

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 483**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2013 PCT/US2013/035091**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13152086**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2013 E 13717118 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 2833909**

54 Título: **Vacuna de combinación CVP/Mycoplasma hyopneumoniae/SRRP**

30 Prioridad:

04.04.2012 US 201261620189 P

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

10.07.2019

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**NITZEL, GREGORY P.;
GALVIN, JEFFREY E.;
GARRETT, JOHN KEITH;
KULAWIK, JAMES R. II;
RICKER, TRACY L. y
SMUTZER, MEGAN MARIE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 719 483 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

Vacuna de combinación CVP/Mycoplasma hyopneumoniae/SRRP

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al circovirus porcino, a *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae* o M.hyo) y al virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP). Más particularmente, la invención se refiere a una composición inmunogénica trivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (CVP2); y un antígeno del virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), en el que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) 10 inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina y a su uso en una vacuna para proteger a los cerdos contra al menos la neumonía enzoótica y el Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Post-destete (SMAP).

Antecedentes de la invención

15 La neumonía enzoótica en porcinos, también denominada neumonía micoplasmática, está causada por M.hyo. La enfermedad es una enfermedad crónica no mortal que afecta a cerdos de todas las edades. Los cerdos infectados muestran solamente signos suaves de tos y fiebre, pero la enfermedad tiene un impacto económico significativo debido a la eficiencia de alimentación reducida y a la ganancia de peso reducida. La neumonía enzoótica se transmite de cerdo a cerdo a través de los pasajes nasales por los organismos transportados por el aire expulsados desde los pulmones de cerdos infectados. La infección primaria por M.hyo puede estar seguida de la infección 20 secundaria por otras especies de micoplasma (*Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma flocculare*) así como otros patógenos bacterianos.

M.hyo es un microbio pequeño procarionta capaz de una existencia de vida libre, aunque a menudo se encuentra en asociación con células eucariotas debido a que tiene requisitos absolutos de esteroides y ácidos grasos exógenos. Estos requisitos necesitan generalmente el crecimiento en medio que contiene suero. M.hyo está delimitada por una 25 membrana celular, pero no por una pared celular.

La asociación física de los micoplasmas con la superficie celular del hospedador es la base para el desarrollo y la persistencia de la neumonía enzoótica. M.hyo infecta el tracto respiratorio de los porcinos, colonizando la tráquea, los bronquios y los bronquiolos. El micoplasma produce un factor ciliostático que provoca que los cilios que revisten los pasajes respiratorios dejen de golpear. Finalmente, los cilios se degeneran, dejando al cerdo propenso a la 30 infección por patógenos secundarios. En animales infectados se observan lesiones características de áreas de consolidación moradas a grises. Los reconocimientos de los animales sacrificados revelaron lesiones en el 30 al 80 % de los porcinos. Los resultados de 37 piaras en 13 estados indicaron que el 99 % de las manadas tenían cerdos con lesiones de neumonía típicas de la neumonía enzoótica. Por lo tanto, la necesidad de medidas preventivas eficaces y de tratamiento es grande.

35 Los antibióticos tales como la tiamulina, el trimetoprim, las tetraciclinas y la lincomicina tienen algún beneficio, pero son caros y requieren su uso prolongado. Adicionalmente, los antibióticos no han demostrado eliminar eficazmente la propagación o la reinfección de M.hyo. La prevención manteniendo las manadas libres de patógenos a veces es posible pero a menudo se produce la reintroducción de M.hyo. Debido a las consecuencias económicas graves de la neumonía porcina, se han buscado vacunas contra M.hyo. Se han comercializado vacunas que contienen preparaciones de organismos micoplásmicos crecidos en medio que contiene suero, pero plantean preocupaciones con respecto a las reacciones adversas inducidas por los componentes séricos (tales como inmunocomplejos o 40 proteínas específicas no inmunogénicas) presentes en el material inmunizante. Otros intentos de proporcionar vacunas de M. hyo han sido exitosos, pero la enfermedad sigue siendo generalizada. Una vacuna basada en el sobrenadante de un cultivo de M.hyo se ha desvelado en Okada M. y col., 2000, Vaccine, 18: 2825-2831. El documento WO 2009/126356 desvela composiciones multivalentes que comprenden antígenos de *M. hyo* y CVP2. Un ejemplo muestra la vacunación de lechones con una única dosis de una mezcla de tres vacunas: Ingelvac® MycoFLEX™, Ingelvac® PRRS MLV™ e Ingelvac® CircoFlex™.

M.hyo y el circovirus porcino tipo 2 (CVP2) son los dos patógenos más prevalentes que se encuentran en la industria del cerdo. Los porcinos infectados con CVP2 exhiben un síndrome comúnmente denominado Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Post-destete (SMAP). El SMAP se caracteriza clínicamente por adelgazamiento, 50 palidez de la piel, desnutrición, dificultad respiratoria, diarrea, ictericia y piel amarillenta. Además de SMAP, el CVP2 se ha asociado a diversas infecciones distintas incluyendo seudorrabia, síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis post-destete, hepatitis dietética y bronconeumonía supurativa. M.hyo se asocia a la neumonía enzoótica y también ha estado implicada como uno de los cofactores principales en el desarrollo de Enfermedad Asociada a Circovirus Porcino (EACVP). 55

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP) está provocado por un arterivirus, que tiene una afinidad particular por los macrófagos, particularmente aquellos encontrados en el pulmón (macrófagos alveolares). Estos macrófagos ingieren y eliminan bacterias y virus invasores, pero no en el caso del virus del SRRP (VSRRP). En el

caso del virus del SRRP, se multiplica dentro de los macrófagos produciendo más virus y mata a los macrófagos. Una vez que el VSRRP ha entrado en una piara, tiende a permanecer presente e indefinidamente activo. Se destruye hasta el 40 % de los macrófagos, lo que permite a las bacterias y a otros virus proliferar y realizar daños. Un ejemplo común de esto es el aumento notable en la gravedad de la neumonía enzoótica en unidades de crecimiento/de acabado cuando se infectan con el VSRRP. Más de la mitad de los cerdos negativos al virus de SRRP en edad de destete se infectan antes de ir al mercado. Lo que se necesita es una vacuna trivalente CVP2/M.hyo/SRRP contra la infección por CVP2, *Mycoplasma* y VSRRP en porcinos. Sería altamente deseable proporcionar una vacuna trivalente monodosis. Preferentemente, el componente CVP2/M.hyo de la vacuna se proporcionaría como una lista para su uso en una composición líquida embotellada que pueda combinarse fácilmente con el componente VSRRP de tal manera que todos los antígenos puedan administrarse al cerdo simultáneamente.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición inmunogénica trivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (CVP2); y un antígeno del virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), en el que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina. En un aspecto, la porción soluble de la preparación de células completas de M.hyo se ha tratado con proteína A o proteína G antes de añadirse a la composición inmunogénica. En un aspecto adicional, la porción soluble de la preparación de M.hyo y el antígeno CVP2 están en forma de una composición líquida lista para su uso.

En una realización, el antígeno del virus de SRRP es un virus vivo modificado genéticamente. En otra realización, el virus de SRRP vivo modificado genéticamente está en forma de una composición liofilizada.

La preparación de M.hyo incluye antígenos proteicos de M.hyo.

En una realización, el antígeno de CVP2 está en forma de un circovirus quimérico tipo 1-tipo 2, incluyendo el virus quimérico un circovirus porcino tipo 1 recombinante inactivado que expresa la proteína ORF2 del circovirus porcino tipo 2. En otra realización, el antígeno de CVP2 está en forma de una proteína ORF2 recombinante. En aún otra realización, la proteína ORF2 recombinante se expresa a partir de un vector de baculovirus.

En algunas realizaciones, la composición trivalente de la presente invención provoca una respuesta inmune protectora contra M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP. En otras realizaciones, la composición inmunogénica de la presente invención incluye además al menos un antígeno adicional. En una realización, el al menos un antígeno adicional es protector contra un microorganismo que puede provocar enfermedad en cerdos.

En una realización, el microorganismo incluye bacterias, virus o protozoos. En otra realización, el microorganismo se selecciona de, pero no se limita a, los siguientes: parvovirus porcino (PVP), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, bacterias leptospira, *Lawsonia intracellularis*, virus de la gripe porcina (VGP), antígeno de *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus respiratorio porcino, virus de la Diarrea Epidémica Porcina (DEP), rotavirus, virus torque teno (VTT), Citomegalovirus porcino, enterovirus porcinos, virus de la Encefalomiocarditis, un patógeno causante de la Enfermedad de Aujeszky, de la Fiebre porcina clásica (FPC) y un patógeno causante de la Gastroenteritis transmisible porcina o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición de la presente invención incluye además un adyuvante. En una realización, el adyuvante se selecciona de, pero no se limita a, los siguientes: un adyuvante de aceite en agua, un adyuvante de polímero y agua, un adyuvante de agua en aceite, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un adyuvante de vitamina E y combinaciones de los mismos. En otra realización, la composición de la presente invención incluye además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención provoca una respuesta inmune protectora contra M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP cuando se administra como una administración monodosis.

La presente invención también proporciona un procedimiento de inmunización de un cerdo contra M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP. Este procedimiento incluye administrar al cerdo una composición inmunogénica trivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (CVP2); y un antígeno del virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), en el que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina.

En una realización del procedimiento de la presente invención, la composición trivalente se administra por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía transdérmica o por vía subcutánea. En otra realización del procedimiento de la presente invención, la composición trivalente se administra en una dosis única.

En una realización adicional, la composición se administra a los cerdos que tienen anticuerpos derivados maternos contra al menos uno de M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP. En aún una realización adicional, la composición se administra a los cerdos que tienen anticuerpos derivados maternos contra M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP.

En una realización, la composición se administra a los cerdos a 3 semanas de edad o más mayores.

5 La presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención. Este procedimiento incluye i) cultivar M.hyo en un medio adecuado durante periodos que varían de 18-144 horas; ii) posteriormente inactivar el cultivo de M. hyo; iii) cosechar el fluido de cultivo inactivado, en el que el fluido de cultivo inactivado comprende tanto una fracción líquida soluble como un material celular insoluble; iv) separar la fracción líquida soluble del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación; v) retirar sustancialmente tanto la IgG como los inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina de la fracción líquida soluble separada para formar el sobrenadante de cultivo de M. hyo libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina; y vi) posteriormente combinar el sobrenadante con un antígeno de CVP2 y un antígeno del virus de SRRP. En una realización, la etapa vi) incluye combinar una composición líquida lista para su uso que comprende tanto el antígeno de CVP2 como la porción soluble de M.hyo con un antígeno del virus de SRRP liofilizado.

En una realización, un kit de acuerdo con la presente invención incluye un primer frasco (u otro receptáculo adecuado) que comprende una composición que incluye tanto un antígeno del CVP2 como el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); en el que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina; y un segundo frasco que contiene el antígeno del virus de SRRP. En una realización, la composición del primer frasco se proporciona como una composición líquida lista para su uso. Opcionalmente, el componente antígeno del virus de SRRP del kit está en forma de una composición liofilizada. En otra realización, el kit incluye un manual de instrucciones con directrices para combinar los contenidos del primer frasco con los contenidos del segundo frasco. En aún otra realización, el manual de instrucciones incluye además directrices para administrar los contenidos combinados del primer y el segundo frascos a un cerdo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la efectividad de vacunas monovalentes de M.hyo preparadas con antígenos de M.hyo de diferentes tratamientos (T02-T10 descritos en el Ejemplo 3) frente a un placebo (T01). Los resultados se presentan como valores de % de lesión pulmonar de media de mínimos cuadrados.

30 La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de potencia de antígeno de CVP2 (ELISA de antígeno de CVP2) de vacunas de M.hyo en combinación con el virus quimérico CVP Tipo 1-Tipo 2 muerto. El virus quimérico se incluyó en las composiciones a un nivel inicial de aproximadamente $1,6 \leq PR$. El estado de cada muestra se expresa como potencia relativa (PR).

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de viremia de CVP2 (PCR cuantitativa de CVP2) observados con formulaciones de vacuna de CVP/M.hyo que emplean diferentes plataformas adyuvantes.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados serológicos (S/P) del ELISA de anticuerpo de CVP2 observados con formulaciones de vacuna de CVP/M.hyo que emplean diferentes plataformas adyuvantes los días 1, 20 y 42 de la prueba de provocación.

40 La Figura 5 es un gráfico que muestra la diseminación fecal de CVP2 obtenida con los tratamientos T02-T04 descritos en el Ejemplo 7 frente a un placebo (T01). Los resultados se expresan como copias de ADN de CVP2/ml.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la diseminación fecal de CVP2 obtenida con los tratamientos T02-T04 descritos en el Ejemplo 7 frente al placebo (T01). Los resultados se expresan como copias de ADN de CVP2/ml.

45 La Figura 7 (A & B) son gráficos que muestran los resultados de un ensayo de interferón gamma (IFN- γ) que mide las respuestas inmunes mediadas por células (IMC) específicas de CVP2. Los resultados de post-vacunación/pre-prueba de provocación se presentan en la Figura 7A y los resultados de post-vacunación/pre-desafío se presentan en la Figura 7B. La estimulación de 5×10^6 células se consideró significativa.

La Figura 8 representa la efectividad de M.hyo de las formulaciones de vacuna experimental de CVP2/M.hyo en aceite SP. Las puntuaciones de pulmón para las formulaciones que emplean los tratamientos T02-T08 de M.hyo frente a un placebo (T01) se representan gráficamente en la Figura 8A. La tabla en la Figura 8B representa el contraste de los tratamientos T02-T08 con el placebo.

La Figura 9 es un diagrama de flujo que muestra una realización de un procedimiento de fabricación usado para preparar un antígeno de M.hyo tratado con Proteína A compatible con el CVP2.

La Figura 10 es una tabla que muestra la evaluación del adyuvante para la actividad viricida contra el virus del

SRRP.

La Figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de viremia de CVP2 (PCR cuantitativa de CVP2) observados con formulaciones de vacuna experimental de CVP2/M.hyo/SRRP.

5 La Figura 12 es un gráfico que muestra los resultados del ELISA de CVP2 observados con formulaciones de vacuna experimental de CVP2/M.hyo/SRRP los días -1, 7, 13, 20, 28, 35 y 42 del estudio (la prueba de provocación fue el día 21).

La Figura 13 es un gráfico que muestra la diseminación fecal de CVP2 obtenida con los tratamientos T02 y T03 (formulaciones de vacuna experimental de CVP2/M.hyo/SRRP) descritos en el Ejemplo 14 frente al placebo (T01).

10 **Breve descripción de las secuencias**

SEQ ID NO: 1 es una realización de una secuencia de nucleótidos que codifica p46 a partir de la cepa P-5722 de M.hyo;

SEQ ID NO: 2 es una realización de una secuencia de aminoácidos que codifica p46 a partir de la cepa P-5722 de M.hyo;

15 SEQ ID NO: 3 es una realización de una secuencia de nucleótido que codifica p97 a partir de la cepa P-5722 de M.hyo;

SEQ ID NO: 4 es una realización de una secuencia de aminoácidos que codifica p97 a partir de la cepa P-5722 de M.hyo;

SEQ ID NO: 5 es una realización de una secuencia genómica que codifica un virus CVP1-2 quimérico;

20 SEQ ID NO: 6 es una realización de una secuencia de nucleótidos que corresponde a la ORF2 de un circovirus porcino;

SEQ ID NO: 7 es una realización de una secuencia de aminoácidos que codifica el polipéptido ORF2 de un circovirus porcino;

SEQ ID NO: 8 es una realización de una secuencia genómica que codifica un virus CVP1-2 quimérico;

25 SEQ ID NO: 9 es una realización de una secuencia de nucleótidos que corresponde a la ORF2 de un circovirus porcino;

SEQ ID NO: 10 es una realización de una secuencia de aminoácidos que codifica el polipéptido ORF2 de un circovirus porcino;

30 SEQ ID NO: 11 es una realización de una secuencia de aminoácidos que codifica el polipéptido ORF2 de un circovirus porcino;

SEQ ID NO: 12 es una realización de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

SEQ ID NO: 13 es una realización de una secuencia de aminoácidos que codifica el polipéptido ORF2 de un circovirus porcino;

35 SEQ ID NO: 14 es una realización de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

SEQ ID NO: 15 es una realización de una secuencia de aminoácidos que codifica el polipéptido ORF2 de un circovirus porcino;

40 SEQ ID NO: 16 es una realización de una secuencia genómica de una forma no virulenta del aislado del virus del SRRP norteamericano designado P129; y

SEQ ID NO: 17 es una realización de una secuencia de nucleótidos que corresponde a la ORF2 a ORF5 del aislado del VSRRP designado ISU-55.

SEQ ID NO: 18 es una realización de una secuencia de nucleótidos que corresponde a la ORF6 y la ORF7 del aislado del VSRRP designado ISU-55.

45 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona una composición inmunogénica trivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (CVP2); y un antígeno del virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), en el que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina. En una realización, la composición trivalente provoca una respuesta inmune en un cerdo contra el CVP2, M.hyo y el virus de SRRP.

55 Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que la fracción insoluble de la preparación de célula entera de M.hyo no es inmunogénica. Por el contrario, la preparación soluble de M.hyo libre de IgG es inmunogénica y puede combinarse eficazmente con antígenos de otros patógenos, tales como el CVP2 y el VSRRP, sin interferencia analítica o inmunológica entre los antígenos. Esto hace a la preparación soluble de M.hyo una plataforma eficaz para las vacunas multivalentes de esta invención. Los solicitantes han descubierto sorprendentemente también que retirar la inmunoglobulina y los restos celulares insolubles de la preparación de M.hyo potencia la seguridad de la composición inmunogénica.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular "un/una", "uno/una" y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un antígeno proteico" incluye una pluralidad de antígenos proteicos, incluyendo mezclas de los mismos.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y los procedimientos incluyen los elementos recitados, pero no excluyen otros elementos.

10 Como se define en el presente documento, una porción soluble de una preparación de células enteras de M.hyo se refiere al sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); en el que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina. La fracción del sobrenadante incluye proteínas solubles expresadas de M.hyo (antígenos proteicos de M.hyo) que se han separado o aislado de las proteínas insolubles, de las bacterias enteras y de otro material celular insoluble de M.hyo por los medios convencionales de centrifugación, filtración o precipitación. Además de incluir proteínas solubles específicas de M.hyo, la porción soluble de la preparación de células enteras de M.hyo también incluye proteínas heterólogas, tales como aquellas contenidas en el medio de cultivo usado para la fermentación de M.hyo.

15 El término "antígeno" se refiere a un compuesto, una composición o una sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o de una respuesta de linfocitos T, o ambas, en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmune puede generarse para la molécula entera o para una porción de la molécula (por ejemplo, un epitopo o hapteno).

20 Como se define en el presente documento, una "composición inmunogénica o inmunológica", se refiere a una composición de materia que comprende al menos un antígeno que provoca una respuesta inmunológica en el hospedador de una respuesta inmune celular y o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés.

25 La expresión "respuesta inmune" como se usa en el presente documento se refiere a una respuesta provocada en un animal. Una respuesta inmune puede referirse a inmunidad celular (IMC); a inmunidad humoral o puede implicar ambas. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmune. Habitualmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción o la activación de anticuerpos, de linfocitos B, de linfocitos T cooperadores, de linfocitos T supresores y/o de linfocitos T citotóxicos y/o de linfocitos T yd, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el hospedador mostrará bien una respuesta inmunológica terapéutica o bien protectora de tal manera que la resistencia a la nueva infección se potenciará y/o la gravedad clínica de la enfermedad se reducirá. Tal protección se demostrará bien mediante una reducción o una carencia de síntomas normalmente mostrados por un hospedador infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o bien un título vírico disminuido en el hospedador infectado.

30 Como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" significa capaz de producir una respuesta inmune en un animal hospedador contra un antígeno o antígenos. Esta respuesta inmune forma la base de la inmunidad protectora provocada por una vacuna contra un organismo infeccioso específico.

35 Un "adyuvante" como se usa en el presente documento significa una composición comprendida por una o más sustancias que potencia la respuesta inmune a un antígeno o antígenos. El mecanismo de cómo funciona un adyuvante no se conoce enteramente. Se cree que algunos adyuvantes potencian la respuesta inmune liberando lentamente el antígeno, mientras que otros adyuvantes son fuertemente inmunogénicos en su propio derecho y se cree que funcionan sinérgicamente.

40 Como se usa en el presente documento, el término "multivalente" significa una vacuna que contiene más de un antígeno ya sea de la misma especie (es decir, diferentes aislados de *Mycoplasma hyopneumoniae*), de una especie diferente (es decir, aislados tanto de *Pasteurella hemolytica* como de *Pasteurella multocida*) o una vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* y *Clostridium*).

El término "cerdo" o "lechón" como se usa en el presente documento significa un animal de origen porcino, mientras que "cerda" se refiere a una hembra de edad y capacidad reproductivas. Una "cerda joven" es un cerdo hembra que nunca ha estado preñada.

50 Como se usa en el presente documento, el término "virulento" significa un aislado que retiene su capacidad de ser infeccioso en un animal hospedador.

55 "Vacuna inactivada" significa una composición de vacuna que contiene un organismo o patógeno infecciosos que no son capaces de replicación o de crecimiento. El patógeno puede ser de origen bacteriano, vírico, de protozoo o fúngico. La inactivación puede lograrse mediante una diversidad de procedimientos incluyendo congelación-descongelación, tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con timerosal o formalina), someter a ultrasonidos, radiación, calor o cualquier otro medio convencional suficiente para evitar la replicación o el crecimiento del organismo manteniendo su inmunogenicidad.

El término "variante" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido, que tiene una o más variaciones de aminoácidos conservativas u otras modificaciones minoritarias de tal manera que el polipéptido correspondiente tiene una función sustancialmente equivalente cuando se compara con el polipéptido de tipo silvestre.

5 "Variación conservativa" denota el reemplazamiento de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar o el reemplazamiento de un nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos de tal manera que el resto de aminoácido codificado no cambie o sea otro resto biológicamente similar. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un resto hidrófobo, tales como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro resto hidrófobo o la sustitución de un resto polar, tales como la sustitución de lisina por arginina, ácido aspártico por ácido glutámico o asparagina por glutamina y similares. La expresión "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido con la condición de que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

10 Como se usa en el presente documento, las expresiones "portador farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables y se refieren a un vehículo fluido para contener antígenos de vacuna que pueden inyectarse a un hospedador sin efectos adversos. Los portadores farmacéuticamente activos adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa o soluciones tamponadas. Los portadores pueden incluir agentes auxiliares incluyendo, pero no limitados a, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes de pH, aditivos potenciadores de la viscosidad, colores y similares.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "composición de vacuna" incluye al menos un antígeno o inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inducir una respuesta inmune en un hospedador. Las composiciones de vacuna pueden administrarse en dosificaciones y por técnicas bien conocidas para aquellos expertos en la materia médica o veterinaria, teniendo en consideración tales factores como la edad, el sexo, el peso, la especie y la condición del animal receptor y la vía de administración. La vía de administración puede ser percutánea, a través de administración mucosa (por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal) o a través de una vía parenteral (intradérmica, transdérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). Las composiciones de vacuna pueden administrarse solas o pueden co-administrarse o administrarse secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Las formas de administración pueden incluir suspensiones, jarabes o elixires y preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable) tales como suspensiones o emulsiones estériles. Las composiciones de vacuna pueden administrarse como un pulverizador o mezcladas en comida y/o agua o administradas en mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuados tales como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH, adyuvantes, aditivos potenciadores de la gelificación o la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colores y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseadas. Los textos farmacéuticos convencionales, tales como "Remington's Pharmaceutical Sciences", 1990 pueden consultarse para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación indebida.

20 "Virus del SRRP norteamericano" significa cualquier virus del SRRP que tenga características genéticas asociadas al aislado del virus del SRRP norteamericano, tales como, pero no limitados al virus del SRRP que se aisló en primer lugar en los Estados Unidos alrededor de inicios de los 90 (véase, por ejemplo, Collins, J. E., y col., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); aislado MN-1b del virus del SRRP norteamericano (Kwang, J. y col., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); la cepa LAF-exp91 de Quebec del VSRRP (Mardassi, H. y col., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); y el aislado VR 2385 del virus del SRRP norteamericano (Meng, X.-J y col., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Algunos ejemplos adicionales de cepas de virus del SRRP norteamericano se describen en el presente documento. Las características genéticas se refieren a la similitud de la secuencia de nucleótidos y la similitud de la secuencia de aminoácidos compartidas por las cepas del virus del SRRP norteamericano. Las cepas del virus del SRRP chino evidencian en general aproximadamente un 80-93 % de similitud de la secuencia de nucleótidos con las cepas norteamericanas.

25 "Virus del SRRP europeo" se refiere a cualquier cepa del virus del SRRP que tiene las características genéticas asociadas al virus del SRRP que se aisló en primer lugar en Europa alrededor de 1991 (véase, por ejemplo, Wensvoort, G., y col., 1991, Vet. Q. 13:121-130). El "virus del SRRP europeo" también se denomina a veces en la técnica "virus de Lelystad". Algunos ejemplos adicionales de cepas de virus del SRRP europeo se describen en el presente documento.

30 Un virus modificado genéticamente está "atenuado" si es menos virulento que su cepa parental no modificada. Una cepa es "menos virulenta" si muestra una disminución estadísticamente significativa en uno o más parámetros que determinan la gravedad de la enfermedad. Tales parámetros pueden incluir el nivel de viremia, fiebre, la gravedad de la dificultad respiratoria, la gravedad de los síntomas reproductivos o el número o la gravedad de lesiones pulmonares, etc.

