso.
30

El conjunto de la fracción de aproximadamente 25 ml se dializó durante una noche a 4°C frente a 2 litros de solución salina tamponado con fosfato, pH 7,4 (Gibco). Después de la diálisis, la ORF2 tenía una pureza >95% basándose en el análisis SDS-PAGE.

Ejemplo 4

35 Se prepararon soluciones de 2-bromoetilamina bromhidrato (BEA), hidróxido de sodio (NaOH), y tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃). La solución BEA se preparó pesando 1,63 g de BEA (Sigma, B65705, lote 05316EE) y disolviendo en 20 ml de agua purificada (dH₂O, agua destilada, en el presente documento: "agua"). La concentración final de esta solución fue BEA 0,4 M. La solución NaOH se preparó pesando 0,33 g de NaOH (JTBaker, 3722-01, lote E01470) y disolviendo en 20 ml de agua. La concentración final de esta solución fue NaOH 0,41 M.

40 La solución de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) se preparó pesando 25 g de Na₂S₂O₃ (Sigma S7026, lote 106K0178) y disolviendo en 100 ml de agua. Una vez disuelto, la solución se filtró a través de un filtro en la parte superior del frasco de 0,2 µm para esterilizar. La concentración final de esta solución fue Na₂S₂O₃ 1,0 M.

Para preparar la etilenimina binaria (BEI), se mezclaron 20 ml de la solución BEA 0,4 M con 20 ml de NaOH 0,41 M y se determinó que el pH inicial era de ~12,5 - 14,0. La mezcla se incubó a 37°C durante una hora y de nuevo se

controló el pH. El pH después de la incubación era ~7,0 – 7,5, y esto indicó una reacción de ciclación exitosa de BEA en BEI. Se calculó que la concentración de BEI era de ~0,2 M (20 ml de BEA 0,4 M ciclada con un exceso de base (0,41 M) en un volumen de 40 ml).

5 Las reacciones de inactivación fueron las siguientes (para inactivar 100 ml de material): Los materiales a inactivar se mezclaron con 2,5 ml de BEI recién preparada. Las reacciones de inactivación se incubaron durante 72 h a 37°C agitando para mezclar de manera continuada las soluciones. Después de 72 h, las reacciones se neutralizaron añadiendo 0,5 ml de tiosulfato de sodio 1,0 M. Después de dejar que el tiosulfato completase la mezcla en las soluciones (~15 min de mezcla), los materiales inactivados y neutralizados se conservaron a 4°C antes de la formulación con adyuvante.

10 Ejemplo 5

Preparación de las muestras de ensayo:

Para calcular la inmunogenicidad del antígeno ORF2 altamente purificado (grado de pureza de más 90%) en comparación con el antígeno ORF2 no purificado o menos purificado, se prepararon lotes de muestras de diversos ensayos de 5 ml:

15 Tabla 18: Muestras de ensayo

Muestra de ensayo n°	Descripción
n° 1	Antígeno ORF2 altamente purificado, inactivado con BEI y mezclado con 1 mg/ml de Carbopol
n° 2	Antígeno ORF2 altamente purificado mezclado con restos de células de insecto inactivadas con BEI y mezclado con 1 mg/ml de Carbopol
n° 3	Residuos de células de insecto (control simulado)
n° 4	Antígeno ORF2 del PCV-2, no filtrado, no purificado, mezclado con 1 mg/ml de Carbopol
n° 5	Antígeno ORF2 del PCV-2 no filtrado, no purificado, inactivado con BEI y mezclado con 1 mg/ml de Carbopol
n° 6	Antígeno ORF2 del PCV-2, no purificado, inactivado con BEI y mezclado con 1 mg/ml de Carbopol

20 La muestra de ensayo n° 1 se produjo de la siguiente manera: el antígeno ORF2 del PCV-2 se produjo como se describe en el Ejemplo 1 y se purificó altamente como describe en el Ejemplo 3. El antígeno ORF2 del PCV-2 altamente purificado se inactivó con BEI como se describe en el Ejemplo 4. Después de la inactivación con BEI, el contenido del antígeno ORF2 del PCV-2 en el sobrenadante se ajustó a una cantidad de aproximadamente 32 a 32,5 µg por ml de muestra de ensayo se mezcló con 1 mg de Carbopol 971P (BF Goodrich, Ohio, USA) por ml de muestra de ensayo.

25 La muestra de ensayo n° 2 se produjo de la siguiente manera: el antígeno ORF2 del PCV-2 se produjo como se describe en el Ejemplo 1 y se purificó altamente como describe en el Ejemplo 3. El antígeno ORF2 del PCV-2 altamente purificado se inactivó con BEI como se describe en el Ejemplo 4. Después de la inactivación con BEI, el antígeno ORF2 del PCV-2 se mezcló con residuos de células de insecto y Carbopol. La muestra de ensayo final incluyó aproximadamente $2,06 \times 10^6$ células de insecto, aproximadamente de 32 a 32,5 µg y 1 mg de Carbopol 971P por ml de muestra de ensayo.