35 Un "clon infeccioso" es un genoma aislado o clonado del agente de enfermedad (por ejemplo, virus) que puede modificarse específicamente y a propósito en el laboratorio y después usarse para recrear el organismo modificado

genéticamente vivo. Un virus modificado genéticamente vivo producido a partir del clon infeccioso puede emplearse en una vacuna vírica viva. Como alternativa, las vacunas de virus inactivados pueden prepararse tratando el virus vivo derivado del clon infeccioso con agentes inactivantes tales como formalina o disolventes hidrófobos, ácidos, etc., mediante irradiación con luz ultravioleta o rayos X, mediante calentamiento, etc.

- 5 Todas las vacunas de M.hyo y de combinación de M.hyo actualmente disponibles se fabrican a partir de preparaciones de micoplasma de células enteras muertas (bacterinas). Por el contrario, la presente invención emplea el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (CVP2); y un antígeno del virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), en el que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina.

15 M.hyo tiene requisitos absolutos de esteroides y ácidos grasos exógenos. Estos requisitos necesitan generalmente el crecimiento de M.hyo en medio que contiene suero, tales como suero porcino. La separación del material insoluble de la porción soluble de la preparación de células enteras de M.hyo (por ejemplo, por centrifugación, por filtración o por precipitación) no retira la IgG o los complejos inmunes porcinos. En una realización de la presente invención, la porción soluble de M.hyo se trata con proteína A o proteína G para retirar sustancialmente la IgG y los complejos inmunes contenidos en el sobrenadante del cultivo. En esta realización, se entiende que el tratamiento de proteína A se produce después de la fermentación de M.hyo. Esto se denomina alternativamente en el presente documento tratamiento de proteína A corriente abajo. En otra realización, puede emplearse el tratamiento de proteína A corriente arriba del medio de crecimiento (es decir, antes de la fermentación de M.hyo). La proteína A se une a la porción Fc de la IgG. La proteína G se une preferencialmente a la porción Fc de la IgG, pero también puede unirse a la región Fab. Los procedimientos de purificación/retirada de la IgG total de las mezclas de proteínas brutas, tales como el sobrenadante de cultivo tisular, el suero y el fluido de ascitis se conocen en la técnica.

La porción soluble de la preparación de M.hyo incluye antígenos proteicos de M.hyo.

- 25 La fracción de sobrenadante de M.hyo incluye al menos antígenos proteicos de M.hyo de pesos moleculares de aproximadamente 46 kDa (p46), 64kDa (p64) y 97kDa (p97). La proteína M.hyo de aproximadamente 64 kDa (p64) puede denominarse alternativamente en el presente documento el antígeno de superficie p65 de M.hyo descrito por Kim y col. [Infect. Immun. 58(8):2637-2643 (1990)], así como en la Patente de EE.UU. n.º 5.788.962.

30 Futo y col. describieron la clonación y la caracterización de una proteína de superficie de 46 kDa de M.hyo, que puede emplearse en las composiciones de la presente invención [J. Bact 177: 1915-1917 (1995)]. En una realización, el sobrenadante del cultivo de M.hyo incluye la p46 cuyas secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes de la cepa P-5722 se exponen en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Se contempla además que las variantes de tales secuencias de p46 puedan emplearse en las composiciones de la presente invención, como se describe a continuación.

35 Zhang y col. describieron y caracterizaron una proteína adhesina p97 de M.hyo [Infect. Immun. 63: 1013-1019, 1995]. Adicionalmente, King y col. describieron una proteína de 124 kDa denominada Mhp1 de la cepa P-5722 de M.hyo y presentaron datos sugiriendo que Mhp1 y p97 son la misma proteína [Vaccine 15:25-35 (1997)]. Tales proteínas p97 pueden emplearse en las composiciones de la presente invención. En una realización, el sobrenadante del cultivo de M.hyo incluye la p97 cuyas secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes de la cepa P-5722 se exponen en las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente. Se contempla además que las variantes de tales secuencias de p97 puedan emplearse en las composiciones de la presente invención, como se describe a continuación.

45 El sobrenadante del cultivo de M.hyo puede incluir además antígenos proteicos específicos de M.hyo tales como, pero no limitados a, proteínas de aproximadamente 41 kDa (p41), 42 kDa (p42), 89 kDa (p89) y 65 kDa (p65). Véanse, Okada y col., 2000, J. Vet. Med. B 47:527-533 y Kim y col., 1990, Infect. Immun. 58(8):2637-2643. Además, el sobrenadante del cultivo de M.hyo puede incluir antígenos proteicos específicos de M.hyo de aproximadamente 102 kDa (p102) y 216 kDa (p216). Véanse, las patentes de EE.UU. n.º 6.162.435 y 7.419.806 de Minnion y col.

50 Cualquier cepa de M.hyo puede usarse como un material de partida para producir la porción soluble de la preparación de M.hyo de las composiciones de la presente invención. Las cepas adecuadas de M.hyo pueden obtenerse de fuentes comerciales o académicas, incluyendo depositarios tales como la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.) y la NRRL Culture Collection (Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Ill.). La ATCC sola lista las siguientes seis cepas de M.hyo a la venta: M.hyo ATCC 25095, M.hyo ATCC 25617, M.hyo ATCC 25934, M.hyo ATCC 27714, M.hyo ATCC 27715 y M.hyo ATCC 25934D. Una cepa preferida de M.hyo para su uso en las realizaciones de la presente invención se identifica como cepa P-5722-3, ATCC n.º 55052, depositada el 30 de mayo de 1990 conforme a las reglas de accesibilidad requeridas por la Oficina de Patentes y Marcas de EE.UU. En vista de la diseminación generalizada de la enfermedad, las cepas también pueden obtenerse recuperando M.hyo de las secreciones pulmonares o del tejido de porcinos infectados con cepas que se sabe que provocan neumonía *micoplasmática* en porcinos.

Se entiende por aquellos expertos en la materia que las variantes de las secuencias de M.hyo pueden emplearse en las composiciones de la presente invención. Tales variantes podrían variar tanto como un 10-20 % en identidad de secuencia y todavía retener las características antigénicas que las hacen útiles en composiciones inmunogénicas. Preferentemente, las variantes de M.hyo tienen al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, incluso más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia genómica de longitud completa de la cepa M.hyo de tipo silvestre. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden, por ejemplo, estimarse por el experimento de la prueba de provocación como se proporciona en los Ejemplos. Además, la característica antigénica de un antígeno de M.hyo modificado todavía se retiene cuando el antígeno modificado confiere al menos un 70 %, preferentemente un 80 %, más preferentemente un 90 % de la inmunidad protectora en comparación con la proteína de M.hyo de tipo silvestre.

En una realización, el antígeno p46 soluble de M.hyo se incluye en las composiciones de la invención a una concentración final de aproximadamente 1,5 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, preferentemente de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 6 µg/ml. Nótese que p46 es la proteína usada para el ensayo de potencia de M.hyo (véase la sección de ejemplos a continuación). En otra realización, el antígeno de M.hyo puede incluirse en las composiciones a una cantidad final de aproximadamente un 5,5 % a aproximadamente un 35 % del sobrenadante tratado con proteína A del cultivo de células enteras de M.hyo.

La preparación soluble de M.hyo es tanto segura como efectiva contra M.hyo y es adecuada para la administración de dosis única. Además, los presentes Solicitantes han descubierto sorprendentemente que la preparación soluble de M.hyo puede combinarse eficazmente con antígenos de otros patógenos, incluyendo el CVP2 y el virus del SRRP, sin interferencia inmunológica entre los antígenos. Esto hace a la preparación soluble de M.hyo una plataforma eficaz para vacunas multivalentes, incluyendo la vacuna de combinación CVP2/M.hyo/SRRP de la presente invención. Los antígenos del CVP2 y el virus del SRRP pueden darse concurrentemente con la composición de M.hyo (es decir, como tres vacunas únicas separadas), pero preferentemente la preparación soluble de M.hyo y el antígeno CVP2 se combinan juntos en forma de una composición líquida lista para su uso. Esta composición líquida de CVP2/M.hyo lista para su uso puede combinarse después con el antígeno del virus del SRRP de tal manera que todos los antígenos puedan administrarse simultáneamente al cerdo. En algunas realizaciones, el antígeno del virus del SRRP está en un estado liofilizado y la composición líquida de CVP2/M.hyo puede usarse para rehidratar el antígeno del virus del SRRP liofilizado, formando de esta manera la composición trivalente.

En una realización, las composiciones inmunogénicas de CVP2/M.hyo/SRRP de la presente invención incluyen al menos un antígeno adicional. En una realización, el al menos un antígeno adicional es protector contra un microorganismo que puede provocar enfermedad en cerdos.

En algunas realizaciones, el al menos un componente de antígeno adicional es protector contra bacterias, virus o protozoos que se sabe que infectan a cerdos. Algunos ejemplos de tales microorganismos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: parvovirus porcino (PVP), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, bacterias leptospira, *Lawsonia intracellularis*, virus de la gripe porcina (VGP), antígeno de *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus respiratorio porcino, virus de la Diarrea Epidémica Porcina (DEP), rotavirus, virus torque teno (VTT), Citomegalovirus porcino, enterovirus porcinos, virus de la Encefalomiocarditis, un patógeno causante de la Enfermedad de Aujeszky, de la Fiebre porcina clásica (FPC) y un patógeno causante de la Gastroenteritis transmisible porcina o combinaciones de los mismos.

En una realización, un componente CVP2/M.hyo de la vacuna trivalente de acuerdo con la presente invención se proporciona como una composición líquida lista para su uso en un frasco. Tal composición lista para su uso no requiere la mezcla de las vacunas monovalentes separadas de CVP2 y M.hyo, por lo que no hay riesgo de contaminación o trabajo adicional asociado a la mezcla y no hay requisitos del uso de la mezcla en unas pocas horas. También, un componente CVP2/M.hyo en un frasco corta el malgasto y el espacio de almacenamiento en el refrigerador a la mitad.

En algunas realizaciones, el componente antígeno de CVP2 de una vacuna de combinación CVP2/M.hyo/SRRP está en forma de un circovirus quimérico tipo 1-tipo 2. El virus quimérico incluye un circovirus porcino tipo 1 recombinante inactivado que expresa la proteína ORF2 del circovirus porcino tipo 2. Los circovirus porcinos quiméricos y los procedimientos para su preparación se describen en el documento WO 03/049703 A2 y también en las Patentes de EE.UU. N.º 7.279.166 y 7.575.752, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

En una realización, la secuencia de ADN de longitud completa del genoma del virus CVP1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 5 o variantes de la misma, como se describe a continuación. En otra realización, el gen de la cápside de ORF2 inmunogénica del virus CVP1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 6. En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 inmunogénica expresada por el virus CVP1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 7.

En aún otra realización, la secuencia de ADN de longitud completa del genoma del virus CVP1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 8. En una realización, el gen de la cápside de ORF2 inmunogénica del virus CVP1-2

quimérico corresponde a SEQ ID NO: 9. En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 inmunogénica expresada por el virus CVP1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 10.

5 Sin embargo, el ADN y la proteína de ORF2 del CVP2 del virus PVC1-2 quimérico no se limitan a las secuencias descritas anteriormente ya que el ADN y la proteína de ORF2 del CVP2 es un dominio altamente conservado dentro de los aislados del CVP2.

En algunas realizaciones, el componente antígeno de CVP2 de una vacuna de combinación CVP2/M.hyo/SRRP está en forma de una proteína ORF2 recombinante. En una realización, la proteína ORF2 recombinante se expresa a partir de un vector de baculovirus. Como alternativa, pueden usarse otros vectores de expresión conocidos, tales como incluyendo, pero no limitados a, vectores parapox.

10 En una realización, la proteína ORF2 del CVP2 recombinante es aquella de SEQ ID NO: 11, que está codificada por SEQ ID NO: 12 (N.º de Acceso de GenBank AF086834). En otra realización, la proteína ORF2 recombinante es aquella de SEQ ID NO: 13, que está codificada por SEQ ID NO: 14. En aún otra realización, la proteína ORF2 recombinante corresponde a SEQ ID NO: 15. En aún otra realización, la proteína ORF2 del CVP2 recombinante
15 corresponde a SEQ ID NO: 10.

20 Sin embargo, La presente invención no está limitada a las secuencias de ADN y de proteína de ORF2 particulares descritas anteriormente. Ya que el ADN y la proteína de ORF2 del CVP2 es un dominio altamente conservado dentro de los aislados de CVP2, cualquier ORF2 del CVP2 es altamente probable que sea eficaz como la fuente del ADN y/o el polipéptido de ORF2 del CVP2 como se usa en el virus CVP1-2 quimérico o en la proteína CV2P recombinante.

25 Un ejemplo de un aislado de CVP2 adecuado del que pueden derivar las secuencias de ADN y de proteína de ORF2 del CVP2 es el número de aislado 40895 de CVP2 (depositado en la ATCC el 7 de diciembre de 2001 y asignado la Designación de Depósito de Patente de ATCC PTA-3914). La secuencia genómica (de nucleótidos) del número de aislado 40895 de CVP2 está disponible bajo el número de acceso de GenBank AF264042. Otros ejemplos de aislados de CVP2 adecuados de los que pueden derivar las secuencias de ADN y de proteína de ORF2 del CVP2 incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: Imp.999, Imp.1010-Stoon, Imp.1011-48121 e Imp.1011-48285. Los números de acceso de GenBank de las secuencias genómicas que corresponden a estos aislados del CVP2 son AF055391, AF055392, AF055393 y AF055394, respectivamente.

30 En algunas formas, las porciones inmunogénicas de la proteína ORF2 del CVP2 se usan como el componente antigénico en la composición. Por ejemplo, pueden emplearse formas truncadas y/o sustituidas o fragmentos de la proteína ORF2 del CVP2 en las composiciones de la presente invención.

35 Se entiende por aquellos expertos en la materia que las variantes de las secuencias del CVP2 pueden emplearse en las composiciones de la presente invención. Tales variantes podrían variar tanto como un 10-20 % en identidad de secuencia y todavía retener las características antigénicas que las hacen útiles en composiciones inmunogénicas. Preferentemente, las variantes del CVP2 tienen al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, incluso más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia genómica de longitud completa del aislado del CVP2 de tipo silvestre. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden, por ejemplo, estimarse por el experimento de la prueba de provocación como se proporciona en los Ejemplos. Además, la característica antigénica de un antígeno del CVP2 modificado
40 todavía se retiene cuando el antígeno modificado confiere al menos un 70 %, preferentemente un 80 %, más preferentemente un 90 % de la inmunidad protectora en comparación con la proteína ORF2 del CVP2 de tipo silvestre.

45 El componente antígeno del CVP2 se proporciona en la composición inmunogénica a un nivel de inclusión de antígeno eficaz para inducir la respuesta inmune deseada, es decir reducir la incidencia de o disminuir la gravedad de los signos clínicos que resultan de la infección del CVP2.

50 En una realización, se incluye un virus CVP1-2 quimérico en las composiciones trivalentes de la invención a un nivel de al menos $1,0 \leq PR \leq 5,0$, en el que PR es la unidad de Potencia Relativa determinada por cuantificación de antígeno por ELISA (ensayo de potencia *in vitro*) en comparación con una vacuna de referencia. En otra realización, se incluye un virus CVP1-2 quimérico en la composición de la invención a una concentración final de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 5 % del antígeno CVP1-2 a granel concentrado 20 veces (20X).

55 En otra realización, la proteína recombinante ORF2 del CVP2 se incluye en las composiciones trivalentes de la invención a un nivel de al menos 0,2 µg de antígeno/ml de la composición inmunogénica final (µg/ml). En una realización adicional, el nivel de inclusión de la proteína recombinante ORF2 del CVP2 es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/ml. En aún otra realización, el nivel de inclusión de la proteína recombinante ORF2 del CVP2 es de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/ml. En aún una realización adicional, el nivel de inclusión de la proteína recombinante ORF2 del CVP2 es de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/ml. En aún otra realización, el nivel de inclusión de la proteína recombinante ORF2 del CVP2 es de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/ml.

En una realización, una composición inmunogénica trivalente de la presente invención incluye la combinación de la invención de antígenos solubles de M.hyo, un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (CVP2) y un antígeno de virus del SRRP. En otra realización, la composición provoca una respuesta inmune en un cerdo contra M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP.

5 En una realización, se proporciona una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo/SRRP como una vacuna monodosis en 2 frascos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona una combinación de CVP2/M.hyo como una composición líquida estable en un primer frasco y un virus del SRRP se proporciona en un estado liofilizado en un segundo frasco. En algunas realizaciones, los antígenos porcinos adicionales pueden añadirse a cualquiera del primer o el segundo frascos.

10 En una realización, el componente del virus del SRRP se proporciona como un virus vivo liofilizado modificado genéticamente. Antes de la administración, el líquido CVP2/M.hyo de un primer frasco puede usarse para rehidratar el virus del SRRP en un segundo frasco de tal manera que los tres antígenos pueden administrarse al animal en monodosis. Nótese que aunque actualmente existen vacunas de combinación de CVP2/M.hyo/SRRP, se proporcionan como una vacuna monodosis en 3 frascos que requiere la administración simultánea de las tres vacunas separadas (por ejemplo, Ingelvac CircoFLEX®, Ingelvac MycoFLEX® e Ingelvac®PRRS MLV).

15 El agente etiológico SRRP se aisló por primera vez en los Países Bajos y se llamó virus de Lelystad. Este virus se describió en el documento WO 92/21375 (Stichting Centraal Diegeneeskundig Instituut). Un aislado del virus del SRRP europeo se depositó en el Institut Pasteur de París, número 1-1102. El tipo norteamericano se aisló casi simultáneamente con el aislamiento del virus tipo europeo y se describe en el documento WO-93/03760 (Collins y col.). Un aislado del virus tipo norteamericano se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), número VR-2332.

20 Se han aislado diferentes cepas tanto de los tipos de virus europeos como norteamericanos. El documento WO 93/07898 (Akzo) describe una cepa europea y vacunas derivadas de la misma, depositada en el CNCM (Institut Pasteur), número 1-1140. También, el documento WO 93/14196 (Rhone-Merieux) describe una nueva cepa aislada en Francia, depositada en el CNCM (Institut Pasteur), número 1-1153. Adicionalmente, EP0595436 B1 (Solvay) describe una nueva cepa tipo norteamericana, más virulenta que la una inicialmente descrita, y vacunas de la misma. Esta cepa se ha depositado en la ATCC, pero el número de depósito no se detalla en la solicitud de patente. Además, el documento ES2074950 BA (Cyanamid Iberica) y su homólogo GB2282811 B2 describen una denominada "cepa española", que es diferente de otras cepas europeas y norteamericanas. Esta "cepa española" se ha depositado en la European Animal Cell Culture Collection (EACCC), número V93070108.

25 Los antígenos del virus del SRRP adecuados para su uso en las composiciones de CVP2/M.hyo/SRRP de la presente invención incluyen aislados del virus del SRRP norteamericano, cepas del virus del SRRP chino y cepas del virus del SRRP europeo, así como versiones modificadas genéticamente de tales aislados/cepas. En una realización, el componente antígeno del virus del SRRP empleado en las composiciones de acuerdo con la presente invención es un virus del SRRP norteamericano.

30 En algunas realizaciones, el componente antígeno del virus del SRRP empleado en las composiciones de la presente invención es el aislado del virus SRRP norteamericano designado P129 o una versión viva modificada genéticamente del mismo. Preferentemente, el virus del SRRP modificado genéticamente es incapaz de producir una infección patológica aunque es capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra el virus del SRRP de tipo silvestre.

35 Un virus del SRRP modificado genéticamente para su uso en las composiciones de la invención puede producirse a partir de un clon infeccioso. La preparación de un clon de ADNc infeccioso del aislado del virus del SRRP norteamericano designado P129 se describe en la Pat. de EE.UU. N.º 6.500.662 que se incorpora de esta manera completamente por referencia. La secuencia del ADNc de P129 se desvela en el Número de Acceso de Genbank AF494042 y en la Pat. de EE.UU. N.º 6.500.662.

40 En una realización, la secuencia de nucleótidos de una forma no virulenta de P129 para su uso en las composiciones de la presente invención se representa por SEQ ID NO: 16. Sin embargo, la presente invención no se limita a esta secuencia. Esta secuencia y las secuencias de otras formas no virulentas de P129 se describen en la Solicitud Internacional N.º PCT/IB2011/055003, presentada el 9 de noviembre de 2011, los contenidos de la cual (incluyendo cualquier presentación de Fase Nacional de EE.UU. basada en esta Solicitud Internacional) se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Preferentemente, el virus del SRRP se modifica para evitar la regulación negativa de la función mediada por interferón.

45 En otras realizaciones, el componente antígeno del virus del SRRP empleado en las composiciones de la presente invención es el aislado del virus SRRP designado ISU-55. El aislado ISU-55 se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), bajo el número de acceso VR2430. La secuencia de nucleótidos de los genes ORF2 a ORF5 del aislado ISU-55 se representa por SEQ ID NO: 17. La secuencia de nucleótidos de los genes ORF6 y ORF7 del aislado ISU-55 se representa por SEQ ID NO: 18.

Otro aislado del virus del SRRP norteamericano adecuado que puede usarse en las composiciones es ISU-12, que

se depositó en la ATCC bajo los números de acceso VR2385 [3 x purificados en placa] y VR2386 [no purificados en placa]. Aún otros aislados del virus del SRRP norteamericano adecuados que pueden emplearse en las composiciones de la presente invención son los siguientes: ISU-51, ISU-3927, ISU-1894, ISU-22 e ISU-79, que se depositaron en la ATCC bajo los números de acceso VR2498, VR2431, VR2475, VR2429 y VR2474, respectivamente. Las versiones modificadas genéticamente de cualquiera de estos aislados ISU pueden emplearse en las composiciones de la presente invención. Estos aislados ISU y el aislado ISU-55 se describen en detalle en las siguientes patentes de EE.UU. de Paul y col.: US 5.695.766, 6.110.467, 6.251.397, 6.251.404, 6.380.376, 6.592.873, 6.773.908, 6.977.078, 7.223.854, 7.264.802, 7.264.957 y 7.517.976, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En aún otras realizaciones, el componente antigénico del virus del SRRP empleado en las composiciones de acuerdo con la presente invención es el tipo norteamericano depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), número VR-2332 o una versión modificada genéticamente del mismo. Por ejemplo, el virus del SRRP puede ser un virus vivo modificado a base del aislado identificado como ATCC VR2332, que se emplea en INGELVAC® PRRS ATP e INGELVAC® PRRS MLV, de Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

En aún otras realizaciones, el componente antigénico del virus del SRRP empleado en las composiciones de la presente invención es un aislado del virus SRRP europeo o el virus de Lelystad o una versión modificada genéticamente de los mismos. Un ejemplo de una cepa del virus del SRRP adecuada se identifica como N.º de depósito 1-1102, descrita anteriormente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que corresponden al depósito 1-1102 se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.620.691 de Wensvoort y col., que se incorpora de esta manera completamente en el presente documento por referencia. La preparación de un clon de infeccioso del aislado del virus del SRRP europeo o el virus de Lelystad se describe en la Pat. de EE.UU. N.º 6.268.199 que se incorpora de esta manera completamente en el presente documento por referencia.

Otros ejemplos de aislados del virus del SRRP adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos anteriormente. También, pueden emplearse versiones vivas modificadas genéticamente de los aislados del virus del SRRP en las composiciones de la presente invención. Un clon infeccioso puede usarse para recrear tales organismos vivos modificados genéticamente.

Se entiende por aquellos expertos en la materia que las variantes de las secuencias del virus del SRRP pueden emplearse en las composiciones de la presente invención. Tales variantes podrían variar tanto como un 10-20 % en identidad de secuencia y todavía retener las características antigénicas que las hacen útiles en composiciones inmunogénicas. Preferentemente, las variantes del virus del SRRP tienen al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, incluso más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia genómica de longitud completa del aislado del virus del SRRP de tipo silvestre. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden, por ejemplo, estimarse por experimentos de prueba de provocación. Además, la característica antigénica de un antígeno del virus del SRRP modificado todavía se retiene cuando el antígeno modificado confiere al menos un 70 %, preferentemente un 80 %, más preferentemente un 90 % de la inmunidad protectora en comparación con el antígeno del virus del SRRP de tipo silvestre.

En una realización, el componente antigénico del virus del SRRP es un virus vivo modificado genéticamente que se incluye en las composiciones de la invención a un nivel de al menos $2,1 \leq \text{DICT}_{50} \leq 5,2$, en la que DICT_{50} es la dosis al 50 % infecciosa de cultivo tisular determinada por cuantificación de antígeno (ensayo de potencia *in vitro*).

El componente antigénico de CVP2 de las composiciones CVP2/M.hyo/SRRP de la invención puede estar en forma de un circovirus quimérico tipo 1-tipo 2, incluyendo el virus quimérico un circovirus porcino tipo 1 recombinante inactivado que expresa la proteína ORF2 del circovirus porcino tipo 2. En otra realización, el componente antigénico de CVP2 de las composiciones CVP2/M.hyo/SRRP de la invención está en forma de una proteína ORF2 recombinante.

Los antígenos de CVP2 adecuados para su uso en las composiciones CVP2/M.hyo/SRRP pueden derivar de cualquiera de los aislados de CVP2 descritos anteriormente, así como otros aislados de CVP2. Los antígenos de PCV2 adecuados a emplearse en las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de CVP2 descritas anteriormente y variantes de las mismas.