30 La muestra de ensayo n° 3 se preparó mezclando aproximadamente $2,06 \times 10^6$ células de insecto con 1 mg de Carbopol 971P por ml de muestra de ensayo. Antes de mezclar, las células de insecto se inactivaron con BEI como se describe en el Ejemplo 3.

35 La muestra de ensayo n° 4 se produjo de la siguiente manera: el antígeno ORF2 del PCV-2 se produjo como se describe en el Ejemplo 1. El contenido del antígeno ORF2 del PCV-2 en el sobrenadante se ajustó a una cantidad de aproximadamente 32 a 32,5 µg por ml de muestra de ensayo y se mezcló con 1 mg de Carbopol 971P por ml de muestra de ensayo.

La muestra de ensayo n° 5 se produjo de la siguiente manera: el antígeno ORF2 del PCV-2 se produjo como se describe en el Ejemplo 1. Después el sobrenadante se usó para la inactivación con BEI como se describe en el Ejemplo 3. Después de la inactivación con BEI, el antígeno ORF2 del PCV-2 se mezcló con residuos de células de

insecto y Carbopol. La muestra de ensayo final incluyó aproximadamente $2,06 \times 10^6$ células de insecto, aproximadamente de 32 a 32,5 μg y 1 mg de Carbopol 971P por ml de muestra de ensayo.

La muestra de ensayo n° 6 se produjo de la siguiente manera: el antígeno ORF2 del PCV-2 se produjo como se describe en el Ejemplo 1. El sobrenadante del Ejemplo 1 se filtró después a través de un filtro a escala de laboratorio de 1,2 μm . Previamente se determinó que este tamaño de filtro era suficiente para filtrar células de insecto intactas y destruidas mientras que se permitía que el antígeno ORF2 del PCV-2 pasara a través del filtro. Después de esto, el filtrado se inactivó con BEI como se describe en el Ejemplo 3. Después de la inactivación con BEI, el contenido del antígeno ORF2 del PCV-2 en el sobrenadante se ajustó a una cantidad de aproximadamente 32 a 32,5 μg por ml de la muestra de ensayo y se mezcló con 1 mg de Carbopol 971P.

10 *Ensayo de la inmunogenicidad de cada una de las muestras de ensayo*

Fase clínica:

Los laboratorios Jackson (Estados Unidos) proporcionaron ciento cincuenta ratones hembra Balb/C y se aclimataron durante siete días. Un ratón de cada jaula se seleccionó al azar para la extracción de sangre el día 0 para un total de veintiséis muestras. A un total de 10 ratones se les inoculó por vía subcutánea Tampón Fosfato de Dulbecco de 0,1 – 0,2 ml.

A un total de veinte ratones se les inoculó por vía subcutánea de 0,1 – 0,2 ml de cada muestra de ensayo (muestras de ensayo n° 1 a n° 6). Cada jaula contenía cinco ratones y todos los ratones de cada jaula estaban en el mismo grupo de tratamiento. El día veintiuno, todos los ratones se les extrajo definitivamente la sangre. Cada muestra de sangre se dejó coagular y el suero se recogió por centrifugación. Todas las muestras se mantuvieron en tubos separados y se conservaron a $-80\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ hasta el ensayo. Se dispuso a los ratones para la incineración.

Ensayo de muestras:

La inmunogenicidad de cada muestra de ensayo se calculó midiendo la respuesta de anticuerpos específica de PCV-2 de cada muestra de ensayo usando un ELISA interno específico de PCV-2. El valor de inmunogenicidad de cada muestra de ensayo se proporciona como un valor de inmunogenicidad relativa (IR) en la tabla 2. Este valor de Inmunogenicidad Relativa es una medida para la titulación de anticuerpo específica de ORF2 obtenida en un animal inmunizado por cantidad normalizada de antígeno ORF2 usada para la inmunización.

En lugar de usar el ELISA interno, la cantidad de anticuerpos específicos de PCV-2 también puede medirse usando el ensayo ELISA descrito por Nawagitgul, P., et al. en Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9: 33-40 (2002). El valor medido en dicho ensayo también puede usarse para calcular el valor de inmunogenicidad relativa (véase a continuación).

Una alícuota de suero de cada ratón se agrupó con compañeros de jaula para un total de 26 muestras el día 21. Una alícuota de cada muestra de suero del día 0 se agruparon en una muestra. La referencia se diluyó dos veces comenzando a 1:2 y se añadió por triplicado a cada pocillo correspondiente. Los controles positivos y negativos se añadieron por triplicado. Cada muestra se diluyó en serie dos veces y se añadió a la placa de inicio a 1:200 por triplicado. La absorbancia final a 450 nm se leyó usando un lector de Placa SoftMax™ calibrada mensualmente y todos los valores de DO sin procesar se capturaron electrónicamente y se analizaron con Statlia (Brendan Scientific) para calcular los valores de Inmunogenicidad Relativa (IR).