Las vacunas de la presente invención pueden formularse después de la convención aceptada de incluir portadores aceptables para animales, incluyendo humanos (si es aplicable), tales como tampones convencionales, estabilizantes, diluyentes, conservantes y/o solubilizantes y también pueden formularse para facilitar la liberación sostenida. Los diluyentes incluyen agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los aditivos para la isotonicidad incluyen cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina, entre otros. Otros vehículos y aditivos de vacuna adecuados, incluyendo aquellos que son particularmente útiles en la formulación de vacunas vivas modificadas, son conocidos o serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 18a ed., 1990, Mack Publishing, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Las vacunas de la presente invención pueden comprender además uno o más componentes inmunomoduladores adicionales tales como, por ejemplo, un adyuvante o una citocina, entre otros. Los tipos de adyuvantes adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen los siguientes: un adyuvante de aceite en agua, un adyuvante de polímero y agua, un adyuvante de agua en aceite, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un adyuvante de vitamina E y combinaciones de los mismos. Algunos ejemplos específicos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, *Corynebacterium parvum*, Bacilo de Calmette Guerin, gel de hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato sódico, Adyuvante Bacto, ciertos polímeros sintéticos tales como poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, Copolímero en bloque (CytRx, Atlanta, Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, monofosforil lípido A y adyuvante Avridine de lípido-amina (N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina), "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), aceite de parafina, sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), dipéptido de muramilo y similares.

Los ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua útiles en la vacuna de la invención incluyen formulaciones de SEAM62 y SEAM 1/2 modificadas. SEAM62 modificada es una emulsión de aceite en agua que contiene un 5 % (v/v) de escualeno (Sigma), un 1 % (v/v) de detergente SPAN® 85 (ICI Surfactants), un 0,7 % (v/v) de detergente TWEEN® 80 (ICI Surfactants), un 2,5 % (v/v) de etanol, 200 µg/ml de Quil A, 100 µg/ml de colesterol y un 0,5 % (v/v) de lecitina. SEAM 1/2 modificada es una emulsión de aceite en agua que comprende un 5 % (v/v) de escualeno, un 1 % (v/v) de detergente SPAN® 85, un 0,7 % (v/v) de detergente Tween 80, un 2,5 % (v/v) de etanol, 100 µg/ml de Quil A y 50 µg/ml de colesterol.

Otro ejemplo de un adyuvante útil en las composiciones de la invención es el aceite SP. Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "aceite SP" designa una emulsión de aceite que comprende un copolímero en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, escualano, monooleato de polioxietileno sorbitán y una solución salina tamponada. Los copolímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno son tensioactivos que ayudan en la suspensión de componentes sólidos y líquidos. Estos tensioactivos están disponibles en el mercado como polímeros bajo la marca comercial Pluronic®. El tensioactivo preferido es poloxámero 401 que está disponible en el mercado bajo la marca comercial Pluronic® L-121. En general, la emulsión de aceite SP es una mezcla adyuvante inmunestimulante que comprenderá aproximadamente un 1 a un 3 % vol/vol de copolímero en bloque, aproximadamente un 2 a un 6 % vol/vol de escualano, de forma más particular aproximadamente un 3 a un 6 % vol/vol de escualano y aproximadamente un 0,1 a un 0,5 % vol/vol de monooleato de polioxietileno sorbitán, siendo el resto una solución salina tamponada. En una realización, la emulsión de aceite SP está presente en la composición final en cantidades en v/v de aproximadamente un 1 % a un 25 %, preferentemente de aproximadamente un 2 % a un 15 %, más preferentemente de aproximadamente un 5 % a un 12 % v/v.

Aún otro ejemplo de un adyuvante adecuado para su uso en las composiciones de la invención es el adyuvante AMPHIGEN™ que consiste en lecitina sin aceite disuelta en un aceite, habitualmente parafina líquida ligera.

Otros ejemplos de adyuvantes útiles en las composiciones de la invención son los siguientes adyuvantes patentados: sistema adyuvante de emulsión dual Microsol Diluvac Forte®, adyuvante Emunade y adyuvante Xsolve. Tanto el adyuvante Emunade como el Xsolve son emulsiones de aceite mineral ligero en agua, pero Emunade contiene también alhidrogel y acetato de d,l- α -tocoferilo es parte del adyuvante XSolve. Un ejemplo todavía adicional de un adyuvante adecuado para su uso en las composiciones de la invención es el adyuvante ImpranFLEX™ (un adyuvante de agua en aceite). Un ejemplo todavía adicional de un adyuvante adecuado es un adyuvante basado en Carbómero (Carbopol®). Los adyuvantes Carbopol® preferidos incluyen polímero Carbopol® 934 y polímero Carbopol®941.

En una realización, el adyuvante o la mezcla adyuvante se añaden en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. En otra realización, el adyuvante/la mezcla adyuvante se añaden en una cantidad de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. En aún otra realización, el adyuvante/la mezcla adyuvante se añaden en una cantidad de aproximadamente 300 µg a aproximadamente 1 mg/dosis.

El adyuvante o la mezcla adyuvante están típicamente presentes en la composición de vacuna de la invención en cantidades en v/v de aproximadamente un 1 % a un 25 %, preferentemente de aproximadamente un 2 % a un 15 %, más preferentemente de aproximadamente un 5 % a un 12 % v/v.

Otros "inmunomoduladores" que pueden incluirse en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones u otras citocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tales como aquellos descritos en las Pat. de EE.UU. n.º 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente.

Un aspecto adicional se refiere a un procedimiento para preparar una composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención. Este procedimiento comprende i) cultivar *M.hyo* en un medio adecuado durante periodos que varían de 18-144 horas; ii) posteriormente inactivar el cultivo de *M. hyo*; iii) cosechar el fluido de cultivo inactivado, en el que el fluido de cultivo inactivado comprende tanto una fracción líquida soluble como un material celular insoluble; iv) separar la fracción líquida soluble del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por

precipitación; v) retirar sustancialmente tanto la IgG como los inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina de la fracción líquida soluble separada para formar el sobrenadante de cultivo de M. hyo libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina; y vi) posteriormente combinar el sobrenadante con un antígeno de CVP2 y un antígeno del virus de SRRP. En algunas realizaciones, la etapa vi) incluye combinar una composición líquida lista para su uso que incluye tanto el antígeno de CVP2 como la porción soluble de M.hyo con un antígeno del virus de SRRP liofilizado.

Un ejemplo de un medio adecuado para cultivar M.hyo es Caldo PPLO (Base de Caldo de *Mycoplasma*), que cuando se suplementa con enriquecimiento nutritivo, se usa para aislar y cultivar *Mycoplasma*.

En algunas realizaciones, el cultivo de M.hyo se hace crecer hasta la fase de crecimiento logarítmica tardía, después de la cual el cultivo se inactiva. En algunas realizaciones distintas, el cultivo se inactiva elevando el pH (por ejemplo, a aproximadamente 7,8). Esto se produce exponiendo el cultivo de producción a un agente de inactivación, tales como etilenimina binaria (EIB). La EIB se genera *in situ* durante la incubación de bromhidrato de L-bromoetilamina (BEA) en el cultivo de producción. Posteriormente, el pH del cultivo inactivado se neutraliza, tal como añadiendo una cantidad equivalente de un agente que neutralice el agente de inactivación dentro de la solución. En algunas realizaciones, el agente de inactivación es EIB y el agente de neutralización es tiosulfato sódico. En una realización, el pH del cultivo inactivado se ajusta a aproximadamente 7,4 añadiendo tiosulfato sódico.

La fracción líquida soluble de la preparación de células enteras M.hyo se separa del material celular insoluble usando procedimientos convencionales. En una realización, esta separación es mediante una etapa de filtración. En otra realización, esta separación es mediante una etapa de centrifugación. En aún otra realización, la separación es mediante una etapa de precipitación.

En una realización, la fracción líquida soluble de una preparación de células enteras de M.hyo inactivadas neutralizadas se trata con resina de Proteína A para retirar sustancialmente tanto la IgG como los inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina en la misma. En otras realizaciones, puede usarse resina de Proteína G para retirar sustancialmente tanto la IgG como los inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina contenidos en la fracción líquida soluble. Los procedimientos para retirar tanto la IgG como los inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina bien con resinas de Proteína A o de Proteína G se conocen bien en la técnica.

De acuerdo con un aspecto adicional, el procedimiento para preparar una composición inmunogénica trivalente de acuerdo con la presente invención comprende preparar el antígeno de M.hyo soluble como se describe anteriormente y mezclar éste con un antígeno de CVP2, un antígeno del virus del SRRP, un adyuvante adecuado y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Este procedimiento incluye opcionalmente combinar el antígeno de CVP2 y el antígeno de M.hyo soluble para formar una composición divalente y posteriormente añadir esta composición divalente a una composición de antígeno del virus del SRRP monovalente para formar la composición trivalente.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un kit. Un "kit" se refiere a una pluralidad de componentes que se agrupan juntos. En una realización, un kit de acuerdo con la presente invención incluye un primer frasco (u otro receptáculo adecuado) que comprende una composición que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); y un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (CVP2), en el que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina; y un segundo frasco que contiene el antígeno del virus de SRRP. En una realización, el kit incluye además un manual de instrucciones.

En algunas realizaciones, la combinación CVP2/M.hyo en el primer frasco del kit se proporciona como una composición líquida lista para su uso. En realizaciones adicionales, el antígeno del virus de SRRP está en forma de un virus vivo modificado genéticamente que se proporciona en un estado liofilizado. En tales casos, el manual de instrucciones incluirá las directrices para rehidratar el componente del virus del SRRP en el segundo frasco con los contenidos líquidos del primer frasco que contiene la combinación CVP2/M.hyo. El manual de instrucciones incluirá también preferentemente las directrices para administrar los contenidos combinados del primer y el segundo frascos al cerdo.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención se administra a los cerdos que tienen anticuerpos derivados maternos contra al menos uno de M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP. En otras realizaciones, una composición inmunogénica de la presente invención se administra a los cerdos que tienen anticuerpos derivados maternos contra M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica trivalente de acuerdo con la presente invención se administra a un lechón con la edad de 3 semanas o más mayor. Sin embargo, se contempla que una composición de vacuna trivalente de acuerdo con la invención pueda usarse también para revacunar a cerdas jóvenes antes de cruzarlas. Como se sabe en la técnica, una cerda joven es un cerdo hembra que nunca ha estado preñada. Las cerdas jóvenes vacunadas pasarán los anticuerpos derivados maternos a sus recién nacidos amamantados a través del calostro.

Se contempla además que una vacuna trivalente de acuerdo con la invención pueda usarse para revacunar

anualmente a las pjaras de cría. Preferentemente, una vacuna trivalente de acuerdo con la presente invención se administra a cerdos (por ejemplo, lechones o cerdas jóvenes) en una dosis. En una realización, una vacuna multivalente de acuerdo con la presente invención no requiere la mezcla de las vacunas monovalentes CVP2 y M.hyo separadas antes de la administración, es decir, el componente CVP2/M.hyo se proporciona como una formulación lista para su uso contenida en un frasco. En otra realización, una formulación multivalente requiere la mezcla de una vacuna CVP2/M.hyo divalente contenida en un primer frasco con una vacuna del SRRP monovalente contenida en un segundo frasco. Opcionalmente, pueden añadirse antígenos adicionales a cualquiera de estos frascos.

En algunas realizaciones, la aparición de la inmunidad es de 2-3 semanas post-vacunación con una composición de vacuna trivalente de acuerdo con la presente invención. En otras realizaciones, la duración de la inmunidad es de 17-23 semanas post-vacunación con una composición de vacuna trivalente de acuerdo con la presente invención.

Los siguientes ejemplos exponen materiales y procedimientos preferidos de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, ha de entenderse que estos ejemplos se proporcionan solamente a modo de ilustración y ninguno en los mismos debe considerarse una limitación del ámbito global de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimientos de producción de *Mycoplasma hyopneumoniae* para el antígeno de M.hyo combinable con CVP2

Fermentación e inactivación de M.hyo

El medio para la extensión de semillas y la producción de antígenos se preparó como sigue. Se fabricó un Caldo de Organismo parecido a Pleuroneumonía derivado de corazón de Porcino (PPLO, por sus siglas en inglés) (BD Biosciences N.º de catálogo 21498) según las directrices del fabricante (es decir, 21 g/l) y la solución de extracto de levadura se fabricó a 21 g/l en USP. La solución del extracto de levadura se añadió después al PPLO al 6,25 % y la mezcla se esterilizó calentando a 121 °C durante \geq 30 minutos. Se preparó clorhidrato de cisteína a 90 g/l y se esterilizó por filtración. La solución de dextrosa se fabricó añadiendo 450 g de dextrosa por litro de agua USP seguido de esterilización por calor. Para preparar el medio final, se añadió suero porcino al medio base al 10 % seguido de cisteína al 0,01 % y dextrosa al 1,0 %. El medio se inoculó con un 10 % v/v de un cultivo en fase log de *M. hyopneumoniae* (cepa P-5722-3). El cultivo se mantuvo a 37 °C y el pH y dO se mantuvieron a 7,0 y al 25 %, respectivamente. En la fase log de crecimiento tardía, el cultivo se inactivó por etilenimina binaria (EIB), un compuesto aziridina, producido a partir de bromhidrato de 2-bromoetilamina. De forma específica, la inactivación se produjo elevando el pH a 7,8 añadiendo bromhidrato de 2-bromoetilamina (BEA) a una concentración final de 4 mM e incubando durante 24 horas. La EIB se neutralizó mediante la adición de tiosulfato sódico a una relación molar 1:1 seguido de 24 horas de incubación adicionales. El fluido de cultivo inactivado se mantuvo a 2-8 °C hasta el procesamiento adicional.

Ejemplo 2: Procedimientos de producción del Circovirus porcino quimérico (CVPq)1-2

El CVPq1-2 se construyó clonando el gen de la cápside inmunogénica del circovirus porcino patogénico tipo 2 (CVP2) en el esqueleto genómico del circovirus porcino no patogénico tipo 1 (CVP1). El procedimiento para la construcción del clon de ADN quimérico se describe, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.279.166, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Un almacén infeccioso del virus quimérico se adquirió del Dr. X. J. Meng, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA y se usó para infectar células de Riñón Porcino (PK)-15 crecidas en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con hidrolizado de lactalbúmina (LAH) al 0,05 %, 30 µg/ml de sulfato de gentamicina y suero bovino fetal al 5 %. Las células PK-15 infectadas con CVPq1-2 resultantes se expandieron adicionalmente por pasajes en serie cuatro veces más usando el mismo medio de crecimiento excepto con suero bovino fetal al 2-3 %. El quinto pasaje se congeló, se descongeló y se filtró y los lisados resultantes se usaron para preparar una pre-semilla maestra y posteriormente una semilla maestra.

El medio que se usó para producir semillas de virus fue el mismo que se usó en la producción del almacén de virus. Para el medio de crecimiento, MEM, OptiMEM o equivalente es el medio basal que puede usarse para plantar la línea celular PK-15 para la excrecencia. El medio de crecimiento puede suplementarse con hasta un 10 % de suero bovino, hasta un 0,5 % de hidrolizado de lactalbúmina, hasta un 0,5 % de albúmina de suero bovino y hasta 30 µg/ml de gentamicina. Para el medio de propagación del virus, se usa MEM, OptiMEM o equivalente. El medio de propagación del virus puede suplementarse con hasta un 0,5 % de hidrolizado de lactalbúmina, hasta un 2 % de suero bovino, hasta un 0,5 % de albúmina de suero bovino y hasta 30 µg/ml de gentamicina. Pueden añadirse hasta 5 g/l de glucosa y hasta 5 mmol/l de L-glutamina al medio de crecimiento y/o al medio de propagación del virus según se requiera para sostener las células.

La semilla maestra de virus del CVPq1-2 se añade a una suspensión celular de células PK-15 y se adsorbe durante hasta 3 horas. La semilla del virus se diluye en medio basal de crecimiento para proporcionar una multiplicidad de infección (MDI) de 0,1 - 0,0001.

Los cultivos de células PK-15 se inoculan inicialmente con semilla de virus de trabajo en el momento de la siembra celular o cuando las células alcanzan aproximadamente una confluencia del 20 % al 50 %. Este pasaje inicial puede denominarse "Procedimiento de infección en una única etapa" para la producción de almacén de antígeno o puede usarse además para pasajes en serie. Para pasajes en serie, las células PK-15 infectadas con CVPq1-2 se expanden adicionalmente hasta el pasaje 7 por divisiones en serie a la relación de 1:5-20 para la propagación del virus. El medio de cultivo que contiene una suspensión de células infectadas del pasaje previo sirve como un material semilla para el siguiente pasaje. Las células infectadas con CVPq1-2 se incuban durante tres (3) a 14 días para cada pasaje a 36 ± 2 °C cuando las células alcanzan ≥ 90 % de confluencia. El virus CVPq1-2 provoca cambios citopáticos observables durante la replicación vírica. En la cosecha, se observa un redondeo de las células y restos flotantes considerables. Los cultivos se observan también para la evidencia visual de contaminación bacteriana o fúngica. El tiempo de incubación entre cosechas para el antígeno del CVPq se proporciona en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1 Tiempos mínimos y máximos para cosechar el antígeno del CVPq

Procedimiento	Tiempo mínimo / máximo	Intervalo de temperatura
Infección en una única etapa	5 a 16 días	36 ± 2 °C
Pasaje en serie (MSV + 3 a MSV + 7)	16 a 36 días	36 ± 2 °C

Los fluidos del cultivo de CVPq1-2 se cosechan en recipientes estériles y se muestrean para el ensayo de micoplasma usando procedimientos conocidos. Pueden llevarse a cabo múltiples cosechas a partir de frascos rotativos, biorreactores y recipientes de perfusión.

Antes de la inactivación de los virus CVPq1-2 cosechados, pueden concentrarse uno o más lotes de antígenos (por ejemplo, hasta 60X) por ultrafiltración. Los concentrados pueden lavarse con solución salina equilibrada para reducir las proteínas séricas.

El procedimiento de inactivación, atenuación o detoxificación del virus CVPq1-2 se describirá a continuación. Después de la concentración de antígeno del CVPq, se añade *Beta*-propiolactona (BPL) al material vírico CVPq1-2 agrupado para obtener una concentración aproximada del 0,2 % v/v. Los fluidos víricos agrupados se agitan después durante un mínimo de 15 minutos y después los fluidos de antígeno a granel inactivadores se transfieren a un segundo recipiente estéril. Los fluidos de antígeno transferidos se mantienen a 2 - 7 °C, con agitación constante, durante un mínimo de 24 horas. Después de un mínimo de 24 horas, una segunda adición del 0,2 % v/v de BPL se añade a la suspensión agrupada. Los contenidos se agitan posteriormente, se transfieren a un tercer recipiente y se mantienen a 2 - 7 °C, con agitación constante, durante un tiempo adicional de no menos de 84 horas. En general, el tiempo de inactivación total no es menos de 108 horas y no más de 120 horas. El procedimiento de inactivación se resume en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Procedimiento de inactivación

Inactivante	Concentración final	Temp. Intervalo	Tiempo-Horas (Mín/Máx)
<i>Beta</i> -propiolactona (BPL)	0,4 % v/v (2 x 0,2 % v/v de adiciones)	2 - 7 °C (con agitación)	108 - 120

La inactivación se termina mediante la adición de una concentración final de no más de 0,1 M de solución de tiosulfato sódico. El pH del almacén de antígeno inactivado se ajusta a aproximadamente 6,8 usando NaOH o HCl. Después de la inactivación, se toma una muestra representativa del conjunto y se ensaya para comprobar que la inactivación está completa. El producto de antígeno de CVPq1-2 inactivado se estandariza para cumplir una diana de más de 1,0 PR como se mide a través del ELISA de potencia.

Ejemplo 3: Procesamiento corriente abajo de antígenos de *M. hyo* y ensayo analítico de estos antígenos procesados

Procesamiento corriente abajo de antígenos de *M. hyo*:

El fluido de fermentación inactivado (preparado como se describe anteriormente en el Ejemplo 1) se trató para cada grupo indicado como sigue. Estos antígenos de *M. hyo* procesados se emplearon en el Ejemplo 4 a continuación.

T02: (Volumen completo) No procesado.

T03: (10X UF concentrado) Concentrado a través de filtración de flujo tangencial a través de una membrana de corte de 100 kDa de peso molecular (fibra hueca). La reducción del volumen final fue igual a 10X.

T04 & T05: (10X UF concentrado y centrifugado) Las células de micoplasma concentradas (de T03) se recogieron y se lavaron una vez con PBS a través de centrifugación a ~20.000 xg (Sorvall modelo RC5B).

T06 & T07: (10X centrifugado) El fluido de fermentación inactivado se centrifugó a ~20.000 xg (Sorvall modelo RC5B) y se lavó una vez resuspendiendo las células en PBS seguido de una centrifugación adicional. La reducción del volumen final fue igual a 10X.

T08: (10X centrifugado y calentado) Las células de micoplasma se concentraron y se lavaron para T06 y se calentaron a 65 °C durante 10 minutos.

T09: (Sobrenadante libre de células) El sobrenadante recogido de la primera centrifugación como se describe para T06 se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros (Nalgene).

5 T10: (Sobrenadante libre de células tratado con Proteína A) El sobrenadante estéril (preparado para T09) se mezcló con resina de Proteína A (Sefarosa Proteína A, Pharmacia Inc) a una relación en volumen de 10:1 durante 4 horas. La resina se retiró de la filtración estéril y el fluido filtrado se almacenó a 2-8 °C. Este procedimiento usa tratamiento de proteína A "corriente abajo" post-fermentación para retirar los anticuerpos e inmunocomplejos. Aunque la presente invención no excluye el tratamiento de proteína A corriente arriba, los
10 presentes inventores han descubierto que en el caso de M.hyo, el tratamiento de proteína A corriente arriba del medio de tratamiento dio lugar a resultados de p46 que fueron menores e inconsistentes en comparación con el medio sin tratar (datos no mostrados).

Ensayo analítico de los antígenos procesados corriente abajo de M.hyo

15 Las preparaciones de antígenos de M.hyo procesados corriente abajo (preparados como se describe anteriormente) se ensayaron para la recuperación del antígeno p46 específico de M.hyo y la presencia del anticuerpo de CVP2. Además, estas preparaciones de antígeno de M.hyo se ensayaron para la presencia del Virus torque teno (VTT), incluyendo el genotipo 1 (VTTg1) y el genotipo 2 (VTTg2). Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3 Caracterización de los antígenos procesados corriente abajo de M.hyo

Tratamiento	M.hyo a granel	ac CVP2	ADN qPCR	
	p46 UA/ml	relación S/P	VTTg1	VTTg2
Granel completo	809	0,248	1,00E+03	1,78E+03
10x UF concentrado	6666	0,819	1,00E+03	9,94E+03
10x UF conc. + Centrifuga	614	0,019	0	0
10x Centrifugado	763	-0,015	1,90E+02	1,91E+02
10x Centrifugado + Calentado	690	-0,012	0	2,07E+02
Sobre. libre de células	719	0,242	4,20E+02	3,23E+03
Sobre. libre de células (Prot. A)	826	-0,014	0	2,06E+03

20 Con referencia a la Tabla 3 anterior, se demostró la recuperación del antígeno p46 específico de M.hyo para cada una de las preparaciones de antígeno procesadas corriente abajo de M.hyo. Además, los siguientes tratamientos retiraron exitosamente el anticuerpo CVP2: 10X UF concentrado y centrifugado, 10x centrifugado, 10X centrifugado y calentado y Sobrenadante libre de células (tratado con Proteína A). Con respecto a VTT, los siguientes tratamientos retiraron exitosamente VTTg1: 10X UF concentrado y centrifugado, 10x centrifugado y calentado y Sobrenadante libre de células (tratado con Proteína A). Solamente el tratamiento designado 10X UF concentrado y centrifugado
25 retiró VTTg2. Los aislados del virus torque teno, incluyendo los genotipos 1 y 2 se describen en el documento US20110150913, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Ya que se saben en la técnica que la Proteína A se une a IgG, se entiende por aquellos expertos habituales en la materia que no solamente el anticuerpo de CVP2, sino otros anticuerpos porcinos, incluyendo el anticuerpo SRRP, el anticuerpo de HPS y el anticuerpo del VGP se retirarán eficazmente por el tratamiento con Proteína A. Esto hace al
30 sobrenadante de M.hyo tratado con Proteína A libre de células de la presente invención compatible no solamente con el antígeno del CVP2, sino también con otros antígenos porcinos debido a la carencia de interferencia inmunológica entre los antígenos. Adicionalmente, la retirada de los restos celulares no protectores y la retirada de la inmunoglobulina y los complejos antígeno/inmunoglobulina se espera razonablemente que haga a la vacuna más segura.

35 Ejemplo 4: Preparación de formulaciones de vacuna experimentales de M.hyo

Todas las vacunas experimentales de M.hyo se formulan con una concentración final de adyuvante al 5 % de Anfígeno. Además, todas las vacunas se estandarizaron con ELISA p46 y se conservaron con timerosol. Las formulaciones de vacuna experimentales se prepararon con antígenos de M.hyo procesados de acuerdo con los
40 tratamientos T02-T10 anteriores. Además, el Tratamiento T01 correspondió a un placebo (sin antígeno M.hyo, solamente adyuvante al 5 % de Anfígeno) mientras que el Tratamiento T11 es un control positivo que corresponde a una vacuna de M.hyo a base de bacteria caducada (RespiSure-ONE®, Pfizer Animal Health). Estas formulaciones se describen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4 Formulaciones de vacuna experimentales de M.hyo

Tratamiento	N.º de serie del IVP*	Unidades de p46 diana/ds	Antígeno de M Hyo (ml)	Adyuvante (ml)	Vol. de formulación (ml)
T01	123639 (Placebo)	5 % de Anfígeno solamente, Sin antígeno			
T02	L100211A	452	279,36	250	1000
T03	L100211B	452	6,78	50	200
T04	L100211C	452	73,62	50	200
T05	L100211D	816	132,90	50	200
T06	L100211E	452	59,24	50	200
T07	L100211F	816	106,95	50	200
T08	L100211G	452	65,51	50	200
T09	L100211H	452	62,87	50	200
T10	L100211J	452	54,72	50	200
T11	A827870	Vacuna "RespiSure" caducada			

*Número de serie del Producto Veterinario de Investigación (PVI)

Ejemplo 5: Evaluación de la efectividad *in vivo* de vacunas de M.hyo con antígenos de M.hyo de diferentes procedimientos corriente abajo

- 5 Este estudio se llevó a cabo para evaluar la efectividad *in vivo* de vacunas de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo) con antígenos de M hyo de diferentes procedimientos corriente abajo (PCA). Los cerdos a 3 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular con una dosis única de las diferentes formulaciones de vacuna descritas en la Tabla 4 anterior. Se incluyeron dieciséis animales en cada uno de los grupos de tratamiento. A los animales se les hizo una prueba de provocación 21 días después de la vacunación con un aislado en campo de M.hyo virulento. Los animales se necropsiaron 28 días después de la prueba de provocación y los pulmones se retiraron y se puntuaron para la consolidación consistente con la infección por M.hyo. El criterio primario para la protección contra la prueba de provocación de M.hyo fueron las puntuaciones de consolidación pulmonar. Se acepta generalmente que hay una relación entre el tamaño de las lesiones de pulmón causadas por la neumonía enzoótica y un efecto adverso en la tasa de crecimiento. La Tabla 5 a continuación contiene las puntuaciones de lesiones de pulmón para los grupos de tratamiento respectivos. Se determinó la significancia estadística mediante un Modelo de Análisis Mixto de las puntuaciones de pulmón para cada grupo.
- 10
- 15

Tabla 5 Resultados de lesión de pulmón

Tratamiento	Descripción	PR diana de p46/Observado	% de lesiones pulmonares tras medias LS transformadas	Intervalo de % de pulmón con lesiones	Contraste	valor p	Significativo
T01	Placebo (5 % de Anfígeno)	NA	11,7	1,2 - 44,3	NA	NA	NA
T02	Granel completo	13/15,6	1,2	0,1 - 18,5	T01 frente a 02	0	Sí
T03	Granel completo UF 10x	13/11,9	0,3	0,0 - 2,8	T01 frente a 03	0	Sí
T04	UF 10x + Centrifugado	13/28,1	5,9	0,0 - 40,5	T01 frente a 04	0,1589	No
T05	UF 10x + Centrifugado	24/48,2	3,7	0,0 - 42,3	T01 frente a T05	0,0309	Sí
T06	10x Centrifugado	13/30,4	4,7	0,0 - 23,6	T01 frente a 06	0,0388	Sí
T07	10x Centrifugado	24/57,4	4,6	0,3 - 37,3	T01 frente a T07	0,0323	Sí

(continuación)

Tratamiento	Descripción	PR diana de p46/Observado	% de lesiones pulmonares tras medias LS transformadas	Intervalo de % de pulmón con lesiones	Contraste	valor p	Significativo
T08	10x Centrifugado + Calor	13/17,7	4,5	0,3 - 21,7	T01 frente a T08	0,0137	Sí
T09	Sobrenadante (sin células)	13/14,1	1,4	0,0 - 33,0	T01 frente a T09	0,0004	Sí
T10	Sobrenadante + Prot A	13/12,1	3,1	0,0 - 25,8	T01 frente a T10	0,0094	Sí
T11	RSO caducada	13/12,5	2,2	0,1 - 32,1	T01 frente a T11	0,0009	Sí

Con referencia a la Tabla 5 anterior, los resultados con antígenos de M.hyo de diferentes procedimientos corriente abajo indicaron que todas las vacunas experimentales excepto T04 difirieron significativamente del placebo. Estos resultados de lesiones de M.hyo se representan gráficamente en la Figura 1. Como se muestra en la figura 1, T04 dio resultados inaceptables. Todos los demás tratamientos difirieron significativamente del placebo (T01). Las puntuaciones de consolidación de pulmón indicaron que T02, T03 y T09-T11 dieron la protección más efectiva contra la prueba de provocación de M.hyo.

La potencia relativa de p46 de las vacunas experimentales se evaluó usando un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas en sándwich de anticuerpos doble (ELISA DAS). Los resultados del ELISA DAS p46 presentados en la Tabla 5 anterior indican que las vacunas experimentales excedieron la potencia diana. Además, la potencia relativa de p46 se mantuvo o bien se aumentó durante el almacenamiento de las vacunas durante un periodo de un mes (datos no mostrados). Se observó un aumento percibido en la potencia con el tiempo en antígenos centrifugados con la excepción de aquellos antígenos que se sometieron a calor. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, es probable que las "carcasas" celulares se rompan con el tiempo y liberen más del antígeno p46 unido a membrana en el caso de los antígenos centrifugados.

Ejemplo 6: Evaluación de la compatibilidad de las vacunas de M.hyo experimentales con el antígeno de CVP2

Este estudio se llevó a cabo para evaluar la compatibilidad de las vacunas experimentales de M.hyo con antígenos de M.hyo de diferentes procedimientos corriente abajo con antígeno CVP2. Las formulaciones de vacuna experimentales de M.hyo se describen en las Tablas 4 y 5 anteriores. Las potencias relativas de p46 observadas para estas vacunas se describen en la Tabla 5 anterior. Estas vacunas experimentales de M.hyo se combinaron cada una con antígeno de CVP2. En este ejemplo, el antígeno de CVP2 fue un virus quimérico CVP Tipo 1-Tipo 2 muerto (CVP Foster) preparado como se describe anteriormente en el Ejemplo 2. El virus quimérico se incluyó en las composiciones a un nivel inicial de aproximadamente $1,6 \leq PR$, en el que la PR es la unidad de Potencia Relativa determinada por cuantificación de antígeno por ELISA CVP2 (ensayo de potencia *in vitro*) en comparación con una vacuna de referencia efectiva.

Las formulaciones de combinación M.hyo/CVP2 experimentales se evaluaron por ELISA de CVP2. Los resultados se presentan en la Figura 2. Como se muestra en la figura 2, solamente las preparaciones de antígeno de M.hyo de los siguientes procedimientos corriente abajo eran compatibles con el antígeno CVP2: Ultrafiltración y Centrifugación (T04 y T05), Centrifugación (T06 y T07), Centrifugación más calor (T08) y Sobrenadante tratado con Proteína A (T10). De estos, el sobrenadante tratado con Proteína A M.hyo fue el más compatible con el antígeno de CVP2 cuando se comparó con el control de placebo que incluyó el virus quimérico y adyuvante Antígeno, pero no antígeno de M.hyo. El nivel de virus de CVP quimérico en el sobrenadante tratado con Proteína A fue 1,5 PR en comparación con 1,69 PR para el placebo. De esta manera se concluyó que no hay interferencia inmunológica o es mínima entre la preparación de antígeno soluble de M.hyo tratada con Proteína A y antígeno CVP2 del virus quimérico.

La efectividad *in vivo* del sobrenadante de M.hyo tratado con Proteína A demostrada en el Ejemplo 5 anterior junto con los resultados descritos en el presente ejemplo indicaron que el sobrenadante tratado con Proteína A era una plataforma potencialmente eficaz para combinaciones de M.hyo-CVP2.

Ejemplo 7: Evaluación de la efectividad de CVP2 de una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo en 1 frasco en diferentes formulaciones adyuvantes

Este estudio se diseñó para evaluar la efectividad de CVP2 en una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo en 1 frasco en diferentes formulaciones. En este ejemplo, el antígeno de CVP2 fue un virus quimérico CVP Tipo 1-Tipo 2 muerto (CVP Foster). El virus quimérico se combinó con una preparación de antígeno soluble de M.hyo que estaba sustancialmente libre de IgG (es decir, sobrenadante tratado con Proteína A).

Procesamiento de fluidos:

El fluido de fermentación de M.hyo inactivado (descrito anteriormente en el Ejemplo 1) se trató para cada grupo indicado como sigue.

5 T02-T04: El fluido de fermentación entero que contiene células vivas de *M. hyopneumoniae* (descrito anteriormente) se centrifugó a ~20.000 xg (Sorvall RC5B) y el sobrenadante se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 µM. La sefarsa Proteína A (número de parte 17-5199-03, GE Healthcare) se empaquetó en una columna de cromatografía de 1 l. Después de la retirada del tampón de almacenamiento y el tratamiento con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M, la resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón NaPO₄ 50 mM/NaCl 1 M, pH 7,04. Aproximadamente 2 litros de los fluidos que contienen antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificado/filtrado se pasaron a través de la resina de Proteína A a un caudal de 100 cm/h. El flujo a través se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 µM.

10 T05: Este es un control positivo que corresponde a una formulación similar a CVP Fostera (sin antígeno de M.hyo). El nivel del virus quimérico en esta formulación similar a CVP Fostera estaba aproximadamente a niveles de formulación de Dosis Mínima Inmunizante (DMI). El virus quimérico se incluyó en las vacunas experimentales CVP2/M.hyo a niveles de formulación similares.

15 Todas las vacunas CVP2/M.hyo experimentales se formularon con diferentes formulaciones adyuvantes. Las formulaciones de vacuna experimentales se prepararon con antígenos de M.hyo procesados de acuerdo con los tratamientos T02-T04 anteriores. Además, el tratamiento T01 correspondió a un placebo (solución salina esterilizada).

20 Todas las vacunas se estandarizaron con ELISA p46 y se conservaron con timerosol.

Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 6 a continuación, en la que el símbolo * indica el antígeno de M hyo de la semilla global de M hyo, el sobrenadante tratado con Proteína A y el símbolo ** indica el Número de serie del Producto Veterinario de Investigación (PVI).

25 **Tabla 6 Formulaciones de vacuna experimentales de CPV2/M.hyo usadas para el estudio de efectividad de CVP2**

Tratamiento	N.º de serie del IVP**	Ag CVP1-2	Ag de M Hyo*	Adyuvante	Otro
T01	87-244-DK (Placebo)	NA			Solución salina estéril
T02	L0411RK08	1,6 PR	7,5 PR	10 % de Aceite SP	NA
T03	L0411RK09			5 % de Anfígeno	
T04	L0611RK03			5 % de Anfígeno + 5 % de SLCD	
T05	L0611RK04		NA	20 % de SLCD	

30 Los cerdos a 3 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular con una dosis única de las diferentes formulaciones de vacuna descritas en la Tabla 6 anterior. Se incluyeron dieciséis animales en cada uno de los grupos de tratamiento. A los animales se les hizo una prueba de provocación 21 días después de la vacunación con un aislado en campo de CVP2 virulento.

35 La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de viremia de CVP2 (PCR cuantitativa de CVP2) observados con las diferentes plataformas adyuvantes. Nótese que se usó la viremia de CVP2 como la variable de efectividad primaria. Los resultados de viremia de CVP2 se presentan como copias de ADN/ml. Como se muestra en la figura 3, todos los tratamientos tuvieron significativamente menos viremia en comparación con el placebo los días 28, 35 y 42 (la prueba de provocación fue el día 21). El adyuvante al 10 % de aceite SP tuvo significativamente menos viremia en comparación con el 5 % de Anfígeno los Días 28 y 35. El adyuvante del 5 % de Anfígeno más 5 % de SLCD tuvo significativamente menos viremia en comparación con el 5 % de Anfígeno los Días 28 y 35. La plataforma adyuvante del 20 % de SLCD tuvo significativamente menos viremia en comparación con el 5 % de Anfígeno los Días 28, 35 y 42.

40 También se monitorizaron la serología del CVP2, la diseminación fecal del CVP2, la diseminación nasal del CVP2, las respuestas Inmunes Mediadas por Células (IMC), el agotamiento linfóide y la Inmunohistoquímica (IHQ) como variables de efectividad secundarias. Estos resultados se describirán ahora a continuación.

45 La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados del ELISA de CVP2 los días 1, 20 y 42 del estudio (la prueba de provocación fue el día 21). El estado de cada muestra se expresó como una muestra para la relación positiva (S/P). Como se muestra en la Figura 4, el 20 % de SLCD fue el único tratamiento que fue significativamente

diferente del placebo (T01) tanto el día 20 como el día 42. También, el 5 % de Anfígeno fue el único tratamiento no significativamente diferente del placebo el día 20.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la diseminación fecal de CVP2 obtenida con los tratamientos T02-T04 frente al placebo (T01). Estos resultados se expresan como copias de ADN de CVP2/ml. Los resultados de la Figura 5 indican que todos los tratamientos tuvieron significativamente menos diseminación fecal cuando se comparan con el placebo el día 42. Además, el 5 % de Anfígeno + 5 % de SLCD (T04) tuvo significativamente menos diseminación fecal en comparación con el 5 % de Anfígeno (T03) el día 42. No se observaron otras diferencias de tratamientos.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la diseminación nasal de CVP2 obtenida con los tratamientos T02-T04 frente al placebo (T01). Estos resultados se expresan como copias de ADN de CVP2/ml. Los resultados de la Figura 6 indican que todos los tratamientos tuvieron significativamente menos diseminación nasal cuando se comparan con el placebo el día 42. Además, el 20 % de SLCD (T05) tuvo significativamente menos diseminación nasal en comparación con el 5 % de Anfígeno (T03) el día 42. No se observaron otras diferencias de tratamientos.

La Figura 7 (A & B) son dos gráficos que muestran los resultados de un ensayo de interferón gamma (IFN-γ) que mide las respuestas inmunes mediadas por células (IMC) específicas de CVP2. Los resultados de IMC se muestran post-vacunación/pre-prueba de provocación (Figura 7A) y post-vacunación/post-prueba de provocación (Figura 7B). En estos gráficos, la estimulación de 5×10^6 células se consideró significativa (...). Todas las vacunas de experimento de CVP2/M.hyo dieron una respuesta de IFN-γ detectable post-vacunación. El 10 % de aceite SP (T02) dio la respuesta de IFN-γ más fuerte post-vacunación. El 20 % de SCLD (T05) indujo una respuesta temprana, pero la respuesta más baja el día 20. Hubo una gran respuesta post-prueba de provocación, vista especialmente en el grupo de placebo. Adicionalmente, la respuesta post-prueba de provocación fue menor en los grupos de tratamiento de cerdos vacunados en comparación con el grupo placebo.

La Tabla 7 a continuación muestra el agotamiento linfóide obtenido con los tratamientos experimentales contrastados con el placebo.

Tabla 7 Histopatología de CVP2 (Agotamiento linfóide)

Tratamiento	Agotamiento linfóide			Contrastado con el placebo	
	Positivo	Negativo	% Siempre pos.	valor p	Significativo
Placebo	9	7	56 %	NA	NA
10 % de Aceite SP	1	15	6 %	0,0059	Sí
5 % de Anfígeno	1	15	6 %	0,0059	Sí
5 % de Anf. + 5 % de SLCD	0	16	0 %	0,0008	Sí
20 % de SLCD	1	15	6 %	0,0059	Sí

Los resultados presentados en la Tabla 7 anterior muestran que todas las vacunas proporcionaron fuerte protección contra el agotamiento linfóide. También, no se observaron contrastes de tratamiento de vacuna estadísticamente significativos. La Tabla 8 a continuación muestra la inmunohistoquímica obtenida con los tratamientos experimentales contrastados con el placebo.

Tabla 8 Histopatología de CVP2 (Inmunohistoquímica)

Tratamiento	Inmunohistoquímica			Contrastado con el placebo	
	Positivo	Negativo	% Siempre pos.	valor p	Significativo
Placebo	12	4	75 %	NA	NA
10 % de Aceite SP	0	16	0 %	0,0001	Sí
5 % de Anfígeno	1	15	6 %	0,0002	Sí
5 % de Anf. + 5 % de SLCD	0	16	0 %	0,0001	Sí
20 % de SLCD	0	16	6 %	0,0001	Sí

Los resultados presentados en la Tabla 8 anterior muestran que todas las vacunas proporcionaron fuerte protección contra la colonización de CVP2 como se evidencia por inmunohistoquímica. También, no se observaron contrastes de tratamiento de vacuna estadísticamente significativos.

En conclusión, los resultados presentados en este ejemplo demuestran que la preparación de antígeno soluble de M.hyo no interfiere con la efectividad del CVP2. Los resultados también muestran que todas las formulaciones de vacuna experimentales de CVP/M.hyo proporcionan efectividad contra la prueba de provocación de CVP2. Adicionalmente, los resultados indican que hay algunas diferencias estadísticas y numéricas obtenidas con las diferentes formulaciones adyuvantes, produciendo el 10 % de Aceite SP la efectividad más fuerte.

Ejemplo 8: Evaluación de la efectividad de M.hyo de una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo en 1 frasco con diferentes formulaciones adyuvantes

Este estudio se diseñó para evaluar la efectividad de M.hyo en una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo de 1 frasco en diferentes formulaciones. El antígeno de M.hyo se combinó con el Circovirus Porcino (virus muerto Quimera Tipo 1-Tipo 2, o CVP1-2) en un frasco.

Procesamiento de fluidos:

El fluido de fermentación de M.hyo inactivado (descrito anteriormente en el Ejemplo 1) se trató para cada grupo indicado como sigue.

T02-T04: Estos tratamientos fueron los mismos que aquellos descritos para los grupos de tratamiento T02-T04 en el Ejemplo 7 anterior.

T05: Este se formuló con células de M.hyo inactivadas (bacterina de M.hyo) como se describe en el Ejemplo 1 anterior bajo el encabezado "Fermentación e inactivación".

Todas las vacunas CVP2/M.hyo experimentales se formularon con diferentes formulaciones adyuvantes. Las formulaciones de vacuna experimentales se prepararon con antígenos de M.hyo procesados de acuerdo con los tratamientos T02-T04. Además, el tratamiento T01 correspondió a un placebo (solución salina esterilizada). El tratamiento T05 es un control positivo que corresponde a una vacuna RespiSure® caducada, que es una vacuna a base de bacterina de M.hyo (Pfizer Animal Health).

Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 9 a continuación, en la que el símbolo * indica el antígeno de M.hyo de la semilla global de M.hyo, el sobrenadante tratado con Proteína A y el símbolo ** indica el Número de serie del Producto Veterinario de Investigación (PVI).

Tabla 9 Formulaciones de vacuna experimentales de CPV2/M.hyo usadas para el estudio de efectividad de M.hyo en diferentes formulaciones adyuvantes

Tratamiento	N.º de serie del IVP**	Ag CVP1-2	Ag de M Hyo*	Adyuvante	Otro
T01	87-244-DK (Placebo)	NA			Solución salina estéril
T02	L0411RK08	1,6 PR	7,5 PR	10 % de Aceite SP	NA
T03	L0411RK09			5 % de Anfígeno	
T04	L0611RK03			5 % de Anfígeno + 5 % de SLCD	
T05	A827870	Vacuna "RespiSure" caducada			

Los cerdos a 3 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular con una dosis única de las diferentes formulaciones de vacuna descritas en la Tabla 9 anterior. Se incluyeron catorce animales tanto en el placebo como en los grupos de 10 % de Aceite SP, se incluyeron trece animales en el grupo de control positivo y se incluyeron dieciséis animales tanto en el grupo del 5 % de Anfígeno como en el grupo del 5 % de Anfígeno + 5 % de SLCD.

A los animales se les hizo una prueba de provocación 21 días después de la vacunación con un aislado en campo de M.hyo virulento. Los animales se necropsiaron 28 días después de la prueba de provocación y los pulmones se retiraron y se puntuaron para la consolidación consistente con la infección por M.hyo. La Tabla 10 a continuación contiene las puntuaciones de lesiones de pulmón para los grupos de tratamiento respectivos. Se determinó la significancia estadística mediante un Modelo de Análisis Mixto de las puntuaciones de pulmón para cada grupo.

Tabla 10 Lesiones de pulmón de M.hyo

Tratamiento	n.º de animal	Lesión de pulmón media LS	Intervalo de % de lesión de pulmón
Placebo (T01)	14	13,1 %	0,1 - 50,5
10 % de Aceite SP (T02)	14	4,3 %	0,0 - 50,8
5 % de Anfígeno (T03)	16	4,7 %	0,0 - 38,5
5 % de Anf. + 5 % de SLCD (T04)	16	12,0 %	0,1 - 55,8
RSO caducada (T05)	13	2,28 %	0,0 - 34,5

Como se indica en la Tabla 10 anterior, el grupo placebo tuvo una puntuación de lesión de pulmón media del 13,1 %.

5 en comparación con los grupos de tratamiento del 10 % de Aceite SP y del 5 % de Anfígeno que tuvieron puntuaciones de pulmón medias del 4,3 % y del 4,7 %, respectivamente. Tanto las formulaciones del 10 % de Aceite SP como del 5 % de Anfígeno redujeron y/o previnieron las lesiones de pulmón. De esta manera, las vacunas de CVP/M.hyo experimentales formuladas con 10 % de Aceite SP o 5 % de Anfígeno se consideraron efectivas. El antígeno de CVP2 no pareció interferir con la efectividad de M.hyo de estas formulaciones.

Por el contrario, el grupo del 5 % de Anfígeno + 5 % de SLCD tuvo una puntuación de lesión de pulmón media del 12,0 % que fue un resultado inaceptable en que no fue diferente en comparación al placebo. Por consiguiente, el experimento de vacuna de CVP/M.hyo formulada con el 5 % de Anfígeno + 5 % de SLCD no se consideró efectivo.

10 Nótese que debido al número de animales reducido y la alta variabilidad en la puntuación de lesión de pulmón, no pudo demostrarse conclusivamente un efecto de tratamiento estadístico en este estudio. Por este motivo, se decidió que se diseñaría otro estudio para ensayar la efectividad de M.hyo de las formulaciones experimentales de CVP/M.hyo en 10 % de Aceite SP. Este estudio repetido se presenta en el Ejemplo 9 a continuación.

Ejemplo 9: Evaluación de la efectividad de M.hyo de una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo en 1 frasco en 10 % de Aceite SP

15 Este estudio es una prueba del concepto diseñado para evaluar la efectividad de la fracción de M.hyo de cuatro vacunas de CVP2/M.hyo experimentales (N.º de serie L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 y L0711RK14 en la Tabla 11 a continuación) preparadas mediante diferentes procedimientos de fabricación de M.hyo que utilizan Proteína A para la retirada de IgG en comparación con vacunas control preparadas con el procedimiento de fabricación de M.hyo convencional. Cada una de estas cuatro vacunas de CVP2/M.hyo experimentales incluyeron 10
20 % de Aceite SP como el adyuvante.

Procesamiento de fluidos:

T02: Antígeno de *M. hyopneumoniae* inactivada como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1 anterior.

25 T03 y T04: Formulado con células de *M. hyopneumoniae* inactivadas como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1 anterior.

T05: Tratamiento de Proteína A del medio usado para crecer *M. hyopneumoniae*. PPLO (derivado de corazón porcino) se fabricó según las directrices del fabricante (es decir, 21 g/l) y la solución de extracto de levadura se fabricó a 21 g/l en USP. La solución del extracto de levadura se añadió al PPLO al 6,25 % y la mezcla se esterilizó calentando a 121 °C durante \geq 30 minutos. Se preparó clorhidrato de cisteína a 90 g/l y se esterilizó por
30 filtración. La solución de dextrosa se fabricó añadiendo 450 g de dextrosa por litro de agua USP seguido de esterilización por calor. Para preparar el medio final, se añadió suero porcino al medio base al 10 % seguido de cisteína al 0,01 % y dextrosa al 1,0 %. Los anticuerpos en el medio PPLO completo se retiraron mediante el tratamiento con proteína A. Brevemente, se empaquetó un litro de Sefarosa Proteína A (número de parte 17-5199-03 GE Healthcare) en una columna de vidrio (10 X 11,5 cm). Después de la retirada del tampón de
35 almacenamiento, la columna se trató con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M. La resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón NaPO₄ 50 mM, NaCl 1 M (pH 7,0). Se cargaron quince litros de medio PPLO completo en la resina a un caudal lineal de 140 cm/hora. El flujo a través de la columna se recogió y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros (Sartorius). El medio tratado se usó para propagar células de *M. hyopneumoniae* como se describe en "Fermentación e inactivación" anteriormente. El cultivo inactivado entero (incluyendo las células) se formuló en la vacuna final.

T06: Las células de *M. hyopneumoniae* inactivadas se prepararon como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1 anterior. El fluido de fermentación inactivado se centrifugó a ~20.000 xg (Sorvall RC5B) durante 30 min y el sobrenadante se esterilizó a través de filtración de 0,2 μ M. Ciento quince ml de resina de Proteína A (número de parte 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) se empaquetó en una columna de cromatografía (5x6 cm). Después de la retirada del tampón de almacenamiento y el tratamiento con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M, la resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón NaPO₄ 50 mM/NaCl 1 M, pH 7,01. Aproximadamente 1,2 litros de los fluidos que contienen antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificado/filtrado se pasaron a través de la resina a un caudal de 120 cm/h. El flujo a través se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 μ M.