Resultados:

El valor de IR calculado para la cantidad de anticuerpos producidos después de la inmunización demostró que la formulación de ORF2 del PCV-2 purificada suscitó la mayor respuesta serológica (anticuerpo) contra el antígeno ORF2 del PCV-2 altamente purificado. La formulación de la ORF2 del PCV-2 purificada junto con los residuos de células de insecto dio como resultado una disminución en la inmunogenicidad relativa (es decir inmunogenicidad) de ORF2 en comparación con la ORF2 del PCV-2 altamente purificada en solitario. Las células de insecto en solitario no generaron ninguna respuesta de anticuerpo contra el antígeno ORF2 del PCV-2 de ninguna manera. Las muestras de ensayo 4 a 6, que tampoco contenían el antígeno ORF2 del PCV-2 altamente purificado también mostraron una inmunogenicidad relativa disminuida en comparación con la ORF2 del PCV-2 purificada en solitario.

Realizaciones

Las siguientes cláusulas también están descritas aquí:

1. Un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de:

- i) obtener un primer líquido que contiene en su interior el antígeno de PCV-2; y
- ii) separar al menos una parte de dicho primer líquido de dicho antígeno de PCV-2.

2. Un método de acuerdo con la cláusula 1, en donde la parte de dicho primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por un intercambio de la parte del primer líquido por un segundo líquido, en donde dicho segundo líquido es diferente de dicho primer líquido.
- 5 3.El método de acuerdo con la cláusula 2, en donde el intercambio de la parte de dicho primer líquido por dicho segundo líquido comprende las etapas de:
- a) adición de líquido, que comprende añadir dicho segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2; y
- b) concentración del antígeno de PCV-2 por separación de una parte de dichos primer y segundo líquidos.
- 10 4.El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 3, en donde la parte de dicho primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 por una etapa de filtración utilizando un filtro.
- 5.El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 3 a 5, en donde dicha etapa de concentración y dicha etapa de adición de líquido se realizan sustancialmente de manera simultánea.
- 6.El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 3 a 6, en donde dicha etapa de concentración y dicha etapa de adición de líquido se realiza al menos dos veces.
- 15 7.El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 4 a 6, en donde dicho filtro incluye una membrana semipermeable.
- 8.El método de acuerdo con la cláusula 7, en donde dicha membrana semipermeable posee un tamaño de poro promedio que es menor que el antígeno de PCV-2 para impedir así el paso de al menos 90% de dicho antígeno de PCV-2 a través de los poros de dicha membrana semipermeable y retienen el antígeno de PCV-2 dentro el filtro.
- 20 9.El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 4 a 8, en donde dicho filtro tiene un tamaño de poro promedio que impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 3 a 9, en donde dicha etapa de concentración concentra el antígeno de 3X a 50X en comparación con el volumen de dicho primer líquido.
- 25 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 10, en donde la actividad viricida de la composición antigénica de PCV-2 se reduce al menos 10% en comparación con dicho líquido que no se ha sometido a dicho método.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 11, en donde la composición antigénica de PCV-2 producida por las etapas i) a ii) produce una pérdida de menos de 1 log TCID₅₀ por ml de un virus vivo o de menos de 1 log UFC por ml de bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 horas o más.
- 30 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en donde la composición antigénica de PCV-2 producida por las etapas i) a ii) produce una pérdida de TCID₅₀ de menos de 0,7 log por ml de un virus vivo o de UFC de menos de 0,7 log por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezclan con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 horas o más.
- 35 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 13, en donde el método comprende adicionalmente la etapa de recoger el antígeno de PCV-2 restante después de la etapa ii).
15. El método de acuerdo con la cláusula 14, en donde el método comprende adicionalmente la etapa de purificar el material recogido de la etapa ii) que comprende el antígeno de PCV-2, por procedimientos cromatográficos.
- 40 16. El método de acuerdo con la cláusula 15, en donde el antígeno de PCV-2 se purifica a un grado de pureza del antígeno de PCV-2 de más de 50% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína.
17. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 16, que comprende adicionalmente la etapa de mezclar el antígeno de PCV-2 restante después de la etapa ii) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables.
- 45 18. El método de acuerdo con la cláusula 17, en donde el componente adicional es un adyuvante.
19. El método de acuerdo con la cláusula 18, en donde el adyuvante es Carbomer.
20. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 19, en donde el antígeno de PCV-2 comprende la proteína ORF-2 del PCV-2.
21. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 20, en donde el antígeno de PCV-2 comprende

partículas similares a virus de la proteína ORF-2 del PCV.

22. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 21, en donde dicho método comprende adicionalmente la etapa de combinar la composición antigénica de PCV-2 con al menos un antígeno adicional.
- 5 23. El método de acuerdo con la cláusula 22, en donde dicho al menos un antígeno adicional incluye el antígeno del Virus Reproductivo y Respiratorio Porcino y/o el antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae*.
24. Una composición inmunogénica PCV-2 que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 23.
- 10 25. Una composición antigénica de PCV-2, en donde dicha composición antigénica de PCV-2 produce una pérdida de menos de 1 log TCID₅₀ por ml de un virus vivo o de menos de 1 log UFC por ml de una bacteria viva, en donde el virus vivo o la bacteria viva se mezclan con la composición antigénica de PCV-2 durante al menos 2 horas.
26. La composición antigénica de PCV-2 de acuerdo con la cláusula 25, en donde dicha composición antigénica de PCV-2 produce una pérdida de menos de 0,7 log TCID₅₀ por ml de un virus vivo o de menos de 0,7 log UFC por ml de una bacteria viva, en donde el virus o la bacteria viva se mezclan con la composición antigénica de PCV-2 durante al menos 2 horas.
- 15 27. La composición antigénica de PCV-2 de acuerdo con la cláusula 25 o 26, en donde dicho virus vivo es el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS).
28. Una composición inmunogénica que comprende una composición antigénica de PCV-2 que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 23.
- 20 29. Una composición inmunogénica que comprende la composición antigénica de PCV-2 de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 24 a 26.
30. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 29, en donde dicha composición inmunogénica comprende adicionalmente un virus vivo atenuado o una bacteria viva atenuada de al menos otro organismo causante de enfermedades porcinas.
- 25 31. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 30, en donde dicho virus vivo atenuado es el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS).
32. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 29 a 31, en donde dicha composición inmunogénica comprende adicionalmente una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
33. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 29 a 32, en donde dicha composición inmunogénica comprende adicionalmente un adyuvante.
- 30 34. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 33, en donde dicho adyuvante es Carbomer.
35. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno de PCV-2 purificado y un adyuvante.
36. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 35, en donde el grado de pureza del antígeno de PCV-2 es mayor de 50% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica.
- 35 37. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 35 o 36, en donde el antígeno de PCV-2 es una proteína ORF2 de circovirus porcino recombinante expresada en células de animales o bacterias.
38. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 35 a 37, en donde la proteína ORF2 de circovirus porcino puede obtenerse mediante un proceso que comprende las etapas de
- a. expresar el antígeno de PCV-2 en una célula hospedadora;
 - b. recoger el cultivo celular obteniendo el antígeno de PCV-2;
 - 40 c. purificar lo recogido que comprende el antígeno de PCV-2 por filtración en gel;
 - d. mezclar el antígeno de PCV-2 purificado con un adyuvante.
39. La composición inmunogénica de acuerdo con las cláusulas 28 a 38, en donde dicha composición inmunogénica incluye una respuesta inmunoprotectora contra PCV-2 después de la administración de una dosis de dicha composición inmunogénica.
- 45 40. La composición inmunogénica de acuerdo con las cláusulas 28 a 38, en donde la administración de dicha composición inmunogénica reduce el empobrecimiento linfóide y la inflamación al menos un 80% en un mamífero en comparación con un animal que no recibe dicha composición inmunogénica.

41. La composición inmunogénica de acuerdo con las cláusulas 31 a 38, en donde dicha composición inmunogénica induce una respuesta inmunoprotectora contra el virus del PRRS después de la administración de una dosis de dicha composición inmunogénica.
- 5 42. La composición inmunogénica de acuerdo con las cláusulas 32 a 38, en donde dicha composición inmunogénica induce una respuesta inmunoprotectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae* después de la administración de una dosis de dicha composición inmunogénica.
43. La composición inmunogénica de acuerdo con las cláusulas 28 a 38, en donde 2 ml de dicha composición inmunogénica representan 1 dosis de dicho antígeno de PCV-2.
- 10 44. Un método para reducir uno o más síntomas clínicos de una infección por PCV-2 en un animal en comparación con un animal que no recibe dicha composición inmunogénica, que comprende la etapa de administrar a un animal dicha composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 28 a 38.
45. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 28 a 38 para reducir uno o más síntomas clínicos de una infección por PCV-2 en un animal en comparación con un animal que no recibe dicha composición inmunogénica.
- 15 46. Un método para mejorar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica contra circovirus porcino que comprende las etapas de
- a. expresar un antígeno de PCV-2 en una célula hospedadora;
 - b. recoger el antígeno de PCV-2;
 - 20 c. purificar el antígeno de PCV-2 a un grado de pureza de más de 50% (p/p) con respecto a la cantidad total de proteína incluida en la composición inmunogénica;
 - d. mezclar el antígeno de PCV-2 purificado con un adyuvante.