50 T07: Las células de *M. hyopneumoniae* inactivadas se prepararon como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1 anterior. El fluido de fermentación inactivado se clarificó a través de filtración de flujo tangencial. En resumen, un filtro de poliéter sulfona (GE HealthCare, número de parte 56-4102-71), con tamaño de poro nominal de 0,2 μ M se desinfectó con solución de hidróxido sódico 0,5 N seguido de enjuagado extensivo con agua USP estéril. El fluido de cultivo de micoplasma inactivado se introdujo en el aparato a una
55 velocidad de recirculación diana a 14,6 l/minuto y una presión transmembrana de 13,78-23,44 kPa. La clarificación se realizó a temperatura ambiente. El permeado del filtro se recogió y se almacenó a 2-8 °C hasta el procesamiento adicional. Ciento quince ml de resina de Proteína A (número de parte 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) se empaquetó en una columna de cromatografía (5x6 cm). Después de la retirada del tampón de almacenamiento y el tratamiento con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M, la resina se equilibró con 5
60 volúmenes de columna de tampón NaPO₄ 50 mM/NaCl 1 M, pH 7,01. Aproximadamente 2,3 litros de los fluidos que contienen antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificado/filtrado se pasaron a través de la resina a un caudal de

120 cm/h. El flujo a través se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 µM.

5 T08: Las células de *M. hyopneumoniae* inactivadas se prepararon como se describe en "Fermentación e inactivación" anteriormente. El fluido de fermentación inactivado se centrifugó a ~20.000 xg (Sorvall RC5B) durante 30 min y el sobrenadante se esterilizó a través de filtración de 0,2 µM. Se empaquetaron ciento quince ml de Sefarosa Proteína A (número de parte 17-5199-03 GE Healthcare) en una columna de cromatografía (5x6 cm). Después de la retirada del tampón de almacenamiento y el tratamiento con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M, la resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón NaPO₄ 50 mM/NaCl 1 M, pH 7,01. Aproximadamente 1,2 litros de los fluidos que contienen antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificado/filtrado se pasaron a través de la resina a un caudal de 120 cm/h. El flujo a través se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 µM.

10 Las formulaciones de vacuna experimentales se prepararon con antígenos de *M.hyo* procesados de acuerdo con los tratamientos T02-T08 anteriores. T02, T03 y T04 corresponden a controles positivos. Además, el tratamiento T01 correspondió a un placebo (solución salina esterilizada).

15 Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 11 a continuación. El antígeno de *M.hyo* corresponde al antígeno de *M.hyo* del sobrenadante tratado con Proteína A de la semilla de *M.hyo* global. La información en la columna "Tratamiento de Proteína A" indica si el sobrenadante de *M.hyo* se trató con Proteína A antes o después de la fermentación.

Tabla 11 Formulaciones de vacuna experimentales de CPV2/M.hyo usadas para el estudio de efectividad de M.hyo en Adyuvante aceite SP

Tratamiento	N.º de serie	Ag CVP1-2	Ag de M.hyo	Tratamiento de Proteína A	Procedimiento de clarificación del sobrenadante	Marca de Proteína A	Adyuvante	Otro
T01	L0311AS11				NA			Solución salina estéril
T02	A828718	NA	13		Una "RespiSure" caducada		Amfigeno	
T03	L0711RK09	1,5 PR			M.hyo sin tratamiento de Proteína A y con CVP-2			
T04	L0711RK10	NA			M.hyo sin tratamiento de Proteína A y sin CVP-2			
T05	L0711RK11		7,5 PR	Antes	NA	Sefarosa	10 % de aceite SP	NA
T06	L0711RK12			Después	Centrifuga	MAbSelect		
T07	L0711RK13	1,5 PR		Después	Filtro	MAbSelect		
T08	L0711RK14			Después	Centrifuga	Sefarosa		

Los cerdos a 3 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular con una dosis única de las diferentes formulaciones de vacuna descritas en la Tabla 11 anterior. Hubo 18 cerdos incluidos en cada grupo de tratamiento. A los animales se les hizo una prueba de provocación 21 días después de la vacunación con un aislado en campo de M.hyo virulento. Los animales se necropsiaron 28 días después de la prueba de provocación y los pulmones se retiraron y se puntuaron para la consolidación consistente con la infección por M.hyo. La Figura 8 (A & B) muestra las puntuaciones de lesiones de pulmón para los grupos de tratamiento respectivos. Se determinó la significancia estadística mediante un Modelo de Análisis Mixto de las puntuaciones de pulmón para cada grupo.

Los resultados de lesión de pulmón representados en las Figuras 8A y 8B indican que de todos los tratamientos, solamente dos (T07 y T08) tuvieron un 100 % de cerdos en la categoría de lesión de pulmón de <5 %. Nótese que la diferencia estadística más fuerte se observó en este estudio.

Los resultados en el presente ejemplo demuestran la efectividad de M.hyo significativa en una formulación experimental de CVP2/M.hyo en 1 frasco que emplea el sobrenadante de M.hyo tratado con Proteína A y que utiliza el aceite SP como el adyuvante. Adicionalmente, El Ejemplo 7 anterior demostró la efectividad de CVP2 en una formulación de CVP2/M.hyo en 1 frasco que emplea el sobrenadante de M.hyo tratado con Proteína A y que utiliza el aceite SP como el adyuvante. En conjunto, se ha demostrado tanto la efectividad de M.hyo como de CVP2 en las combinaciones de CVP2/M.hyo en 1 frasco que emplean el sobrenadante de M.hyo tratado con Proteína A.

Ejemplo 10: Seguridad *in vivo* de las vacunas experimentales de CVP2/M.hyo experimentales

Este estudio se llevó a cabo para evaluar la seguridad *in vivo* de las vacunas de CVP2-M.hyo formuladas a dosis de antígeno máxima en diversas formulaciones adyuvantes en el animal hospedador cuando se dan a la edad más joven (3 semanas de edad). Se evaluaron diferentes plataformas adyuvantes para determinar cuál de estas plataformas proporcionó un perfil de seguridad aceptable a base de la temperatura, las reacciones del sitio de inyección y las observaciones clínicas. Se usó una formulación del 20 % de SLCD/10 % de Aceite SP como un control positivo ("no seguro") debido a los problemas históricos con las reacciones del sitio de inyección observadas por este grupo de investigación y otros.

Procesamiento de fluidos:

Todas las vacunas se prepararon con antígeno de *M. hyopneumoniae* inactivado como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1. Se usó el antígeno a granel entero de M.hyo ya que se sabe que contiene antígenos de M.hyo solubles e insolubles, además de las inmunoglobulinas y los inmunocomplejos que se retirarían tras el tratamiento de Proteína A. Es razonable concluir que la retirada de los restos celulares insolubles y las inmunoglobulinas y los inmunocomplejos solamente potenciará adicionalmente la seguridad de las formulaciones de vacuna. La intención de este estudio fue ensayar de forma rigurosa la seguridad de las diversas formulaciones adyuvantes que contienen antígeno de CVP2 y antígeno de M.hyo. Los antígenos de CVP2 y de M.hyo se formularon a niveles de liberación máximos para evaluar adicionalmente la seguridad. Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 12 a continuación. PVI indica Producto Veterinario de Investigación (PVI).

Tabla 12 Formulaciones de vacuna experimentales de CPV2/M.hyo usadas para el estudio de seguridad

N.º de serie del IVP	Ag CVP1-2	Ag de M Hyo*	Adyuvante	Otro	Vol. de vacuna mínimo (ml)
87-244-DK (Placebo)			NA	Solución salina estéril	NA
L0411RK15	7,8 PR	13 PR	10 % de Aceite SP	NA	200
L0411RK16			5 % de Anfígeno		200
L0611RK05			5 % de Anfígeno + 5 % de SLCD		200
L0611RK06			20 % de SLCD + 10 % de Aceite SP		200

* Antígeno de M Hyo = de la semilla de M hyo global (antígeno a granel entero).

Los parámetros de seguridad empleados en este estudio fueron el perfil de temperatura rectal y la reacción del sitio de inyección. Los resultados de este estudio indicaron que todas las plataformas adyuvantes candidatas proporcionaron un perfil de seguridad aceptable en términos del perfil de temperatura rectal y las observaciones clínicas (resultados no mostrados). Solamente el 20 % de SLCD + 10 % de Aceite SP (es decir, el control positivo) fue significativamente diferente de la vacuna de placebo y tuvo un número de reacciones graves del sitio de inyección (resultados no mostrados).

Ejemplo 11: Preparación de antígeno de M.hyo tratado con Proteína A para estudios fundamentales

La Figura 9 es un diagrama de flujo que muestra una realización de un procedimiento de fabricación usado para preparar un antígeno de M.hyo tratado con Proteína A compatible con el CVP2. Los cultivos enteros inactivados de

M.hyo se clarificaron de células a través de filtración de flujo tangencial. En resumen, un filtro de poliéter sulfona (GE Healthcare, número de parte 56-4102-49), con tamaño de poro nominal de 0,45 µm se desinfectó con solución de hidróxido sódico 0,5 N seguido de enjuagado extensivo con agua USP estéril. El fluido de cultivo de micoplasma inactivado se introdujo en el aparato a una velocidad de recirculación diurna a 11,0 l/minuto y una presión transmembrana de ~34,47 kPa. La clarificación se realizó a temperatura ambiente. El permeado del filtro se recogió y se almacenó a 2-8 °C hasta el procesamiento adicional.

Tras la clarificación, los fluidos que contienen antígeno se trataron con resina de proteína A para reducir los niveles de anticuerpo. En resumen, la resina de proteína A MAbSelect (GE Healthcare) se empaquetó en una columna de vidrio a una altura de 12 cm. La resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato sódico 50 mM, tampón NaCl 250 mM (pH 7,0). El fluido que contiene antígeno, equivalente a 10 volúmenes de columna, se cargó en la resina a un caudal lineal de 100 cm/hora. El flujo a través de la columna se recogió y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros. La regeneración de la columna se logró haciendo fluir 3 volúmenes de columna de solución de acetato 25 mM a pH 3,7 seguido de 4 volúmenes de columna de solución de ácido acético 1 M. Los anticuerpos anti-CVP2 y los niveles de antígeno de *M. hyopneumoniae* se midieron en el fluido de antígeno final a través del ELISA de anticuerpo específico de CVP2 y el ELISA de cuantificación de antígeno p46, respectivamente.

Ejemplo 12: Evaluación de la actividad viricida contra el virus del SRRP

Los estudios presentados en este ejemplo se diseñaron para evaluar las diversas plataformas adyuvantes para la actividad viricida contra el virus del SRRP. Los experimentos iniciales se centraron en el adyuvante solo (es decir, las formulaciones no contuvieron antígenos de CVP o de M.hyo). La evaluación del adyuvante para la actividad viricida del SRRP se presenta en la Figura 10. La evaluación viricida preliminar indicó que el 10 % de Aceite SP, el 0,2 % de Carbopol y el 2,5 % de Anfígeno no son viricidas para el virus del SRRP. Por el contrario, el adyuvante del 20 % de SLCD pareció ser viricida para el virus del SRRP.

Se llevaron a cabo estudios adicionales para evaluar si las formulaciones de CVP/M.hyo adyuvantadas con las diferentes plataformas adyuvantes no fueron viricidas para el virus del SRRP. Estos resultados se presentan en la Tabla 13 a continuación, en la que el símbolo * indica aquellos números de serie de vacunas que fueron viricidas para el virus del SRRP.

Tabla 13 Resultados del ensayo viricida de SRRP con diferentes formulaciones

Número de serie de vacuna usado en estudios de los Ejemplos 7, 8, 10		N.º de serie	Potencia		Viricida SRRP	
Estudio	Descripción		PR p46 (ru/ds)	CVP2 NVSL PR	A	B
Ejemplos 7, 8, 10	Solución salina estéril (cloruro sódico al 0,9 %)	87-244-DK (Placebo)				
Ejemplos 7, 8	CVPq (PR 1,6) + M Hyo tratado con Prot A (PR 7,5) en 10 % de Aceite SP	L0411RK08	7,1	1,29	-0,10	-0,13
Ejemplos 7, 8	CVPq (PR 1,6) + M Hyo tratado con Prot A (PR 7,5) en 5 % de Anfígeno	L0411RK09	7,3	1,33	-0,10	+0,14
Ejemplos 7, 8	CVPq (PR 1,6) + M Hyo tratado con Prot A (PR 7,5) en 5 % de Anf. + 5 % de SLCD	L0611RK03	6,9	1,15	-0,36	-0,33
Ejemplo 7	CVPq (PR 1,6) monovalente en 20 % de SLCD	L0611RK04		1,50	-1,86*	-0,50
Ejemplo 8	Número de serie de una RespiSure caducada	A827870	12,6			
Ejemplo 10	CVPq (PR 7,8) + M Hyo a granel entero (PR 13,3) en 10 % de Aceite SP	L0411RK15	14	1,03	-0,32	-0,03
Ejemplo 10	CVPq (PR 7,8) + M Hyo a granel entero (PR 13,3) en 5 % de Anfígeno	L0411RK16	15,5	1,12	-0,36	-0,53
Ejemplo 10	CVPq (PR 7,8) + M Hyo a granel entero (PR 13,3) en 5 % de Anf. + 5 % de SLCD	L0611RK05	17,5	1,50	-0,54	-0,33
Ejemplo 10	CVPq (PR 7,8) + M Hyo a granel entero (PR 13,3) en 20 % de SLCD + 10 % de Aceite SP	L0611RK06	15,9	1,13	-1,93*	-0,99*

*Indica Viricida (pérdida de >0,7 log)
A - Control de ensayo viricida GMT ~ 5,53 log/ml
B - Control de ensayo viricida GMT ~ 6,42 log/ml

Los resultados presentados en la Tabla 13 anterior indican que el 10 % de Aceite SP no es viricida para el virus del SRRP. Se prepararon números de serie de vacunas de CVP/M.hyo adicionales usando 10 % de Aceite SP como el

adyuvante (Tabla 14). Los resultados mostrados en la Tabla 14 a continuación demuestran además que el 10 % de Aceite SP no es viricida para el virus del SRRP. Los valores de muestra de ensayo en la Tabla 14 fueron cada uno más alto (signo +) que en el control de ensayo viricida, que tuvo un título de media geométrica (GMT) de aproximadamente $5,9 \pm 0,5$ log/ml.

5 **Tabla 14 Resultados del ensayo viricida con diferentes formulaciones de CVP/M.hyo adyuvantadas con 10 % de Aceite SP**

N.º de serie de vacuna usado	N.º de serie	Potencia		Viricida SRRP
		PR p46 (ru/ds) Referencia L1211RK15	CVP2 NVSL Referencia L1211RK15	log10 DICT50/ml
Diluyente estéril (agua estéril)	1949122	na	na	
CVPq + M Hyo tratado con Prot A en 10 % de Aceite SP	L0912RK12	1,62	2,60	+0,58
CVPq + M Hyo tratado con Prot A en 10 % de Aceite SP	L0912RK10	0,88	1,23	+0,58
CVPq + M Hyo tratado con Prot A en 10 % de Aceite SP	L0912RK11	1,24	2,62	+0,58
CVPq + M Hyo tratado con Prot A en 10 % de Aceite SP	L0912RK08	1,08	1,03	+0,91
CVPq + M Hyo tratado con Prot A en 10 % de Aceite SP	L0912RK09	1,65	2,06	+0,50
Control de ensayo viricida GMT ~ $5,9 \pm 0,5$ log/ml				

10 Los resultados presentados en este ejemplo demuestran que el 10 % de Aceite SP no es viricida para el virus del SRRP. Los resultados presentados en este ejemplo demuestran además que la formulación de CVP/M.hyo adyuvantada con 10 % de Aceite SP estuvo entre aquellos números de serie de vacunas que se consideraron no viricidas para el virus del SRRP (Tabla 13 y Tabla 14). En conclusión, la formulación de CVP/M.hyo adyuvantada con 10 % de Aceite SP se consideró una plataforma eficaz en la que basar una combinación trivalente que incluya CVP, M.hyo y el virus de SRRP.

Ejemplo 13: Preparación de una vacuna de combinación de CVP/M.hyo/SRRP

15 Una formulación de CVP/M.hyo adyuvantada con una plataforma adyuvante que no es viricida para el virus del SRRP (véanse la Tabla 13 y la Tabla 14 anteriores), se proporciona como una composición líquida en un frasco lista para su uso. Esta formulación de CVP/M.hyo en 1 frasco emplea sobrenadante de M.hyo tratado con Proteína A. Se ha demostrado tanto la efectividad de M.hyo como de CVP2 en tales formulaciones de CVP2/M.hyo que emplean el sobrenadante de M.hyo tratado con Proteína A (véanse los Ejemplos 7-9). En el presente ejemplo, esta formulación divalente de CVP2/M.hyo se combina con un antígeno del virus del SRRP monovalente.

20 En una realización, una combinación de CVO/M.hyo en 10 % de Aceite SP y correspondiente a uno de los números de serie de vacunas L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 y L0711RK14 en la Tabla 11 anterior se proporciona como una composición líquida en un frasco lista para su uso. Los resultados presentados en el Ejemplo 12 anterior demostraron que el 10 % de Aceite SP no es viricida para el virus del SRRP. El Ejemplo 12 también demostró que las formulaciones de CVP2/M.hyo adyuvantadas con 10 % de Aceite SP estaban entre aquellos números de serie de vacunas que se consideraron no viricidas para el virus del SRRP. En el presente ejemplo, tal composición líquida de CVP2/M.hyo en 1 frasco se usa para rehidratar una composición del virus del SRRP vivo liofilizado modificado genéticamente contenida en un segundo frasco, de tal manera que todos los antígenos se contienen en un único frasco antes de administrarse a un cerdo de edad adecuada (por ejemplo, a 3 semanas de edad o más mayor).

30 En una realización, el virus del SRRP tiene la secuencia genómica que corresponde a SEQ ID NO: 16 o una variante de la misma. En otra realización, el virus del SRRP empleado en la composición trivalente es el aislado del virus SRRP designado ISU-55, que se depositó en la ATCC bajo el número de acceso VR 2430. Las cantidades adecuadas de los antígenos respectivos se describen en el presente documento. De forma deseable, todos los antígenos se administran en una única dosis al cerdo.

35 **Ejemplo 14: Evaluación de la efectividad de CVP2 de una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo/SRRP seguida de una prueba de provocación de CVP2**

40 Este estudio se diseñó para evaluar la efectividad de la quimera CVP1-2, la fracción de virus muerto de una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo/SRRP experimental, administrada intramuscularmente una vez a cerdos a 3 semanas de edad y con prueba de provocación con un aislado de CVP2 virulento tres semanas después de la vacunación. Estas vacunas trivalentes incluyeron la Quimera del Circovirus Porcino de Tipo 1-Tipo 2, el virus muerto, la Vacuna del Síndrome Respiratorio y Reproductivo, Forma respiratoria, el virus vivo modificado y el extracto

bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

5 Esta combinación trivalente se preparó rehidratando un virus del SRRP vivo liofilizado modificado genéticamente (SRRP-VVM) con una formulación líquida en un frasco incluyendo una combinación de la quimera del circovirus porcino Tipo 1-Tipo 2, virus muerto y el extracto bacteriano de M.hyo (CVP2/M.hyo), que se adyuvanta usando 10 % de Aceite SP (véase el Ejemplo 13 anterior). Las formulaciones experimentales administradas a lo largo del transcurso del presente estudio se describen en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15 Formulaciones de vacuna experimentales de CPV2/M.hyo/SRRP usadas para el estudio de efectividad de CVP2

Grupo	N	PC o PVI	N.º de serie	Antígeno Entrada ¹	Días de estudio		
					Vacunación	Prueba de provocación	Necropsia
T01	24	M Hyo	L1012RK10	≥ 153 UA/ml	Día 0 2 ml IM cuello a la izquierda	Día 21 1 ml IM 2 ml IN 40895	Día 42 ± 3 días
		VSRRP VVM	L1011CM14	4,5 log ₁₀ DICT50			
T02	24	CVP2 M Hyo	L0912RK08	0,688 % 102 UA/ml			
		VSRRP VVM	L1011CM14	4,5 log ₁₀ DICT50			
T03	24	CVP2 M Hyo	L0912RK09	1,375 % 153 UA/ml			
		VSRRP VVM	L1011CM14	4,5 log ₁₀ DICT50			

PVI = Producto Veterinario de Investigación
 PC = Producto Control
 IM = Intramuscularmente
 IN = Intranasal
¹% = antígeno CVP2, UA/ml = antígeno de M Hyo, log₁₀ DICT50 = antígeno del VSRRP

10 Los cerdos a 3 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular con una dosis única de las diferentes formulaciones de vacuna descritas en la Tabla 15 anterior. Se incluyeron veinticuatro animales en cada uno de los grupos de tratamiento. A los animales se les hizo una prueba de provocación 21 días después de la vacunación con un aislado de CVP2a virulento.

15 Los resultados de viremia de CVP2 (PCR cuantitativa de CVP2) observados en este estudio se presentan en la Figura 11. Nótese que se usó la viremia de CVP2 como la variable de efectividad primaria. Los resultados de viremia de CVP2 se presentan como copias de ADN/ml. Como se muestra en la Figura 11, todos los tratamientos tuvieron significativamente menos viremia (P<0,001) en comparación con el placebo los días 28, 35 y 42 (la prueba de provocación fue el día 21).

20 También se monitorizaron como variables de efectividad secundarias la serología del CVP2, la diseminación fecal del CVP2, el agotamiento linfoide y la inmunohistoquímica (IHQ) en este estudio. Estos resultados se describen a continuación.

25 Los resultados de serología del CVP2 se presentan en la Figura 12, que muestra los resultados del ELISA de CVP2 los días -1, 7, 13, 20, 28, 35 y 42 del estudio (la prueba de provocación fue el día 21). El estado de cada muestra se expresó como una muestra para la relación positiva (S/P). Estos resultados muestran que en comparación con el grupo placebo, ambos tratamientos tuvieron títulos de anticuerpo de CVP2 post-prueba de provocación significativamente más altos (P<0,0345).

La diseminación fecal de CVP2 obtenida con los tratamientos T02 y T03 frente al placebo (T01) se presenta en la Figura 13. Estos resultados se expresan como copias de ADN de CVP2/ml. Los resultados de la Figura 13 indican que tanto el tratamiento T02 como el T03 tuvieron significativamente menos diseminación fecal (P<,0001) cuando se comparan con el placebo los días 35 y 42.

30 La Tabla 16 a continuación muestra la protección significativa contra el agotamiento linfoide obtenido con el tratamiento experimental (T02) contrastado con el placebo.

Tabla 16 Histopatología de CVP2 (Agotamiento linfoide)

Tratamiento	Agotamiento linfoide			Contrastado con el placebo	
	Positivo	Negativo	% Siempre pos.	valor p	Significativo
Placebo	13	8	61,9 %	NA	NA
T02	3	17	15 %	0,047	Sí
T03	7	13	35 %	0,0780	No

Los resultados presentados en la Tabla 17 a continuación muestran la protección significativa contra el reemplazamiento histiocítico obtenido con el tratamiento experimental (T02) contrastado con el placebo.

Tabla 17 Histopatología de CVP2 (Reemplazamiento histiocítico)

Tratamiento	Reemplazamiento histiocítico			Contrastado con el placebo	
	Positivo	Negativo	% Siempre pos.	valor p	Significativo
Placebo	11	10	52,4 %	NA	NA
T02	2	18	10 %	0,0105	Sí
T03	6	14	30 %	0,1566	No

- 5 La Tabla 18 a continuación muestra la inmunohistoquímica obtenida con los tratamientos experimentales contrastados con el placebo. Ambas vacunas (T02 y T03) mostraron protección significativa ($P < 0,0059$) contra la colonización del antígeno de CVP2 en tejidos linfoides.

Tabla 18 Histopatología de CVP2 (Inmunohistoquímica)

Tratamiento	Inmunohistoquímica			Contrastado con el placebo	
	Positivo	Negativo	% Siempre pos.	valor p	Significativo
Placebo	14	7	66,7 %	NA	NA
T02	3	17	15 %	0,0030	Sí
T03	4	16	20 %	0,0059	Sí

- 10 En conclusión, los resultados presentados en este ejemplo demuestran que las vacunas experimentales usadas en este estudio demostraron efectividad contra una prueba de provocación de CVP2. Ambos niveles de potencia de las vacunas proporcionaron protección significativa contra la variable primaria así como la colonización de CVP2. Sin embargo, el grupo T02 también proporcionó protección significativa contra lesiones de CVP2 (agotamiento linfoide y reemplazamiento histiocítico).

15 **Ejemplo 15: Evaluación de la efectividad de M.hyo de una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo/SRRP seguida de una prueba de provocación de M. hyo**

- Este estudio se diseñó para evaluar la efectividad de la fracción de M.hyo de una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo/SRRP experimental, administrada intramuscularmente en cerdos susceptibles a 3 semanas de edad y con prueba de provocación con un aislado de *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento tres semanas después de la vacunación. Estas vacunas trivalentes incluyeron la Quimera del Circovirus Porcino de Tipo 1-Tipo 2, el virus muerto, la Vacuna del Síndrome Respiratorio y Reproductivo, Forma respiratoria, el virus vivo modificado y el extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Procesamiento de fluidos:

El fluido de fermentación de M.hyo inactivado clarificado (descrito anteriormente en el Ejemplo 11) se usó para cada grupo de tratamiento como sigue.