Listado de secuencias

- 25 <110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA INC
- <120> MÉTODOS PARA REDUCIR LA ACTIVIDAD VIRICIDA EN COMPOSICIONES PCV-2 Y COMPOSICIONES PCV-2 CON UNA INMUNOGENICIDAD MEJORADA
- 30 <130> P10-0121
- <160> 11
- <170> PatentIn version 3.3
- 35 <210> 1
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial
- 40 <220>
<223> Esta es una secuencia de Kozak modificada.
- <400> 1
- 45 ccgccatg 8
- <210> 2
<211> 6
<212> DNA
- 50 <213> Artificial
- <220>
<223> Esta es una secuencia de EcoRI modificada.
- 55 <400> 2
- gaattc 6

ES 2 657 812 T3

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

5

<400> 3

```

cagctatgac gtatccaagg aggcggtacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgcccg cggcccctggc tcgtccaccc cggccaccgc taccgttgga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccggcc tctccgcac cttcggatat actgtggaga 180
aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240
ttgttcccc ggaggggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
acctatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaactc gttcttgact ccaactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttgctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccaactaa accctaatg aat 713
    
```

10 <210> 4
 <211> 713
 <212> DNA
 <213> Circovirus porcino

15 <400> 4

```

ccgcatgac gtatccaagg aggcggtacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgcccg cggcccctggc tcgtccaccc cggccaccgc taccgttgga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccggcc tctccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
ctaccacagt cacaaacgccc tcttggcggg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
ttgttcccc ggaggggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
acctatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaactc gttcttgact ccaactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttgctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccaactga accctaagaa ttc 713
    
```

20 <210> 5
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

25 <400> 5

ES 2 657 812 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

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

5

<400> 6

ES 2 657 812 T3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
 225 230

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

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

<400> 7

gcgggccgagg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcggtaccg cagaagaaga 60
 caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcccgc gccctggct cgtccacccc 120
 15 cgccaccgct accggtggag aaggaaaaat ggcattttca acaccgcct ctcccgcacc 180
 ttcgatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgccct cctgggagggt ggacatgatg 240
 agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc 300
 tttgaatact acagaataag aaaggtaag gttgaattct ggcctgctc ccccatcacc 360
 cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag 420
 gccacagccc taacctatga cccatatgta aactactcct cccgccatac aatcccccaa 480
 cccttctect accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat 540
 tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggtgta ggctacaaac ctctagaaat 600
 gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat 660
 atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagacct cccacttgaa 720
 ccctaagaat tctatcaeta gtgaattcgc ggcgcg 756

ES 2 657 812 T3

<210> 8
 <211> 10387
 <212> DNA
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Esto es el circuvirus porcino tipo 2, construcción ORF-2, que incluye secuencias codificantes de baculovirus y pGEM T-easy.

10 <400> 8

```

aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatthtagt tgcgthtatg agataagatt 60
gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt 120
ataaaagatt ctaaatctgat atgtthttaa acacctthtg ggcccagatt gthtgcgtag 180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagatatt 240
ggagcaataa tgcattthaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca thththtgccg 300
gccggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga cthtgccgcc tgaagcata 360
gthcaagaat thattgacac ggtaaaagaa thtacagaaa agtgtcccgg catgttggtg 420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatgc accggttaca tgggtgtgag atathtaatg 480
cacaccctgg gtattgccc gcaggaagcc atagatagat tcaaaaaagc cagaggtcac 540
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat thattaatth aatthaatatt atthgcatte 600
thtaacaaat actthtctct thththcaat tghtgcccct cthccagcga accaaaaacta 660
tgcttcgctt gctccgthta gctthtagcc gatcagtgcc gthgthtcaa tccagcgttag 720
gattagcccg gatattctcc accacaatgt tggcaacgth gatgthtagt thtagcttht 780
ggtthtccac gtacgtctth tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tccgcgctca 840
cgcacaacac cggatgthtg cgtthtccc cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat 900
ccaccactth ggcaactaaa tccggtgacct gcgcgctctth thtctgcatt atthcgtctt 960
tctthtgcatt ggtthcctgg aagccggtgt acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg 1020
tgacctgcaa atctthtgcc tccgatctgct tgcctthgat ggcaacgatg cgttcaataa 1080
actctgtht thtaacaagt tccctcgtht thtgccccac caccgcttg cagcgcgtthg 1140
tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaaccaactg thtgctctcc tccctcccgtt 1200
gthtgatcgc gggatcgtac thgcccgtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa 1260
gccattcttg taattctatg gcgtaagcga atthggactt cataatcagc tgaatcacgc 1320
cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaaatagc cgggtcgcgc cthttcacga 1380
cgtgttaga ggtagggccc ccatthtggg tggctgctc aaataacgat thgtattht 1440
tgtctacatg aacacgtata gctthtctac aaactgtata ththaaactg thtagcgcgt 1500
cctthggccac gaaccggacc tghttgctgc gctctagcac gtaccgcagg thgaacgtat 1560
cttctccaaa thtaaatctt ccaatthttaa cgcgagccat thtgatacac gtgtgtcgat 1620
thtgcacaa ctatgthtth thaacgcaa ctaacttht tgtggtaaag aataatthaa 1680
tatgggggaa catgcccgcg tacaacactc gctgthttag acgcagacgg ccccggctc 1740
ggcgaacgcg gctaaaacgt gthgcccgtt caacgcggca aacatcgca aagccaatag 1800
tacagthtthg atthgcatat taacgcgat thththaaat atctthtth ataaatagth 1860
atgacgccta caactcccc cccgcgthga ctgcgtgcac ctgcagcagt tccgtgacgc 1920
cttctccgt gtggccgaac acgtcagcgg ggtggtcgat gaccagcggc gtgcccgcacg 1980
cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcca aggcacgtcg gcctccaagt 2040
ggcaatattg gcaaatctga aatatatac agthgggthg thtgccgata tctatcgtgg 2100
cgtthggcat gtacgtccga acgthgatt gcagcaagc cgaaatthaa tcatthgcat 2160
tagtgcgatt aaaacgthgt acatcctcgc ththaatcat gccgtcgatt aatcgcgca 2220
atcaggtcaa gtatcaaa tgtggaata tghtthctth gtatthcccga gthcaagcga 2280
gcccgtatth taacaaacta gccatctgt agthtagtht catthaatgc aactthtctc 2340
aataatata thgtatcgc acgtcaagaa thaacatgc gccgthgtc gcctctcaac 2400
acgactatga taggatcaa ataaagcgcg aatthaaatg cthgcccgc aacgtgcacg 2460
atctgtgcac cgtthcccgc acgagctthg atthgataaa gththttacga agcgtgaca 2520
    
```

ES 2 657 812 T3

tgacccccgt agtgacaacg atcacgcccc aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt 2580
 atgtcggtga cgttaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc 2640
 tgggtcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt 2700
 agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tattaatttg atcccgatga ttttattgat 2760
 aaattgaccc taactccata cacggtattc tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc 2820
 ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccgcccacta ttaatgaaat taaaaattcc 2880
 aattttaaaa aacgcagcaa gagaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa 2940
 aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatagctcc cgtgtataaa aaaaatattg 3000
 aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggatgt acaggaagag gtttatacta 3060
 aactgttaca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaaagtgt aaaaccgatg tttaatcaag 3120
 gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcatctttta 3180
 atcaaatccc aagatgtgta taaccacca aactgccaaa aaatgaaaac tgtcgacaag 3240
 ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata 3300
 aaaaattat aaatgctaaa tttgtttttt atlaacgata caaaccaaac gcaacaagaa 3360
 cttttgtagt attatctata attgaaaacg cgtagtata atcgctgagg taatatttaa 3420
 aatcattttc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac 3480
 tagacgcctt gtcgtctctt cttctgtatt ccttctcttt ttcatttttc tccctataaa 3540
 aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt 3600
 tgtataaata ttcatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgccc atagtttttc 3660
 tghtaatttac aacagtgcta tttctcggtg gtctctcgga gtgtgtgtct ttaattatta 3720
 aatttatata atcaatgaa ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt 3780
 acgagcttc ttctagtcca attacacat tttttagcag caccggatta acataacttt 3840
 ccaaaatggt gtacgaaccg ttaaacaaaa acagttcacc tcccttttct ataactattg 3900
 ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaaata cagccattgt aatgagacgc acaaaactaat 3960
 atcacaaact ggaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaa 4020
 gataaccatc tgcgaaata ataatgtttt tactgttttc gtaacagttt tghtaataaa 4080
 aaacctata atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgagg atcagatctg 4140
 cagcggccgc ggaatttoga tccgccatga cgtatccaa gaggcgttac cgcagaagaa 4200
 gacaccgccc ccgcagccat cttggccaga tcctccgccc ccgcccctgg ctcgtccacc 4260
 ccgcaccacc ctaccgttgg agaagaaaa atggcatctt caacaccgc ctctccgca 4320
 cctcgggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctectgggcg gtggacatga 4380
 tgagatttaa tattgacgac ttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac 4440
 cctttgaata ctacagaata agaaagttta aggttgtaatt ctggccctgc tccccatca 4500
 cccaggtgta taggggagtg ggtccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa 4560
 aggccacagc cctaacctat gacctatag taaactactc ctcccgcctt acaatcccc 4620
 aacccttctc ctaccactcc cgttacttca cacccaaac tgttcttgac tccactattg 4680
 attacttoca accaaataac aaaaggatc agctttggct gaggctacaa acctctagaa 4740
 atgtggacca cgtaggcctc ggcactgctg tcgaaaacag taaatacgac caggactaca 4800
 ataccgtgt aacctgtat gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccacttg 4860
 aaccctaaga attctatcac tagtgaattc gcggccgccc cccgctccag aattctagaa 4920
 gttaccgggg ctctttctc gggaccgggc aagaacaaaa aactcactct cttcaaggaa 4980
 atccgtaatg ttaaaccgca cacgatgaag cttgtcgttg gatggaagg aaaagagttc 5040
 tacagggaaa cttggaccog ctctcatgaa gacagcttcc ccattgttaa cgaccaagaa 5100
 gtgatgagtg ttttcttgt gtcaacatg cgtcccacta gacccaaccg ttgttacaaa 5160
 ttctctggcc aacacgctct gcgttgccag cccgactatg tacctcatga cgtgattagg 5220
 atcgtcgagc ctctcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcagcct ggctaagaag 5280
 ggcggcggct gcccaataat gaaccttca tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagttc 5340
 atcgatcgtg tcatctggga gaacttctac aagcccatcg tttacatcgg taccgactct 5400
 gctgaagagg aggaaattct ccttgaagtt tccctggtgt tcaaagtaa ggagtttgca 5460
 ccagacgcac ctctgttca cgttccggcg tattaaaaca cgatacattg ttattagtac 5520
 atttattaag cgctagattc tgtgcgttgt tgatttacag acaattgttg tacgtatttt 5580
 aataattcat taaatttata atctttaggg tggatgttta gagcgaaaat caaatgattt 5640
 tcagcgtctt tatatctgaa ttaaatattt aaatcctcaa tagatttgta aaataggttt 5700
 cgattagttt caacaagggt ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt 5760
 tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc 5820
 gtttgtggtt tgttttghta taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta 5880
 tttctttcat cactgtcgtt agtgtacaat tgactcgacg taaacacggt aaataaagct 5940
 tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattagccc gattatcgtc gtcgtcccaa 6000
 ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgcctatta 6060
 attgtgtcgg ctaaacacgtc ccgcatcaaa tttgtagttg agctttttgg aattatttct 6120
 gattgcgggc gtttttgggc ggttttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac 6180
 acgttagaaa gcgatggtgc aggcgggtgt aacatttcag acggcaaatc tactaatggc 6240
 ggcgggtgtg gagctgatga taaactacc atcgggtggag gcgcagggcg ggctggcggc 6300