- 25 T01: Un tratamiento de control negativo que consistía en una vacuna de CVP1-2 sin antígeno de *M. hyopneumoniae* se usó como diluyente en una vacuna viva modificada del VSRRP liofilizada.
T02: El antígeno de *M. hyopneumoniae* inactivado se combinó con el Circovirus Porcino (virus muerto Quimera Tipo 1-Tipo 2, o CVP1-2) en un frasco. La combinación CVP1-2/M. hyo se usó como diluyente en una vacuna viva modificada del VSRRP liofilizada.
30 T03: El antígeno de *M. hyopneumoniae* inactivado como se describe anteriormente en el Ejemplo 11 con una etapa adicional para concentrar el antígeno 20X por filtración molecular se combinó con el Circovirus Porcino (Quimera Tipo 1-Tipo 2, o CVP1-2, virus muerto) en un frasco. La combinación CVP1-2/M. hyo se usó como diluyente en una vacuna viva modificada del VSRRP liofilizada.

- 35 Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 19 a continuación. En la tabla 19, PC es producto control y PVI es Producto veterinario de investigación. El antígeno de M.hyo corresponde al antígeno de M.hyo del

sobrenadante tratado con Proteína A de la semilla de M.hyo global.

Tabla 19 Formulaciones de vacuna experimentales de CPV2/M.hyo/SRRP usadas para el estudio de efectividad de M. hyo

Grupo	N	PC o PVI	N.º de serie	Potencia
NTX	5	Centinela		
T01	25	PCV2	L0412RK13	4,3 Unidades de Potencia Relativa
		VSRRP VVM	L1011CM14	4,5 +/- 0,5 LOG10 FAID ₅₀ /ml
T02	25	CVP2 M Hyo	L1211RK12	4,5 Unidades de Potencia Relativa 2,7 Unidades de Potencia Relativa
		VSRRP VVM	L1011CM14	4,5 +/- 0,5 LOG10 FAID ₅₀ /ml
T03	25	CVP2 M Hyo concentrado por filtración	L0712RK33	3,4 Unidades de Potencia Relativa 2,7 Unidades de Potencia Relativa
		VSRRP VVM	L1011CM14	4,5 +/- 0,5 LOG10 FAID ₅₀ /ml

5 Los cerdos a 3 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular con una dosis única de las diferentes formulaciones de vacuna descritas en la Tabla 19 anterior. A los animales se les hizo una prueba de provocación 20 días después de la vacunación con un aislado en campo de M.hyo virulento. Veinticinco animales completaron el estudio en el grupo T01 y T03 y 24 completaron el estudio en el grupo T02. Los animales se necropsiaron 28 días después de la prueba de provocación y los pulmones se retiraron y se puntuaron para la consolidación consistente con la infección por M.hyo. La Tabla 20 a continuación contiene las puntuaciones de lesiones de pulmón para los grupos de tratamiento respectivos. Se determinó la significancia estadística mediante un Modelo de Análisis Mixto de las puntuaciones de pulmón para cada grupo.

Tabla 20 Lesiones de pulmón de M.hyo

Tratamiento	n.º de animal	Lesión de pulmón media LS	Intervalo de % de lesión de pulmón
T01: CVP1-2, VSRRP VVM	25	7,65 %	0,00 a 44,75
T02: CVP1-2/M.hyo, VSRRP VVM	24	4,38 %	0,10 a 20,95
T03: CVP/Mhyo concentrado por filtración, VSRRP VVM	25	2,23 %	0,00 a 17,95

15 En comparación con el grupo control negativo (T01), el grupo T03 de tratamiento demostró una reducción significativa ($P \leq 0,05$) en el porcentaje de pulmón con lesión comparado con T01. El porcentaje de lesiones de pulmón para T02 no fue significativamente diferente de T01 o bien T03.

Los resultados en el presente ejemplo demuestran que una formulación de vacuna trivalente experimental (tratamiento T03) usada en este estudio proporcionó efectividad significativa contra la prueba de provocación de M.hyo.

Ejemplo 16: Evaluación de la efectividad de VSRRP de una vacuna de combinación de CVP/M.hyo/SRRP

20 Este estudio se diseñó para evaluar la efectividad de la fracción de VSRRP de una vacuna de combinación de CVP2/M.hyo/SRRP experimental.

Sumario del estudio:

25 En el Día 0, se seleccionan aproximadamente 102 cerdos clínicamente sanos de tres semanas de edad seronegativos al VSRRP, al VGP y a *M. hyopneumoniae* y libres de viremia del CVP por PCR se seleccionan y se asignan (bloqueados por camada) a uno de los cuatro grupos de tratamiento (24 por grupo) o un grupo centinela (NTX) (6). A los cerdos se administró una única dosis intramuscular (IM) de 2 ml de una Quimera del Circovirus Porcino Tipo 1-Tipo 2 experimental, Vacuna de virus muerto - Extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (T01) o una vacuna de Quimera del Circovirus Porcino Tipo 1-Tipo 2 - Síndrome Respiratorio y Reproductivo experimental, Forma respiratoria, Virus vivo modificado y muerto - Extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (T02, T03 y T04). Los animales del grupo NTX se alojan en un corral separado de los grupos de tratamiento durante la fase de vacunación del estudio. Cuatro semanas después de la vacunación los cerdos NTX se eutanizan y necropsian, antes del realojamiento de los grupos de tratamiento, para confirmar la ausencia de las lesiones de pulmón de VSRRP. A todos los cerdos tratados se les realiza una prueba de provocación con una cepa de provocación de VSRRP virulenta (NADC20). Todos los cerdos restantes se eutanizan y necropsian diez (10) días después de la prueba de provocación. En la necropsia, el porcentaje de consolidación para cada lóbulo del pulmón (craneal izquierdo, medio izquierdo, caudal izquierdo, craneal derecho, medio derecho, caudal derecho y accesorio) se puntúa y se registra como porcentaje del lóbulo observado con lesiones. El estado negativo de VSRRP de los

cerdos de T01 se ensaya (ELISA IDEXX) antes de la prueba de provocación. Las observaciones clínicas se registran una vez al día durante la duración del estudio y los pesos corporales se toman antes de la prueba de provocación y en la necropsia.

5 Las formulaciones experimentales se describen a continuación y en la Tabla 21. El lote de control de antígeno de M.hyo se prepara como se describe en el Ejemplo 11 anterior. El antígeno de CVP2 es un antígeno de CVPq1-2 muerto preparado como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Antes de la inactivación del virus quimérico, el lote de antígeno de CVP2 se concentró 20X y los concentrados se lavaron con una solución salina equilibrada. La formulación en un frasco de CVP/M.hyo (adyuvantada en 10 % de Aceite SP) se usa para rehidratar el VSRRP vivo modificado liofilizado.

10 T01: Preparación experimental de la Quimera del Circovirus Porcino de Tipo 1 - Tipo 2 de alto pasaje, virus muerto (1,65 % del lote de antígeno concentrado 20X) y Extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dosis-9,0 PR; 153 UA/ml). La preparación T01 corresponde al número de serie L0912RK12 (PCV/M.hyo) y es un control negativo (sin antígeno de VSRRP).

15 T02: Preparación experimental de la Vacuna de Quimera del Circovirus Porcino de Tipo 1 - Tipo 2 de alto pasaje, virus muerto (1,65 % del lote de antígeno concentrado 20X) y Extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dosis - 9,0 PR; 153 UA/ml) y Preparación experimental de Vacuna del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de alto pasaje Forma respiratoria, Virus Vivo Modificado (DMI ≤ 2,5 logs). La preparación T02 corresponde al número de serie L0912RK12 (PCV/M.hyo) + (SRPP VVM a DMI ≤ 2,5 logs).

20 T03: Preparación experimental de la Vacuna de Quimera del Circovirus Porcino de Tipo 1 - Tipo 2 de alto pasaje, virus muerto (1,65 % del lote de antígeno concentrado 20X) y Extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dosis - 9,0 PR; 153 UA/ml) y Preparación experimental de Vacuna del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de alto pasaje Forma respiratoria, Virus Vivo Modificado (DMI ≤ 3,0 logs). La preparación T03 corresponde al número de serie L0912RK12 (PCV/M.hyo) + (SRPP VVM a DMI ≤ 3,0 logs).

25 T04: Preparación experimental de la Vacuna de Quimera del Circovirus Porcino de Tipo 1 - Tipo 2 de alto pasaje, virus muerto (1,65 % del lote de antígeno concentrado 20X) y Extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dosis - 9,0 PR; 153 UA/ml) y Preparación experimental de Vacuna del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de alto pasaje Forma respiratoria, Virus Vivo Modificado (DMI ≤ 3,5 logs). La preparación T04 corresponde al número de serie L0912RK12 (PCV/M.hyo) + (SRPP VVM a DMI ≤ 3,5 logs).

30 Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 21 a continuación. El antígeno de M.hyo corresponde al antígeno de M.hyo del sobrenadante tratado con Proteína A de la semilla de M.hyo global. Los números de serie para las preparaciones del VSRRP han de determinarse (TBD).

Tabla 21 Diseño de estudio

Grupo	N	PC o PVI ¹	N.º de lote	Días de estudio		
				Vacunación	Prueba de provocación	Necropsia
NTX	6	Centinela	NA			Puntuaciones de pulmón al realojar
T01	24	CVP2/M. Hyo	L0912RK12	Día 0 2 ml IM cuello a la derecha	Día 28 4 ml (1 ml por fosa nasal + 2 ml de inyección IM) cuello a la izquierda	Día 38 Puntuaciones de pulmón
T02	24	CVP2/M. Hyo + VSRRP	L0912RK12 + TBD			
T03	24	CVP2/M. Hyo + VSRRP	L0912RK12 + TBD			
T04	24	CVP2/M. Hyo + VSRRP	L0912RK12 + TBD			

¹Producto veterinario de investigación (PVI) = Quimera de Circovirus Porcino Tipo 1-2 (CVP2), vacuna de virus muerto-Extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo) adyuvantado con 10 % de Aceite SP (diluyente) - Vacuna del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, Forma respiratoria, virus vivo modificado (VSRRP)
 Producto control (PC) = Quimera de Circovirus Porcino Tipo 1-2 (CVP2), Vacuna de virus muerto - Extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo) sin fracción de Vacuna del síndrome reproductivo y respiratorio porcino; Adyuvantada con 10 % de Aceite SP
 IM = Intramuscular
 NA = No aplicable

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Pfizer Inc.
Galvin, Jeffrey
Nitzel, Gregory

Garrett, Keith
Kulawik II, James
Ricker, Tracy
Smutzer, Megan

5 <120> Vacuna de combinación CVP/Mycoplasma hyopneumoniae/SRRP

<130> PC71913A

<150> US 61/620.189

<151> 04-04-2012

10 <160> 18

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1260

<212> ADN

15 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 1

ES 2 719 483 T3

atgaaaaaaaa tgcttagaaa aaaattcttg tattcatcag ctatztatgc aacttcgctt 60
 gcatcaatta ttgcatttgt tgcagcaggt tgtggacaga cagaatcagg ttcgacttct 120
 gattctaaac cacaagccga gacgctaaaa cataaagtaa gtaatgattc tattcgaata 180
 gcactaaccg atccggataa tcctc gatga attagtgtc aaaaagatat tatttcttat 240
 gttgatgaaa cagaggcagc aacttcaaca attacaaaa accaggatgc acagaataac 300
 tgactcactc agcaagctaa ttttaagccca gcacccaaaag gatttattat tgcccctgaa 360
 aatggaagtg gagttggaac tgctgttaat acaattgctg ataaaggaat tccgattggt 420
 gcctatgatc gactaattac tggatctgat aaatatgatt ggtatgtttc ttttgataat 480
 gaaaaagttg gcgaattaca aggtctttca cttgcagcgg gtctattagg aaaagaagat 540
 ggtgcttttg attcaattga tcaaatgaat gaatatctaa aatcacatat gccccaaagag 600
 acaatttctt tttatacaat cgcggttcc caagatgata ataactcca atatttttat 660
 aatggtgcaa tgaaagtact taaagaatta atgaaaaatt cgggaaataa gataattgat 720
 ttatctcctg aaggcgaaaa tgctgtttat gtcccaggat gaaattatgg aactgccggt 780
 caaagaatcc aatcttttct aacaattaac aaagatccag caggtggtaa taaaatcaaa 840
 gctgttggtt caaaaccagc ttctattttc aaaggatttc ttgccccaaa tgatggaatg 900
 gccgarcaag caatcaccaa attaaaactt gaaggatttg atacccaaaa aatctttgta 960
 actggtcaag attataatga taaagccaaa acttttatca aagacggcga tcaaaatag 1020
 acaatttata aacctgataa agtttttagga aaagttgctg ttgaagttct tcgggtttta 1080
 attgcaaaga aaaataaagc atccagatca gaagtcgaaa acgaactaaa agcaaaaacta 1140
 ccaaatattt catttaata tgataatcaa acatataaag tgcaaggtaa aaatattaat 1200
 acaattttag taagtccagt aattgttaca aaagctaag ttgataatcc tgatgcctaa 1260

<210> 2
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae
 <400> 2

5

ES 2 719 483 T3

Met Lys Lys Met Leu Arg Lys Lys Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Ile Tyr
1 5 10 15

Ala Thr Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ala Phe Val Ala Ala Gly Cys Gly
20 25 30

Gln Thr Glu Ser Gly Ser Thr Ser Asp Ser Lys Pro Gln Ala Glu Thr
35 40 45

Leu Lys His Lys Val Ser Asn Asp Ser Ile Arg Ile Ala Leu Thr Asp
50 55 60

Pro Asp Asn Pro Arg Trp Ile Ser Ala Gln Lys Asp Ile Ile Ser Tyr
65 70 75 80

Val Asp Glu Thr Glu Ala Ala Thr Ser Thr Ile Thr Lys Asn Gln Asp
85 90 95

Ala Gln Asn Asn Trp Leu Thr Gln Gln Ala Asn Leu Ser Pro Ala Pro
100 105 110

Lys Gly Phe Ile Ile Ala Pro Glu Asn Gly Ser Gly Val Gly Thr Ala
115 120 125

Val Asn Thr Ile Ala Asp Lys Gly Ile Pro Ile Val Ala Tyr Asp Arg
130 135 140

Leu Ile Thr Gly Ser Asp Lys Tyr Asp Trp Tyr Val Ser Phe Asp Asn
145 150 155 160

Glu Lys Val Gly Glu Leu Gln Gly Leu Ser Leu Ala Ala Gly Leu Leu
165 170 175

Gly Lys Glu Asp Gly Ala Phe Asp Ser Ile Asp Gln Met Asn Glu Tyr
180 185 190

ES 2 719 483 T3

Leu Lys Ser His Met Pro Gln Glu Thr Ile Ser Phe Tyr Thr Ile Ala
 195 200 205

Gly Ser Gln Asp Asp Asn Asn Ser Gln Tyr Phe Tyr Asn Gly Ala Met
 210 215 220

Lys Val Leu Lys Glu Leu Met Lys Asn Ser Gly Asn Lys Ile Ile Asp
 225 230 235 240

Leu Ser Pro Glu Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val Pro Gly Trp Asn Tyr
 245 250 255

Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu Thr Ile Asn Lys Asp
 260 265 270

Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly Ser Lys Pro Ala Ser
 275 280 285

Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly Met Ala Glu Gln Ala
 290 295 300

Ile Thr Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr Gln Lys Ile Phe Val
 305 310 315 320

Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr Phe Ile Lys Asp Gly
 325 330 335

Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys Val Leu Gly Lys Val
 340 345 350

Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys Lys Asn Lys Ala Ser
 355 360 365

Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asn Ile Ser
 370 375 380

Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Ile Asn
 385 390 395 400

Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys Ala Asn Val Asp Asn
 405 410 415

Pro Asp Ala

- <210> 3
- <211> 3324
- <212> ADN
- <213> Mycoplasma hyopneumoniae

ES 2 719 483 T3

<400> 3

atgagtaaaa aatcaaaaac atttaaaatt ggtttgactg ccggaattgt tggctcttga 60
gtttttggtc taactgtcgg acttagcagc ttggcaaat acagatcaga aagtccacga 120
aagattgcaa atgattttgc cgcaaaagtt tcaacattag cttttagtc tttatgctttt 180
gagactgatt ctgattataa aatagtcaaa aggtgactag ttgattctaa taacaatatt 240
agaaataaag aaaaagttat tgattccttt tcctttttta ctaaaaacgg tgatcagtta 300
gaaaaatta attttcaaga tcctgaatat accaaggcga agataacttt tgagattctt 360
gaaattatcc ctgatgatgt caatcaaaat ttaaggtaa aatttcaggc attacaaaaa 420
cttcataatg gtgatattgc caaatctgat atttatgagc aaacagttgc ttttgccaaa 480
cagtcaaadc ttttagttgc cgaatttaat ttttcgctta aaaaaattac cgaaaaatta 540
aatcaacaaa ttgaaaattt atcaacaaaa attacaaatt ttgctgatga aaaaacaagc 600
agccaaaaag atccctcaac tctaagagct attgacttcc aatacagattt aaatacagcg 660
cgaaatcctg aggatttaga tataaagctt gctaattatt ttccagtact taaaaattta 720
ataaacagac taaataatgc tcctgagaat aaattaccta ataatttggg taatattttt 780
gaatttagct ttgcaaaaga tagttcaact aatcaatatg taagtatcca gaaccaaatt 840
ccttcgctgt ttttaaaagc agatcttagt caaagtgcc gtgaaatttt agctagccca 900
gatgaagttc agccagttat taacatttta agattaatga aaaaagataa ttcttcttat 960
tttctaaatt ttgaggattt tgtaataat ttaacactga aaaatatgca aaaagaagat 1020
ttaaatgcaa agggtaaaaa tctttctgcc tatgaatttc tagcagatat taaatctgga 1080
ttttccctg gagacaagag atccagtcac accaaggcag aaattagtaa tcttttaaat 1140
aaaaagaaa atatttatga ctttggtaaa tacaatggaa aattcaacga ccgtcttaac 1200
tcgccaaatt tagaatatag cctagatgca gcaagcga gctcttgataa aaaagataaa 1260
tcaatagttt taattcccta ccgccttgaa attaaagata aattttttgc cgatgattta 1320
tatccagata caaaagataa tattctcgta aaagaaggga ttcttaaatt aactggattt 1380
aaaaaaggct caaaaattga tctcccta atcaatcagc aaatttttaa aaccgaatat 1440
ttaccatttt ttgaaaagg taaagaagaa caagcaaat tagactatgg taatatctta 1500
aatccatata atactcaact tgccaaagtt gaagttgaag ctctttttta agggaataaa 1560
aaccaagaaa tctatcaagc acttgatgga aattatgcct atgaattcgg ggcctttaaa 1620
tccgtgctta attcctgaac aggaaaaatt cagcatcctg aaaaagctga tatccaaaga 1680
tttacaagac atttagaaca agttaaaatt ggttctaatt cagtttttaa tcaaccacaa 1740
acaacaaaag aacaagtaat ttcaagtctt aaaagtaata acttttttaa aatggacat 1800

ES 2 719 483 T3

caagttgcaa gttatcccga ggatttactc accaaggaca aattaacaat tttagagact 1860
ctttatgatc tagcaaaaaa atgggggacta gaaactaaca gagcacaatt cccaaaaggg 1920
gttttccaat atacaaaaga tttttttgca gaagcagata aattaaatt tttggaattg 1980
aagaaaaagg atccttaca tcaagataaaa gaaattcacc aactttcctt taatatttta 2040
gcccgtaacg atgtaataaa atctgatgga ttttacggag ttttattatt gccccaaagt 2100
gtaaaaactg aattagaagg caaaaatgag gcgcaaattt ttgaagcgt taaaaagtat 2160
tctttaattg agaactcggc ttttaaaact actatcttag ataaaaattt acttgaaggg 2220
actgatctta aaaccttcgg tgatctttta aaagcatttt tccttaaagc agcccaattt 2280
aataatcttg ctcttgagc aaaattagac gataatcttc agtattcatt tgaagctatc 2340
aaaaaagggg aaactacaaa agaaggtaaa agagaagaag tagataaaaa agttaaggaa 2400
ttggataata aaataaaagg tatattgcct cagccccag cagcaaaacc agaagcagca 2460
aaaccagtag cggctaaacc agaaacaaca aaaccagtag cagctaaacc tgaagcagct 2520
aaacctgaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct 2580
aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct 2640
aaaccagaag cagcaaaacc agttgctact aatactggct tttcacttac aaataaacca 2700
aaagaagact atttccaat ggcttttagt tataaattag aatatactga cgaaaataaa 2760
ttaagcctaa aaacaccgga aattaatgta tttttagaac tagttcatca aagcgagtat 2820
gaagaacaag aaataataaa ggaactagat aaaactggtt taaatcttca atatcaattc 2880
caggaagtca aggtaactag tgaccaatat cagaaactta gccaccaat gatgaccgaa 2940
ggatcttcaa atcaaggtaa aaaaagcgaa ggaactccta accaaggtaa aaaagcagaa 3000
ggcgcgctca accaaggtaa aaaagcgaa ggaactccta accaaggtaa aaaagcagaa 3060
ggagcaccta gtcaacaag cccaactacc gaattaacta attaccttcc tgacttaggt 3120
aaaaaaattg acgaaatcat taaaaaaca ggtaaaaatt gaaaaacaga ggttgaacta 3180
atcgaggata atatcgctgg agatgctaaa ttgctatact ttatcctaag ggatgattca 3240
aatccggtg atcctaataa atcaagtcta aaagttaaaa taacagtaaa acaaagtaat 3300
aataatcagg aaccagaatc taaa 3324

<210> 4
<211> 1108
<212> PRT
5 <213> Mycoplasma hyopneumoniae
<400> 4

Met Ser Lys Lys Ser Lys Thr Phe Lys Ile Gly Leu Thr Ala Gly Ile
1 5 10 15

ES 2 719 483 T3

Val Gly Leu Gly Val Phe Gly Leu Thr Val Gly Leu Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Lys Tyr Arg Ser Glu Ser Pro Arg Lys Ile Ala Asn Asp Phe Ala Ala
 35 40 45

Lys Val Ser Thr Leu Ala Phe Ser Pro Tyr Ala Phe Glu Thr Asp Ser
 50 55 60

Asp Tyr Lys Ile Val Lys Arg Trp Leu Val Asp Ser Asn Asn Asn Ile
 65 70 75 80

Arg Asn Lys Glu Lys Val Ile Asp Ser Phe Ser Phe Phe Thr Lys Asn
 85 90 95

Gly Asp Gln Leu Glu Lys Ile Asn Phe Gln Asp Pro Glu Tyr Thr Lys
 100 105 110

Ala Lys Ile Thr Phe Glu Ile Leu Glu Ile Ile Pro Asp Asp Val Asn
 115 120 125

Gln Asn Phe Lys Val Lys Phe Gln Ala Leu Gln Lys Leu His Asn Gly
 130 135 140

Asp Ile Ala Lys Ser Asp Ile Tyr Glu Gln Thr Val Ala Phe Ala Lys
 145 150 155 160

Gln Ser Asn Leu Leu Val Ala Glu Phe Asn Phe Ser Leu Lys Lys Ile
 165 170 175

Thr Glu Lys Leu Asn Gln Gln Ile Glu Asn Leu Ser Thr Lys Ile Thr
 180 185 190

Asn Phe Ala Asp Glu Lys Thr Ser Ser Gln Lys Asp Pro Ser Thr Leu
 195 200 205

Arg Ala Ile Asp Phe Gln Tyr Asp Leu Asn Thr Ala Arg Asn Pro Glu
 210 215 220

Asp Leu Asp Ile Lys Leu Ala Asn Tyr Phe Pro Val Leu Lys Asn Leu
 225 230 235 240

Ile Asn Arg Leu Asn Asn Ala Pro Glu Asn Lys Leu Pro Asn Asn Leu
 245 250 255

Gly Asn Ile Phe Glu Phe Ser Phe Ala Lys Asp Ser Ser Thr Asn Gln
 260 265 270

ES 2 719 483 T3

Tyr Val Ser Ile Gln Asn Gln Ile Pro Ser Leu Phe Leu Lys Ala Asp
 275 280 285
 Leu Ser Gln Ser Ala Arg Glu Ile Leu Ala Ser Pro Asp Glu Val Gln
 290 295 300
 Pro Val Ile Asn Ile Leu Arg Leu Met Lys Lys Asp Asn Ser Ser Tyr
 305 310 315 320
 Phe Leu Asn Phe Glu Asp Phe Val Asn Asn Leu Thr Leu Lys Asn Met
 325 330 335
 Gln Lys Glu Asp Leu Asn Ala Lys Gly Gln Asn Leu Ser Ala Tyr Glu
 340 345 350
 Phe Leu Ala Asp Ile Lys Ser Gly Phe Phe Pro Gly Asp Lys Arg Ser
 355 360 365
 Ser His Thr Lys Ala Glu Ile Ser Asn Leu Leu Asn Lys Lys Glu Asn
 370 375 380
 Ile Tyr Asp Phe Gly Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Asn Asp Arg Leu Asn
 385 390 395 400
 Ser Pro Asn Leu Glu Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Ser Ala Ser Leu Asp
 405 410 415
 Lys Lys Asp Lys Ser Ile Val Leu Ile Pro Tyr Arg Leu Glu Ile Lys
 420 425 430
 Asp Lys Phe Phe Ala Asp Asp Leu Tyr Pro Asp Thr Lys Asp Asn Ile
 435 440 445
 Leu Val Lys Glu Gly Ile Leu Lys Leu Thr Gly Phe Lys Lys Gly Ser
 450 455 460
 Lys Ile Asp Leu Pro Asn Ile Asn Gln Gln Ile Phe Lys Thr Glu Tyr
 465 470 475 480
 Leu Pro Phe Phe Glu Lys Gly Lys Glu Glu Gln Ala Lys Leu Asp Tyr
 485 490 495
 Gly Asn Ile Leu Asn Pro Tyr Asn Thr Gln Leu Ala Lys Val Glu Val
 500 505 510
 Glu Ala Leu Phe Lys Gly Asn Lys Asn Gln Glu Ile Tyr Gln Ala Leu

ES 2 719 483 T3

	515					520					525				
Asp	Gly	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Ser	Val	Leu	Asn
	530					535					540				
Ser	Trp	Thr	Gly	Lys	Ile	Gln	His	Pro	Glu	Lys	Ala	Asp	Ile	Gln	Arg
545					550					555					560
Phe	Thr	Arg	His	Leu	Glu	Gln	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Leu
				565					570					575	
Asn	Gln	Pro	Gln	Thr	Thr	Lys	Glu	Gln	Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser
			580					585					590		
Asn	Asn	Phe	Phe	Lys	Asn	Gly	His	Gln	Val	Ala	Ser	Tyr	Phe	Gln	Asp
		595					600					605			
Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Lys	Leu	Thr	Ile	Leu	Glu	Thr	Leu	Tyr	Asp	Leu
	610					615					620				
Ala	Lys	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Thr	Asn	Arg	Ala	Gln	Phe	Pro	Lys	Gly
625					630					635					640
Val	Phe	Gln	Tyr	Thr	Lys	Asp	Ile	Phe	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	Leu	Lys
				645					650					655	
Phe	Leu	Glu	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Pro	Tyr	Asn	Gln	Ile	Lys	Glu	Ile
			660					665					670		
His	Gln	Leu	Ser	Phe	Asn	Ile	Leu	Ala	Arg	Asn	Asp	Val	Ile	Lys	Ser
		675					680					685			
Asp	Gly	Phe	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Ser	Val	Lys	Thr	Glu
	690					695					700				
Leu	Glu	Gly	Lys	Asn	Glu	Ala	Gln	Ile	Phe	Glu	Ala	Leu	Lys	Lys	Tyr
705					710					715					720
Ser	Leu	Ile	Glu	Asn	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Thr	Ile	Leu	Asp	Lys	Asn
				725					730					735	
Leu	Leu	Glu	Gly	Thr	Asp	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Asp	Phe	Leu	Lys	Ala
			740					745					750		
Phe	Phe	Leu	Lys	Ala	Ala	Gln	Phe	Asn	Asn	Phe	Ala	Pro	Trp	Ala	Lys
		755					760					765			

ES 2 719 483 T3

Leu Asp Asp Asn Leu Gln Tyr Ser Phe Glu Ala Ile Lys Lys Gly Glu
 770 775 780

Thr Thr Lys Glu Gly Lys Arg Glu Glu Val Asp Lys Lys Val Lys Glu
 785 790 795 800

Leu Asp Asn Lys Ile Lys Gly Ile Leu Pro Gln Pro Pro Ala Ala Lys
 805 810 815

Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Thr Thr Lys Pro
 820 825 830

Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val
 835 840 845

Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala
 850 855 860

Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala
 865 870 875 880

Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Thr Asn Thr Gly Phe Ser Leu
 885 890 895

Thr Asn Lys Pro Lys Glu Asp Tyr Phe Pro Met Ala Phe Ser Tyr Lys
 900 905 910

Leu Glu Tyr Thr Asp Glu Asn Lys Leu Ser Leu Lys Thr Pro Glu Ile
 915 920 925

Asn Val Phe Leu Glu Leu Val His Gln Ser Glu Tyr Glu Glu Gln Glu
 930 935 940

Ile Ile Lys Glu Leu Asp Lys Thr Val Leu Asn Leu Gln Tyr Gln Phe
 945 950 955 960

Gln Glu Val Lys Val Thr Ser Asp Gln Tyr Gln Lys Leu Ser His Pro
 965 970 975

Met Met Thr Glu Gly Ser Ser Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu Gly Thr
 980 985 990

Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys
 995 1000 1005

Ala Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro
 1010 1015 1020

ES 2 719 483 T3

Ser Gln Gln Ser Pro Thr Thr Glu Leu Thr Asn Tyr Leu Pro Asp
 1025 1030 1035

Leu Gly Lys Lys Ile Asp Glu Ile Ile Lys Lys Gln Gly Lys Asn
 1040 1045 1050

Trp Lys Thr Glu Val Glu Leu Ile Glu Asp Asn Ile Ala Gly Asp
 1055 1060 1065

Ala Lys Leu Leu Tyr Phe Ile Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ser Gly
 1070 1075 1080

Asp Pro Lys Lys Ser Ser Leu Lys Val Lys Ile Thr Val Lys Gln
 1085 1090 1095

Ser Asn Asn Asn Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 1100 1105

- <210> 5
- <211> 1773
- <212> ADN
- <213> Circovirus porcino
- <400> 5

5

ES 2 719 483 T3

ggtacctccg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga 60
 tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggctgattg 120
 ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc 180
 aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatccaag gtaaccagcc ataaaaatca 240
 tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggcttc 300
 cagtaggtgt ccctaggctc agcaaaatta cgggcccact ggctcttccc acaaccgggc 360
 gggcccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact 420
 ttcaaaagtt cagccagccc gcggaaatth ctacatacag ttacaggaaa ctgctcggct 480
 acagtcacca aagaccccgt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc 540
 ttcccctggg tccgcgggagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat 600
 tctttattct gctggctcggg tcctttcgct ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac 660
 cacttcacct tgttaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaacccctg gaggtgagga 720
 gttctaccct cttccaaacc ttctctgcca caaacaaaat aatcaaaaag ggagattgga 780
 agctcccgta ttttggtttt ctctctctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc 840
 ttatgggggt gcggggccgct tttcttgctt ggcattttca ctgacgctgc cgaggtgctg 900
 ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgcact tctttcactt ttataggatg 960

 acgtatccaa ggaggcggtta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttggccag 1020
 atcctccgcc gccgcccctg gctcgtccac ccccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080
 aatggcatct tcaacacccg cctctccgc accttcggat atactgtcaa ggctaccaca 1140
 gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttggtccc 1200
 ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata ccctttgaat actacagaat aagaaagggt 1260
 aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccaggggtg ataggggagt gggctccact 1320
 gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaaccta tgacccatat 1380
 gtaaactact cctcccgcca tacaatcccc caacccttct cctaccactc ccgttacttc 1440
 acacccaaac ctggttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaaataa caaaaggaat 1500
 cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560
 ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taacctatgta tgtacaattc 1620
 agagaattta atcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaacat 1680
 tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttatthtat atgggaaaag ggcacagggt 1740
 gggctcactg cttcaaatcg gccttcgggt acc 1773

ES 2 719 483 T3

<210> 6
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Circovirus porcino

5

<400> 6
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatattga cgactttggt 240
 cccccgggag gggggaccaa caaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420
 tatgtaaact actcctccc ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
 ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
 aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 7
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

10

<400> 7

ES 2 719 483 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 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 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 Met 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

<210> 8
 <211> 1767
 <212> ADN

ES 2 719 483 T3

<213> Circovirus porcino

<400> 8

```

ggtagctccg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga      60
tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggctgattg      120
ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc      180
aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatccaag gtaaccagcc ataaaaatca      240
tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggcttc      300
cagtaggtgt cgctaggctc agcaaaatta cgggccact ggctcttccc acaaccgggc      360
gggccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact      420
ttcaaaagtt cagccagccc gcggaaatth ctcacatacg ttacagggaa ctgctcggct      480
acagtcacca aagaccccgt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc      540
ttcccctggt tccgcgagc tccacactcg ataagtatgt ggcttcttt actgcagtat      600
tctttattct gctggctcgt tcccttcgct ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac      660
cacttcacct tgttaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaacccctg gaggtgagga      720
gttctaccct cttccaaacc ttctctccg caaacaaaat aatcaaaaag ggagattgga      780
agctcccgta ttttgTTTTT ctctcctcgc gaaggattat taagggtgaa caccacactc      840
ttatgggggt gcgggcccgt tttcctgctt ggcattttca ctgacgctgc cgaggtgctg      900
ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgcact tctttcactt ttataggatg      960
acgtatccaa ggaggcggtta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttgGCCAG 1020
atcctccgcc gccgcccctg gctcgtccac ccccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa 1080
aatggcatct tcaacacccg cctctcccgc accttcggat atactgtcaa ggctaccaca 1140
gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgTTCCC 1200
ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata ccctttgaat actacagaat aagaaagggt 1260
aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccaggtg ataggggagt gggctccact 1320
gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaaccta tgaccatata 1380
gtaaactact cctcccgcca tacaatcgcc caacccttct cctaccactc ccgttacttc 1440
acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaataa caaaaggaat 1500
cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg 1560
ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taacctatga tgtacaattc 1620
agagaattta atcttaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaccat 1680

```

ES 2 719 483 T3

tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttatTTTTat atgggaaaag ggcacagggt 1740
 gggTccactg cttcaaATcg gcctTcg 1767

<210> 9
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Circovirus porcino

5
 <400> 9

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gcccccgCag ccatctTggc 60
 cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgTc ccccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcacctTcg gatatactgt caaggctacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg ggcggTggac atgatgagat ttaatattga cgactTtgTt 240
 cccccgggag gggggaccaa caaaatctct ataccctTtg aatactacag aataagaaag 300
 gTtaaggTtg aattctggcc ctgctcccc atcaccCagg gtgatagggg agTgggctcc 360
 actgctgTta ttctagatga taactTtgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420
 tatgTaaact actcctcccg ccatacaatc gcccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
 tTcacacca aacctgtTct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
 aatcagctTt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
 tTcagagaat ttaatctTaa agacccccca ctTaaacct aa 702

<210> 10
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

10
 <400> 10

ES 2 719 483 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 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 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 Ala 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 Met 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

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

ES 2 719 483 T3

<213> Circovirus porcino

<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 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

ES 2 719 483 T3

<210> 12
 <211> 713
 <212> ADN
 <213> Circovirus porcino

5

<400> 12

```

cagctatgac gtatccaagg aggcggttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc      60
ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tegtccaccc ccgccaccgc taccgttgga      120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccggcc tctccgcac cttcggatat actgtggaga      180
aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tccgcacct tcggatatac tgtgacgact      240
ttgttcccc  gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa      300
gaaagggtta ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg      360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg      420

accatattgt aaactactcc tcccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc      480
gttacttcac acccaaact gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca      540
aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg      600
gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg      660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaaatg aat          713
  
```

<210> 13
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

10

<400> 13

ES 2 719 483 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> 14
<211> 713
<212> ADN

ES 2 719 483 T3

<213> Circovirus porcino

<400> 14

```

ccgccatgac gtatccaagg aggcggttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc      60
ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga    120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccggcc tctccgcac cttcgatat actgtcaagg    180
ctaccacagt cacaacgccc tcctggggcg tggacatgat gagatttaat attgacgact    240
ttgttcccc  gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa    300
gaaaggtaa  ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg    360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg    420
accatattgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc    480
gttacttcac acccaaact gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca    540
aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg    600
gcactgcggt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg    660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttga accctaagaa ttc          713

```

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 15

```

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

```

5

ES 2 719 483 T3

cccctttaac catgtctggg atacttgatc ggtgcacgtg cacccecaat gccagggtgt 240
 ttatggcgga gggccaagtc tactgcacac gatgtctcag tgcacggtct ctccttcctc 300
 tgaatctcca agttcctgag cttgggggtgc tgggcctatt ttataggccc gaagagccac 360
 tccggtggac gttgccacgt gcattcccca ctgtcgagtg ctcccctgcc ggggcctgct 420
 ggctttctgc gatctttcca attgcacgaa tgaccagtgg aaacctgaac tttcaacaaa 480
 gaatggtgcg ggttgcagct gagatttaca gagccggcca actcaccctc gcagttttga 540
 aggctctaca agtttatgaa cggggttgtc gctggtagcc cattgtcgga cctgtccctg 600
 gagtggccgt ttacgccaac tccctacatg tgagtgacaa acctttcccg ggagcaactc 660
 atgtgttaac caacctaccg ctcccgcaga ggcccaagcc tgaagacttt tgcccttttg 720
 agtgtgctat ggctaacgct tatgacattg gccataacgc cgtcattgat gtggccagag 780
 ggaaagtctc ctgggcccct cgtggcgggg atgaagtga atttgaaacc gtccccgaag 840
 agttgaagtt gattgcgaac cgactccaca tctccttccc gcccaccac gcagtggaca 900
 tgtctgagtt tgccttcata gccctggga gtggtgtctc cttgcgggtc gagcaccaac 960
 acggctgcct tcccgtgat actgtccctg atgggaactg ctgggtgtac ttgtttgact 1020
 tgctcccacc ggaagttcag aataaagaaa ttgcgctgta taaccaattt ggctatcaaa 1080
 ccaagcatgg tgtccatggc aagtacctac agcggaggct gcaagttaat ggtctccgag 1140
 cagtgactga tacagatgga cctattgtcg tacagtactt ctctgttagg gagagttgga 1200
 tccgccactt cagactggcg gaagaacctc gcctccctgg gtttgaagac ctccctcagaa 1260
 taagggtaga gcctaatacg tcgccaatgg gtggcaaggg tgaaaaaatc ttccggtttg 1320
 gcagtcacaa gtggtacggt gctggaaaga gagcaaggag agcacgctct ggtgcgactg 1380
 ccacggtgct tcaccgctc ttgcccgctc gcgaagccca gcaggccaag aagctcgagg 1440
 ttgccagcgc caacagggtc gagcatctca agtactattc cccgcctgcc gacgggaact 1500
 gtggttgga ctgcatttcc gccattacca accggatggt gaattccaaa tttgaaacca 1560
 ctcttcccga gagagtgaga ccttcagatg actgggctac tgacgaggat cttgtgaata 1620
 ccatccaaat cctcaggctc cccgcggcct tggacaggaa cgggtgcttgt gctggcgcca 1680
 agtacgtgct caagctggaa ggtgagcact ggaccgtctc tgtgaccctt gggatgacct 1740
 cttctttgct ccccttgaa tgtgttcagg gttgttgtga gcataagagc ggtcttggtt 1800
 tcccagacgt ggtcgaagtt tccgatttg accctgcctg tcttgaccga cttgctgaga 1860
 taatgcaact gcctagcagt gtcaccccag ctgctctggc cgagatgtcc gacgacttca 1920
 atcgtctggc ttccccggcc gccactgtgt ggactgtttc gcaattcttt gcccgccaca 1980
 gaggaggaga gcacccctgac caggtgtgct tagggaaaat tatcaacctt tgtcaggtga 2040
 ttgaggaatg ctgctgttcc cggaaacaaag ccaaccgggc taccctcgaa gaggttgcg 2100

ES 2 719 483 T3

caaaagttga ccagtacctc cgtggtgcag caagccttgg agaatgcttg gccaaagcttg 2160
agagggctcg cccgccgagc gcgacggaca cctcctttga ttggaatggt gtgcttcctg 2220
gggttgagac ggccaatcag acaaccaaac agctccatgt caaccagtgc cgcgctctgg 2280
ttcctgtcgt gactcaagag cctttggaca gagactcggg ccctctgacc gccttctcgc 2340
tgtccaattg ctactaccct gcacaagggtg acgaggtccg tcaccgtgag aggctaaact 2400
ccttgctctc taagttggag ggggttggtc gtgaggaata tgggctcacg ccaactggac 2460
ctggcccgcg acccgcactg ccgaacgggc tcgacgagct taaagaccag atggaggagg 2520
atctgctgaa attagtcaac gcccaggcaa cttcagaaat gatggcctgg gcagccgagc 2580
aggttgatct aaaagcttgg gtcaaaaatt acccacgggtg gacaccgcca cccctccac 2640
caagagttca gcctcgaaaa acgaagtctg tcaagagctt gctagagAAC aagcctgtcc 2700
ctgctccgcg caggaaggtc agatctgatt gtggcagccc gattttgatg ggcgacaatg 2760
ttcctaacgg ttggaagat tcgactggtg gtggtcccct tgatctttcg gcaccatccg 2820
agccgatgac acctctgagt gagcctgtac ttatttccag gccagtgaca tctttgagtg 2880
tgccggcccc agttcctgca ccgcgtagag ctgtgtcccg accgatgacg ccctcgagtg 2940
agccaatddd tgtgtctgca ctgcgacaca aatttcagca ggtggaaaaa gcaaatctgg 3000
cggcagcagc gccgatgtgc caggacgaac ccttagattt gtctgcatcc tcacagactg 3060
aatatgaggc ttcccccta acaccaccgc agaacgtggg cattctggag gtaagggggc 3120
aagaagctga ggaagttctg agtgaaatct cggatattct gaatgatacc aaccctgcac 3180
ctgtgtcatc aagcagctcc ctgtcaagtg ttaagatcac acgccccaaa tactcagctc 3240
aagccattat cgactcgggc gggccctgca gtgggcacct ccaaagggaa aaagaagcat 3300
gcctccgcat catgcgtgaa gcttgtgatg cggccaagct tagtgaccct gccacgcagg 3360
aatggctttc tcgcatgtgg gataggggtg acatgctgac ttggcgcaac acgtctgctt 3420
accaggcgtt tcgcacctta gatggcagggt ttgggtttct cccaaagatg atactcgaga 3480
cgccgcgcgc ctaccogtgt gggtttgtga tgttgccctca caccctgca ccttccgtga 3540
gtgcagagag cgaccttacc attggttcag tcgccactga agatattcca cgcctcctcg 3600
ggaaaataga aaataccggt gagatgatca accagggacc cttggcatcc tctgaggaag 3660
aaccggtata caaccaacct gccaaagact cccggatata gtccgccccgg tctgacgaga 3720
gcacagcagc tccgtccgcg ggtacagggtg gcgcggcgtt atttactgat ttgccacctt 3780
cagacggcgt agatgcggac ggtggggggc cgttgcagac ggtaagaaag aaagctgaaa 3840
ggctcttcga ccaattgagc cgtcaggttt ttaacctcgt ctcccatctc cctgttttct 3900
tctcacacct cttcaaatct gacagtggtt attctccggg tgattggggg tttgcagctt 3960

ES 2 719 483 T3

ttactctatt ttgcctcttt ttgtgttaca gctaccatt cttcggtttc gttcccctct 4020
 tgggtgtatt ttctgggtct tctcggcgtg tgcgcatggg ggtttttggc tgctggctgg 4080
 cttttgctgt tggcctgttc aagcctgtgt ccgaccagc cggcactgct tgtgagttg 4140
 actcgcagga gtgcaggaac gtccttcatt cttttgagct tctcaaacct tgggacctg 4200
 ttgcagcct tgttgtgggc cccgtcggtc tcggtcttgc cattcttggc aagtactgg 4260
 gcggggcacg ctacatctgg cttttttgct ttaggcttgg cattgttgca gattgtatct 4320
 tggctggagc ttatgtgctt tctcaaggta ggtgtaaaaa gtgctgggga tcttgataa 4380
 gaactgctcc taatgaaatc gccttcaacg tgttcccttt tacacgtgcg accaggtcgt 4440
 cactcatcga cctgtgcgat cggttttgtg cgccaacagg catggacccc atttcctcg 4500
 cactgggtg gcgtgggtgc tggaccggcc gaagtcccat tgagcaacct tctgaaaaac 4560
 ccatcgcgtt cgcccagttg gatgaaaaga ggattacggc tagaactgtg gtcgctcagc 4620
 cttatgatcc taatcaagcc gtgaagtgtc tgcgggtggt acaggcgggt gggcgatgg 4680
 tggccgagc agtcccaaaa gtggccaaag tttctgctat tccattccga gcccttttt 4740
 ttcccaccg agtgaaagt gatcccagc gcaggatcgt ggttgacccc gatactttta 4800
 ctacagccct ccggtctggt tactctacca caaacctcgt ccttgggtgtg ggggactttg 4860
 ccagctgaa tggactaaag atcaggcaaa tttccaagcc ttcgggagga ggcccacacc 4920
 tcattgctgc cctgcatggt gcctgctcga tggcgttgca catgcttctt ggggtttatg 4980
 taacttcagt ggggtcttgc ggtgccggca ccaacgatcc atggtgcact aatccgtttg 5040
 ccgtcctgg ctacggacca ggctctctct gcacgtccag attgtgcatc tccaacatg 5100
 gccttaccct gcccttgaca gcacttgtgg cgggattcgg tcttcaggaa atgccttgg 5160
 tcgttttgat tttcgtttcc atcggaggca tggctcatag gttgagttgt aaggctgata 5220
 tgctgtgcat tttacttgca atcgcagct atgtttgggt accccttacc tggttgcttt 5280
 gtgtgtttcc ttgttggttgc cgtggttct ctttgacccc ccttaccatc ctatggttgg 5340
 tgtttttctt gatttctgta aatatgcctt cgggaatctt ggccgtggtg ttattggttt 5400
 ctctttggct tttgggacgt tatactaaca ttgctggtct tgtcaccccc tatgatattc 5460
 atcattacac cagtggcccc cgcgggtgtg ccgccttggc taccgcacca gatggaacct 5520
 acttggtgc cgtccgccgc gctgcgttga ctggtcgcac catgctgttc acccgtctc 5580
 agcttgggtc ccttcttgag ggcgctttca gaactcgaaa gccctcactg aacaccgtca 5640
 atgtggttgg gtccctccatg ggctctggtg gagtgttccac catcgacggg aaaattaggt 5700
 gcgtgactgc cgcacatgtc cttacgggta attcggctag ggtttccgga gtcggcttca 5760
 atcaaatgct tgactttgat gtgaaagggg acttcgccat agctgattgc ccgaattggc 5820
 aaggagctgc tccaagacc caattctgcg aggacggatg gactggccgt gcctattggc 5880

ES 2 719 483 T3

tgacatcctc tggcgtcgaa cccggtgtta ttgggaatgg attcgccttc tgcttcaccg 5940
 cgtgcggcga ttccgggtcc ccagtgatca ccgaagctgg tgagattgtc ggcgttcaca 6000
 caggatcaaa taaacaagga ggtggcatcg tcacgcgccc ttcaggccag ttttghtaacg 6060
 tggcaccat caagctgagc gaattaagtg aattctttgc tggacccaag gtcccgtctg 6120
 gtgatgtgaa ggttggcagc cacataatta aagacacgtg cgaagtacct tcagatcttt 6180
 gcgccttgct tgctgcaaaa cctgaactgg agggaggcct ctccaccgtc caacttctgt 6240
 gtgtgttttt cctactgtgg agaattgatgg gacatgcctg gacgcccctg gttgctgtgg 6300
 ggtttttcat tctgaatgag gttctcccag ctgtcctggg tcggagtgtt ttctcctttg 6360
 ggatgtttgt gctatcttgg ctcacaccat ggtctgcgca agttctgatg atcaggcttc 6420
 taacagcagc tcttaacagg aacagatggt cacttgcctt ttacagcctt ggtgcgggtga 6480
 ccggttttgt cgcagatctt gcggtaacctc aagggcaccg gttgcaggca gtaatgaatt 6540
 tgagcaccta tgccctcctg cctcggatga tggttgtgac ctccaccagtc ccagtgattg 6600
 cgtgtggtgt tgtgcaccta cttgccatca ttttgtactt gttcaagtac cgcggcctgc 6660
 acaatgttct tgttggatgat ggagcgtttt ctgcagcttt cttcttgcga tactttgccg 6720
 agggaaagt gaggggaagg gtgtcgcaat cctgcggaat gaatcatgag tcattgactg 6780
 gtgcctcgc tatgagactc aatgacgagg acttggactt ccttacgaaa tggactgatt 6840
 ttaagtgctt tgtttctgcg tccaacatga ggaatgcagc aggccaattc atcagggctg 6900
 cctatgcaaa agcacttaga attgaacttg ccagttggg gcaggttgat aaggttcgag 6960
 gtactttggc caagcttgag gcttttctg ataccgtggc accccaactc tcgcccgggtg 7020
 acattgttgt tgctcttggc catacgcctg ttggcagcat cttcgacctt aaggttggtg 7080
 gtaccaagca tactctccaa gtcattgaga ccagagtcct tgccgggtcc aaaatgaccg 7140
 tggcgcgcgt cgttgaccca acccccacgc ccccaccgc acccgtgcc atccccctcc 7200
 caccgaaagt tctagagaat ggtcccaacg cctgggggga tggggaccgt ttgaataaga 7260
 agaagaggcg taggatggaa accgtcggca tctttgtcat ggggtgggaag aagtaccaga 7320
 aatthtggga caagaattcc ggtgatgtgt tttacgagga ggtccatgac aacacagatg 7380
 cgtgggagtg cctcagagtt ggtgaccctg ccgactttaa ccctgagaag ggaactctgt 7440
 gtgggcatac tactattgaa gataaggatt acaaagtcta cgcctccca tctggcaaga 7500
 agttcctggt ccccgctcaac ccagagagcg gaagagccca atgggaagct gcaaagcttt 7560
 ccgtggagca ggcccttggc atgatgaatg tcgacgggtga actgacggcc aaagaagtgg 7620
 agaaactgaa aagaataatt gacaaacttc agggccttac taaggagcag tgtttaaact 7680
 gctagccgcc agcggcttga cccgctgtgg tcgcgggcggc ttggttgta ctgagacagc 7740