 ggagggcgag gcggaggtgg tggcgggtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct 6360
 ttaggcaaca cagtcggcac ctcaactatt gtactggttt cgggcgcccgt ttttggtttg 6420


```

accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag cttccaacaa ttgttgtctg 6480
tcgtctaaag gtcagcgggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca 6540
gacatcgatg gtggtgggtg ttggtggaggc gctggaatgt taggcacggg agaaggtggt 6600
ggcggcggtg ccgccggtat aattttgtct ggtttagttt gttcgcgcac gatttggggc 6660
accggcgcgag gcgccgctgg ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcttcgagg cagcgcttgg 6720
ggtggtggca attcaatatt ataattggaa tacaaatcgt aaaaatctgc tataagcatt 6780
gtaatttcgc tatcgtttac cgtgccgata ttaacaaccc gctcaatgta agcaattgta 6840
ttgtaaaagag attgtctcaa gctcgcgcga cgccgataaac aagccttttc atttttacta 6900
cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgacgta catgtatgct ttgttgtcaa 6960
aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt 7020
tgtcgtaaat gttgtttttg ataatttgcg cttccgcagt atcgacagct tcaaaaaatt 7080
gatgcgcctc aattttgttg ttctatttat tgaataaata agattgtaca gattcatatc 7140
tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgtcgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200
actgcaaaaa cgtcaaaact cgttataaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta 7260
ttttatcgca caagccact agcaaatgtt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt 7320
ttaacgctga cgaataaaaa gttcaccagt taatgagcga ccacccaaat tttataaaaa 7380
tctattttaa tcacggttcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc 7440
ccgatttatt tgaaacacta caaattaaag gcgagcttcc gtaccaactt gttagcaata 7500
ttattagaca gttgtttttg gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg 7560
acataaaaact cgaaaatgct ttatatctcg aagcacttga tcgctgtgat gtttgcgatt 7620
acggatttgg caaacacgaa aactcactta gcgctgacga cggcaccgtt gagtattttt 7680
gtccggaaaa aattcgacac caaactatgc acgtttcgtt tgactggtac gcggcgtgtt 7740
aacatacaag ttgctaacgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 7800
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaaagcct ggggtgccta 7860
atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 7920
ccgtcgtgce cagctcgatt aatgaatcgg ccaacgcgcy gggagagggc gtttcgctat 7980
tgggcgctct tccgcttcc cgtcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 8040
agcggtatca gctcactcaa agcgggtaat acggttatcc acagaatcag gggataaocg 8100
aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt 8160
gctggcgttt ttccatagcg tcgccccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8220
tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8280
cctcgtgccc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc 8340
ttcgggaagc gttggccttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt 8400
cgttcgtccc aagctgggct gtgtgcacga acccccctgt cagcccagcc gctgcccctt 8460
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8520
agccactggt aacaggatta gcagagcgg gtatgtaggg ggtgctacag agttctttaa 8580
ttggtggcct aactacgctt caactagaag gacagtattt ggtatctggc ctctcgtgaa 8640
gccagttacc ttcggaaaaa gaggttgtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg 8700
tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 8760
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt aacgaaaact cacgttaagg 8820
gattttgttc atgagttat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 8880
aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaactgg tctgacagtt accaatgctt 8940
aatcagtgag gcaactatct cagcgatctg tctatctcgt tcatccatag ttgctgact 9000
ccccgtcgtg tagataaact cgatacggga gggcttacc tctggcccca gtgctgcaat 9060
gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9120
aaggcccgag ccgagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaatg 9180
ttgcccggaa gctagagtaa gtatgtcggc agttaatagt ttgcccagc ttgttgccat 9240
tgctacagge atcgtggtgt cagcctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtc 9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttctgc aaaaaagcgg ttagctcctt 9360
cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 9480
gtactcaacc aagtcatctt gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 9540
gtcaatacgg gataatacgg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 9600
acgttctctg gggcgaaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga 9660
accactcgt gccaccact gatcttcagc atctttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg 9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 9840
gagcggatac atabttgaa gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgccacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcacgagge cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaaact 10020
ctgacacatg cagctcccgg agacggctcac agcttctctg taagcggatg ccgggagcag 10080
acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtcca ccatatcggg tgtgaaatac cgcacagatg 10200
cgtaaaggaga aaataccgca tcaggcgcga ttccgcttcc aggctgcgca actgttggga 10260
aaggcgatcg gtgcgggctt cttcgtctat acgccagctg gcgaaaaggg gatgtgctgc 10320
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtcg cgacggttga aaacgacggc 10380
cagtgcc

```

10387

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

- 10 <400> 9

ES 2 657 812 T3

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

His Leu Gly Gln
 20

<210> 10

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 10

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

10 Thr Leu Ser

<210> 11

<211> 233

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

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

20 <400> 11

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 812 T3

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición antigénica de PCV-2 que comprende las etapas de:
- i) obtener un primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2 que comprende partículas similares a virus de la proteína ORF-2; y
- 5 ii) separar al menos una porción del primer líquido del antígeno de PCV-2 que comprende partículas similares a virus de la proteína ORF-2
- mediante una etapa de filtración que utiliza un filtro, en donde el filtro incluye una membrana semipermeable que tiene un tamaño de poro promedio que es más pequeño que el antígeno de PCV-2 para evitar así el paso de al menos 90% del antígeno de PCV-2 a través de los poros de la membrana semipermeable y retener el antígeno de PCV-2 dentro del filtro, en donde la porción del primer líquido se separa del antígeno de PCV-2 mediante un intercambio de la porción del primer líquido contra un segundo líquido, donde el segundo líquido es diferente del primer líquido, y en donde el intercambio de la porción del primer líquido con el segundo líquido comprende las etapas de:
- 10 a) adición de líquido que comprende añadir el segundo líquido al primer líquido que contiene el antígeno de PCV-2; y
- b) concentración del antígeno de PCV-2 de 3X a 50X en comparación con el volumen del primer líquido por separación de una porción del primer y segundo líquidos; y
- 15 iii) mezclar el antígeno de PCV-2 que queda después de la etapa ii) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vehículos, adyuvantes, diluyentes, excipientes y combinaciones farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan sustancialmente de forma simultánea.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa de concentración y la etapa de adición de líquido se realizan al menos dos veces.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el filtro tiene un tamaño medio de poro que impide el paso de al menos 90% de proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamaño.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la actividad virídica de la composición antigénica de PCV-2 se reduce en al menos 10% en comparación con el líquido que no se ha sometido al método.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición antigénica de PCV-2 producida por las etapas i) a ii) causa una pérdida de menos de 1 log TCID₅₀ por ml de un virus vivo o de menos de 1 log CFU por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezcla con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 o más horas.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición antigénica de PCV-2 producida por las etapas i) a ii) causa una pérdida de menos de 0,7 log TCID₅₀ por ml de virus vivo o de menos de 0,7 log CFU por ml de una bacteria viva, cuando el virus vivo o la bacteria viva se mezcla con la composición antigénica de PCV-2 durante 2 o más horas.
- 35 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el método comprende además la etapa de recoger el antígeno de PCV-2 que queda después de la etapa ii).
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el método comprende además la etapa de purificar la cosecha de la etapa ii) que comprende el antígeno de PCV-2, por procedimiento cromatográfico.
- 40 10. El método según la reivindicación 9, en donde el antígeno de PCV-2 se purifica hasta un grado de pureza del antígeno de PCV-2 de más del 50% (p/p) con referencia a la cantidad total de proteína.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el componente adicional es un adyuvante.
- 45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el adyuvante es Carbomer.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el método comprende adicionalmente la etapa de combinar la composición antigénica de PCV-2 con al menos un antígeno adicional.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el al menos un antígeno adicional incluye antígeno de Virus de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino y/o antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

FIG. 1