ES 2 719 483 T3

ggtaaaaata gtcaaatttc acaaccggac tttcacccta gggcctgtga atttaaaagt 7800
 ggccagtgag gttgagctga aagacgcggt cgagcacaac caacaccccg ttgcaagacc 7860
 ggttgacggt ggtggtgtgc tcctgcggtc cgcagttcct tcgcttatag atgtcctgat 7920
 ctccggtgct gacgcatctc ctaagttact cgctcgtcac gggccgggga aactgggat 7980
 cgatggcacg ctttgggact ttgaggccga ggccaccaa gaggaaattg cgctcagtgc 8040
 gcaaataata caggcttgtg acattaggcg cgggtgacgca cctgaaattg gtctccctta 8100
 caagctgtac cctgttaggg gcaaccctga ggggtaaaa ggagttttac agaatacaag 8160
 gtttggagac ataccttaca aaacccccag tgacactggg agcccagtgc acgaggctgc 8220
 ctgcctcacg cccaatgcca ctccggtgac tgatgggagc tccgtcttgg ctactacat 8280
 gccctccggt tttgaattgt atgtaccgac cattccagcg tctgtccttg attatcttga 8340
 ctctaggcct gactgcccc aacagttgac agagcacggc tgtgaggatg ccgattgag 8400
 agacctctcc aagtatgact tgtccacca aggctttggt ttacctggg ttcttcgct 8460
 tgtgcgtaag tacctgttg cccacgtggg taagtgcccg cccgttcac ggccttccac 8520
 ttacctgcc aagaattcta tggctggaat aaatgggaac aggtttccaa ccaaggacat 8580
 tcagagcgtc cccgaaatcg acgttctgtg cgcacaggcc gtgcgagaaa actggcaaac 8640
 tgttaccct tgtaccctca agaaacagta ttgtgggaag aagaagacta ggacaatact 8700
 cggcaccaat aatttcattg cgttgccca cggggcagcg ttgagtgtg tcaccaggg 8760
 cttcatgaaa aaggcgttta actcgccat cgccctcggg aaaaacaaat ttaaggagct 8820
 acagactccg atcttaggca ggtgccttga agctgatctt gcacctctgt atcgatccac 8880
 acctgcaatt gtccgctggt ttgccgcaa ccttctttat gaacttgcct gtgctgaaga 8940
 gcacctaccg tcgtacgtgc tgaactgctg ccatgaccta ttggtcacgc agtccggcgc 9000
 agtgactaag aggggtggcc tgtcgtctgg cgaccgatc acttctgtgt ctaacacat 9060
 ttacagcttg gtgatatag cacagcacat ggtgcttagt tactttaaa gtggtcacc 9120
 tcatggcctt ctgttctac aagaccagct gaagttcgag gacatgctca aagtccaacc 9180
 cctgatcgtc tattcggacg acctcgtgct gtatgccgaa tctcccacca tgccgaacta 9240
 ccaactggtg gtgcaacatc tgaatttgat gctgggtttt cagacggacc caaagaagac 9300
 agccataacg gactcgccat ctttctagg ctgtaggata ataatggac gccagctagt 9360
 cccaaccgt gacaggatcc tcgcgccct cgcttaccat atgaaggcaa acaatgtttc 9420
 tgaatactac gccgcggcgg ctgcaatact catggacagc tgtgcttgt tagagtatga 9480
 tcctgaatgg tttgaagagc ttgtggttg gatagcgcac tgcgccgca aggacggcta 9540
 cagctttccc ggcccgcgt tcttctgtc catgtgggaa aaactcagat ccaatcatga 9600
 ggggaagaag tccagaatgt gcgggtattg cggggccctg gctccgtacg ccaactgctg 9660

ES 2 719 483 T3

tggcctcgac gtctgtatattt accacacocca cttccaccag cattgtccag tcacaatctg 9720
 gtgtggccac cgggctgggtt ctggttcttg tagtgagtgc aaaccccccc tagggaaagg 9780
 cacaagccct ctagatgagg tgttagaaca agtcccgtat aagcctccac ggactgtaat 9840
 catgcatgtg gagcagggtc tcacccctct tgacccaggc agataccaga ctgcgccggg 9900
 attagtctcc gttaggegtg gcatcagagg aatgaagtt gacctaccag acggtgatta 9960
 tgctagcacc gccctactcc ccaacttgtaa agagatcaac atggtcgctg tcgcctctaa 10020
 tgtgttgccg agcaggttca tcatcggtcc gcccggtgct gggaaaacat actggctcct 10080
 tcagcaggtc caggatgggtg atgtcattta cacaccgact caccagacca tgctcgacat 10140
 gattagggct ttggggacgt gccggttcaa cgtcccagca ggtgcaacgc tgcaattccc 10200
 tgccccctcc cgtaccggcc cgtgggttcg catcctagcc ggcggttggt gtcctggtaa 10260
 gaattccttc ttggatgaag cagcgtattg taatcacctt gatgtcttga ggctccttag 10320
 caaaaccacc ctcacctgtc tgggagactt caaacaactc caccagtggt gttttgattc 10380
 tcattgctat gtttttgaca tcatgcctca gaccagttg aagaccatct ggagattcgg 10440
 acagaacatc tgtgatgcca tccaaccaga ttacagggac aaacttgtgt ccatgggtcaa 10500
 cacaaccogt gtaaccacag tggaaaaacc tgtcaagtat gggcaagtcc tcaccctta 10560
 ccacagggac cgagaggacg ggcocatcac aattgactcc agtcaaggcg ccacatttga 10620
 tgtggtcaca ctgcatttgc cactaaaga ttactcaac aggcaaagag cccttgttgc 10680
 tatcaccagg gcaagacatg ctatctttgt gtatgacca cacaggcaat tgagagcat 10740
 gtttgatctt cctgogaagg gcacaccogt caacctcgca gtgcaccgtg atgagcagct 10800
 gatcgactg gatagaaata ataaagaatg cacagttgct caggctctag gcaacggaga 10860
 taaatttagg gccaccgaca agcgcgttgt agattctctc cgcgccattt gtgctgatct 10920
 ggaagggctg agctctccgc tccccagggt cgcacacaac ttgggatttt atttctcacc 10980
 tgatttgaca cagtttgcta aactcccgggt agaccttgca cccactggc ccgtggtgac 11040
 aaccagAAC aatgaaaagt ggcgggatcg gctggttgcc agccttcgcc ctgtccataa 11100
 gtatagccgt gcgtgcattg gtgcccgtta tatgggtgggc ccctcgggtg ttctaggcac 11160
 ccctggggtc gtgtcatact acctcacaaa atttgtcaag ggcgaggctc aagtgttcc 11220
 ggagacagtc ttcagcaccg gccgaattga ggtggattgc cgggagtatc ttgatgacag 11280
 ggagcgagaa gttgctgagt ccctcccaca tgccttcatt ggcgacgtca aaggcaccac 11340
 cgttggggga tgtcatcatg tcacctcaa ataccttcg cgcttccttc ccaaggaatc 11400
 agtcgcggta gtcggggttt cgagccccgg gaaagccgca aaagcagtgt gcacattgac 11460
 ggatgtgtac ctcccagacc ttgaggccta cctccacca gagactcagt ccaagtgtctg 11520

ES 2 719 483 T3

gaaagttatg ttggacttca aggaagttcg actgatggtc tggaaagaca agacggccta 11580
 tttccaactt gaaggccgct atttcacctg gtatcagctt gcaagctacg cctcgtacat 11640
 ccgtgttcct gtcaactcca cgggtgatct ggacccctgc atgggcccctg ccctttgcaa 11700
 cagaagagtt gtcgggtcca cccattgggg agctgacctc gcagtcaccc cttatgatta 11760
 cggtgctaaa atcatcttgt cttagcgtta ccatggtgaa atgcctcctg gatacaagat 11820
 tctggcgtgc gcggtgattt cgctcgacga cccagtcaag taaaaacaca cctgggggttt 11880
 tgaatcggat acagcgtatc tgtatgagtt caccggaaac ggtgaggact gggaggatta 11940
 caatgatgcy tttcgtgcy gccagaaag gaaaatttat aaggccactg ctaccagcat 12000
 gaagttttat tttccccgg gccccgtcat tgaaccaact ttaggcctga attgaaatga 12060
 aatggggtct atacaaagcc tcttcgacaa aattggccag ctttttggtg atgctttcac 12120
 ggaatttttg gtgtccattg ttgatatcat catatttttg gccattttgt ttggcttcac 12180
 catcgcgggt tggctggtgg tcttttgcat cagattggtt tgctccgcyg tattccgtgc 12240
 gcgccctgcc attcaccctg agcaattaca gaagatccta tgaggccttt ctttctcagt 12300
 gccgggtgga cattcccacc tggggggtaa aacacccttt ggggatgttt tggcaccata 12360
 aggtgtcaac cctgattgat gaaatggtgt cgcgtcgaat gtaccgcgtc atggataaag 12420
 cagggcaagc tgcctggaaa caggtggtga gcgaggctac gctgtctcgc attagtagtc 12480
 tggatgtggt ggctcatttt caacatcttg ccgccattga agccgagacc tgtaaataatt 12540
 tggcttctcg actgcccatg ctacacaacc tgcgcatgac aggggtcaaat gtaaccatag 12600
 tgtataatag cactttaaat caggtgtttg ctatttttcc aaccctggt tcccggccaa 12660
 agcttcatga ttttcagcaa tggctaatag ctgtacattc ctccatattt tcctctgttg 12720
 cagcttcttg tactcttttt gttgtgctgt ggttgccgggt tccaatgcta cgtactgttt 12780
 ttggtttccg ctggtttaggg gcaatttttc tttcgaactc atgggtgaatt acacgggtgtg 12840
 tccaccttgc ctccccgac aagcagccgc tgaggctcctt gaaccggta ggtctctttg 12900
 gtgcaggata gggcatgacc gatgtgggga ggacgatcac gacgaactgg ggttcatggt 12960
 tccgcctggc ctctccagcy aaagccactt gaccagtgtt tacgcctggt tggcgttcc 13020
 gtccttcagc tacacggccc agttccatcc cgagatattt gggatagggg acgtgagtga 13080
 agtttatggt gacatcaagc accaattcat ctgcgccgtt catgacgggc agaaccaccac 13140
 cttgcctcgc catgacaata tttcagccgt atttcagacc tactatcaac atcaggtcga 13200
 cggcggcaat tggtttcacc tagaatggct gcgtcccttc ttttctctt ggttggtttt 13260
 aatgtttctg tggtttctca ggcgttcgcc tgcaagccat gtttcagttc gactctttca 13320
 gacatcaaaa ccaacactac cgcagcatca ggctttgttg tcctccagga catcagctgc 13380
 cttaggcatg gcgactcgtc ctttccgacg attcgaaaa gctctcaatg ccgcacggcy 13440

ES 2 719 483 T3

atagggacac ctgtgtatat caccatcaca gccaatgtga cagatgagaa ttacttacat 13500
 tcttctgatc tcctcatgct ttcttcttgc cttttctatg cttctgagat gagtgaaaag 13560
 ggattcaagg tggatatttg caatgtgtca ggcacgtgg ctgtgtgtgt caactttacc 13620
 agctacgtcc aacatgtcaa agagtttact caacgctcct tgggtggtcga tcatgtgctg 13680
 ctgcttcatt tcatgacacc tgagaccatg aggtgggcaa ccgttttagc ctgtcttttt 13740
 gccatcctac tggcaatttg aatgttcaag tatgttgggg aaatgcttga ccgctggctg 13800
 ttgctcgcga ttgctttctt tgtggtgtat cgtgccgttc tggtttgctg tgctcggcaa 13860
 cgccaacagc agcagcagct ctcatctcca gttgatttat aacttgacgc tatgtgagct 13920
 gaatggcaca gattggctgg cagaaaaatt tgattgggcg gtggagactt ttgtcatctt 13980
 tcccgtgttg actcacattg tttcctattg tgcactcacc accagccatt tccttgacac 14040
 agttggctctg gttactgtgt ccaccgcccgg gttttatcac gggcgggatg tcttgagtag 14100
 catctacgcg gtctgtgctc tggctgcggt gatttgcttc gttattaggc ttgcgaagaa 14160
 ctgcatgtcc tggcgctact cttgtaccag atataccaac ttccttctgg aactaaggg 14220
 cagactctat cgttggcggg cgcocgttat catagaaaa aggggtaagg ttgaggtcga 14280
 aggtcatctg atcgacctca aaagagttgt gcttgatggt tccgtggcaa cccctttaac 14340
 cagagtttca gcggaacaat ggggtcgtct ctagacgact tttgccatga tagcactgct 14400
 ccacaaaagg tgcttttggc gttttccatt acctacacgc cagtaatgat atatgctcta 14460
 aaggtaatgc gcggccgact gctagggctt ctgcacctt tgatctttct gaattgtgct 14520
 tttaccttgc ggtacatgac attcgcgcac tttcagagca caaatagggt cgcgctcgct 14580
 atgggagcag tagttgcact tctttggggg gtgtactcag ccatagaaac ctggaaattc 14640
 atcacctcca gatgccgttt gtgcttgcta ggccgcaagt acattctggc ccctgcccac 14700
 cacgtcgaaa gtgccgcggg ctttcatccg attgcggcaa atgataacca cgcatttgtc 14760
 gtccggcgtc ccggtccat tacggttaac ggcacattgg tgcccgggtt gaaaagcctc 14820
 gtgttgggtg gcagaaaagc tgttaaacag ggagtggtaa accttgtcaa atatgccaaa 14880
 taacaacggc aagcagcaaa agaaaaagaa ggggaatggc cagccagtca accagctgtg 14940
 ccagatgctg ggtaaaatca tcgcccagca aaaccagtcc agaggcaagg gaccgggcaa 15000
 gaaaagtaag aagaaaaacc cggagaagcc ccattttcct ctagcgaccg aagatgacgt 15060
 caggcatcac ttcacccctg gtgagcggca attgtgtctg tcgtcgatcc agactgcctt 15120
 taaccagggc gctggaactt gtaccctgtc agattcaggg aggataagtt aactgtgga 15180
 gtttagtttg ccgacgcac atactgtgcg cctgatccgc gtcacagcat caccctcagc 15240
 atgatgggct ggcattctt aggcacctca gtgtcagaat tggaagaatg tgtggtggat 15300

ES 2 719 483 T3

ggcactgatt gacattgtgc ctctaagtca cctattcaat tagggcgacc gtgtgggggt 15360
 aaaatttaaat tggcgagaac catgcgggccg caattaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15420
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15450

<210> 17
 <211> 2352
 <212> ADN
 <213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

5

<400> 17
 cctatcattg aaccaacttt aggcctgaat tgaatgaaa tggggctctat gcaaagcctt 60
 tttgacaaaa ttggccaact tttcgtggat gctttcacgg agttcttgggt gtccattggt 120
 gatatcatta tatttttggc cattttgttt ggcttcacca tcgccggttg gctggtggtc 180
 ttttgcataca gattggtttg ctccgcgata ctccgtgcgc gccctgccat tcaactctgag 240
 caattacaga agatcctatg aggcctttct ttctcagtgc caggtggaca ttcccacctg 300
 gggaattaaa catcctttgg ggatgctttg gcaccataag gtgtcaacc tgaattgatga 360
 aatgggtgtcg cgtcgaatgt accgcatcat ggaaaaagca ggacaggctg cctggaaaca 420
 ggtggtgagc gaggctacgc tgtctcgcac tagtagtttg gatgtgggtg ctcactttca 480
 gcatcttgcc gccattgaag ccgagacctg taaatatttg gcctctcggc tgcccatgct 540
 acacaacctg cgcacatgac ggtcaaatgt aaccatagtg tataatagta ctttgaatca 600
 ggtgcttgct attttcccaa cccctggttc ccggccaaag cttcatgatt ttcagcaatg 660
 gctaatagct gtacattcct ctatattttc ctctgttgca gcttcttgta ctctttttgt 720
 tgtgctgtgg ttgcggggtc caatgctacg tattgctttt ggtttccgct ggtaggggc 780
 aatttttctt tcgaactcac agtgaactac acgggtgtgc caccttgctt caccggcaa 840
 gcagccacag aggcctacga acctggcagg tctctttgggt gcaggatagg gtatgatcgc 900
 tgtggggagg acgatcatga tgaactaggg tttgtgggtc cgtctggcct ctccagcgaa 960
 ggccacttga ccagtgttta cgcctggttg gogttcctgt ctttcagtta cacagcccag 1020
 ttccatcctg agatattcgg gatagggat gtgagtcaag tttatggtga catcaggcat 1080
 caattcattt gcgccgttca cgacgggcag aacgccactt tgcctcgcca tgacaatatt 1140
 tcagccgtgt tccagactta ttaccaacat caagtgcagc gcggcaattg gtttcaccta 1200
 gaatggctgc gtcccttctt ttctcttgg ttggttttaa atgtctcttg gtttctcagg 1260
 cgttcgcctg caagccatgt ttcagttcga gtcttgacaga cattaagacc aacaccaccg 1320
 cagcggcagg ctttgctgtc ctccaagaca tcagttgcct taggtatcgc aactcggcct 1380
 ctgaggcgtt tcgcaaaatc cctcagtgtc gtacggcgat agggacaccc atgtatatta 1440
 ctgtcacagc caatgtaacc gatgagaatt atttgcatc ctctgacctt ctcatgcttt 1500

ES 2 719 483 T3

cttcttgctt tttctacgct tctgagatga gtgaaaaggg atttaaagtg gtatattggca 1560
 atgtgtcagg catcgtggct gtgtgcgtca actttaccag ctacgtccaa catgtcaagg 1620
 aatttaccba acgctccttg gtagtcgacc atgtgoggct gctccatttc atgacacctg 1680
 agaccatgag gtgggcaact gttttagcct gtctttttgc cattctgttg gccatttgaa 1740
 tgtttaagta tgttggggaa atgcttgacc gcgggctatt gctcgtcatt gctttttttg 1800
 tgggtgatcg tgccgtcctg gtttgttgog ctogccagcg ccaacagcag caacagctct 1860
 catttacagt tgatttataa cttgacgcta tgtgagctga atggcacaga ttggttagct 1920
 ggtgaatttg actgggcagt ggagtgtttt gtcatttttc ctgtgttgac tcacattgtc 1980
 tcctatgggtg ccctcaccac cagccatttc cttgacacag tcgggtctggc cactgtgtct 2040
 accgccggct tttcccacgg gcggtatggt ctgagtagca tctacgcggc ctgtgccctg 2100
 gctgcggtga tttgcttcgt cattaggttt acgaagaatt gcatgtcctg gcgctactca 2160
 tgtaccagat ataccaactt tcttctggac actaaggga gactctatcg ttggcggtcg 2220
 cctgtcatca tagagaaaag gggtaaagtt gaggtcgaag gtcactctgat cgacctcaag 2280
 agagttgtgc ttgatggttc cgcggaacc cctataacca aagtttcagc ggagcaatgg 2340
 ggtcgtcctt ag 2352

<210> 18

<211> 886

<212> ADN

5 <213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<400> 18

ES 2 719 483 T3

atggggtcgt ccttagatga cttctgccat gatagcacgg ctccacaaa ggtgcttttg	60
gcgttctcta ttacctacac gccagtgatg atatatgcc taaaagtaag tcgcggccga	120
ctgctagggc ttctgcacct tttgatcttc ctaaattgtg ctttcacctt cgggtacatg	180
acattcgtgc actttcagag cacaacaag gtcgcgctca ctatgggagc agtagttgca	240
ctcctttggg ggggtgtactc agccatagaa acctggaaat tcatcacctc cagatgccgt	300
ttgtgcttgc taggccgcaa gtacattttg gccctgccc accacgttga aagtgccgca	360
ggctttcatc cgatagcggc aatgataac cacgcatttg tcgtccggcg tcccggctcc	420
actacggtta acggcacatt ggtgcccggg ttgaaaagcc tcgtggtggg tggcagaaaa	480
gctgtcaaac agggagtggg aaaccttggt aatatgcc aataacaacg gcaagcagca	540
gaagaaaag aaggggatg gccagccagt caatcagctg tgccagatgc tgggtaagat	600
catcgctcag caaaaccagt ccagaggcaa gggaccggga aagaaaaaca agaagaaaaa	660
cccggagaag ccccattttc ctctagcgac tgaagatgat gtcagacatc acttcacctc	720
tggtgagcgg caattgtgtc tgtcgtcaat ccagacagcc tttaatcaag gcgctggaac	780
ttgtaccctg tcagattcag ggaggataag ttacactgtg gagtttagtt tgccgacgca	840
tcatactgtg cgctgatcc gcgtcacagc gtcacctca gcatga	886

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica trivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (CVP2); y un antígeno del virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado del material celular insoluble por centrifugación, por filtración o por precipitación y está libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha tratado con proteína A o proteína G antes de añadirse a la composición inmunogénica.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que el antígeno del virus de SRRP es un virus vivo modificado genéticamente.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno de CVP2 está en forma de un circovirus quimérico tipo 1-tipo 2, comprendiendo dicho virus quimérico un circovirus porcino tipo 1 recombinante inactivado que expresa la proteína ORF2 del circovirus porcino tipo 2.
- 15 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el antígeno de CVP2 está en forma de una proteína ORF2 recombinante.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que la proteína ORF2 recombinante se expresa a partir de un vector de baculovirus.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición comprende además un adyuvante.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en un adyuvante de aceite en agua, un adyuvante de polímero y agua, un adyuvante de agua en aceite, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un adyuvante de vitamina E y combinaciones de los mismos.
- 25 9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la inmunización de un cerdo contra M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP, que comprende administrar al cerdo la composición de la reivindicación 1 a 8.
10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que la composición se administra en una dosis única.
11. La composición para el uso de la reivindicación 9 o 10, en la que la composición se administra a los cerdos que tienen anticuerpos de origen materno contra al menos uno de M.hyo, CVP2 y el virus de SRRP.
- 30 12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la composición se administra a los cerdos de 3 semanas de edad o mayores.
13. Una composición de vacuna que comprende una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 14. Una composición de vacuna como se define en la reivindicación 13, para su uso en la protección de cerdos contra la neumonía enzoótica, el Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Post-destete (SMAP) y el síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
- 40 15. Un kit que comprende una composición inmunogénica o de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que un primer frasco comprende tanto un antígeno de CVP2 como el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo), en el que el sobrenadante está libre tanto de (i) IgG como (ii) inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina y un segundo frasco que contiene el antígeno del virus de SRRP; y opcionalmente, que incluye además un manual de instrucciones con directrices para combinar los contenidos del primer frasco con los contenidos del segundo frasco y para administrar a un cerdo los contenidos combinados del primer y el segundo frascos.
- 45 16. Un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo el procedimiento:
 - i) cultivar M.hyo en un medio adecuado durante periodos que varían de 18-144 horas;
 - ii) posteriormente inactivar el cultivo de M.hyo;
 - iii) cosechar el fluido de cultivo inactivado, en el que el fluido de cultivo inactivado comprende tanto una fracción líquida soluble como un material celular insoluble;
 - iv) separar la fracción líquida soluble del material celular insoluble por filtración, por centrifugación o por precipitación;
 - 50 v) retirar tanto la IgG como los inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina de la fracción líquida soluble separada para formar el sobrenadante de cultivo de M. hyo libre tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos

comprendidos por antígeno unido a inmunoglobulina; y
vi) posteriormente combinar el sobrenadante con un antígeno de CVP2 y un antígeno del virus de SRRP.

Figura 1

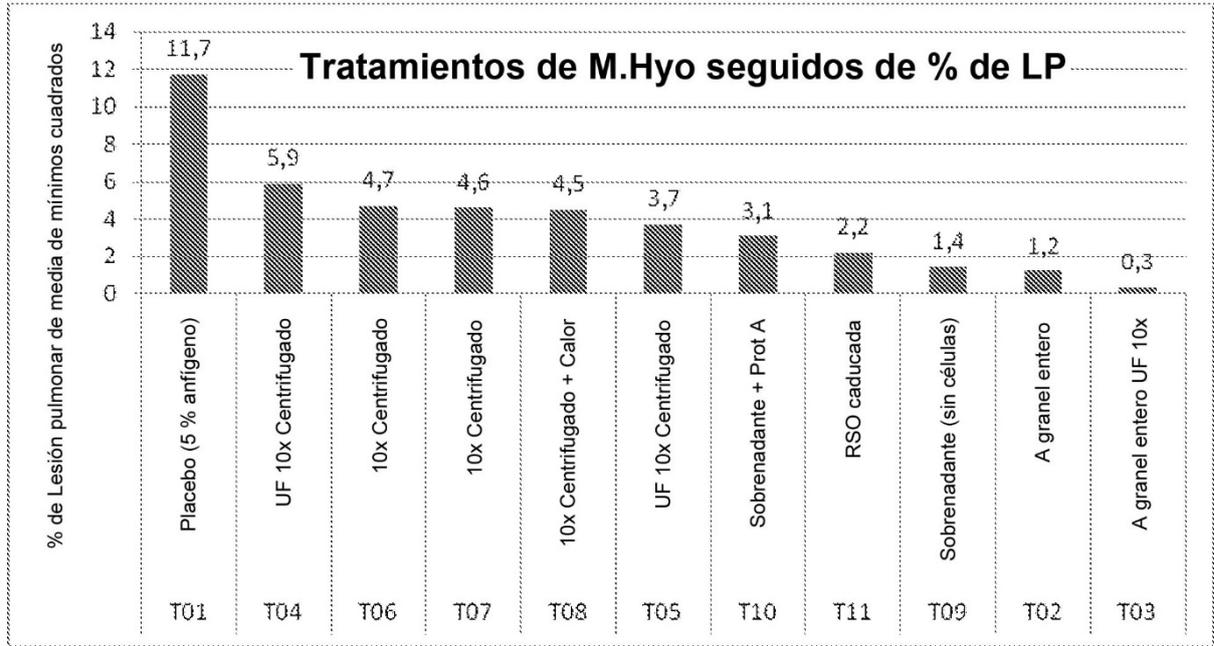


Figura 2

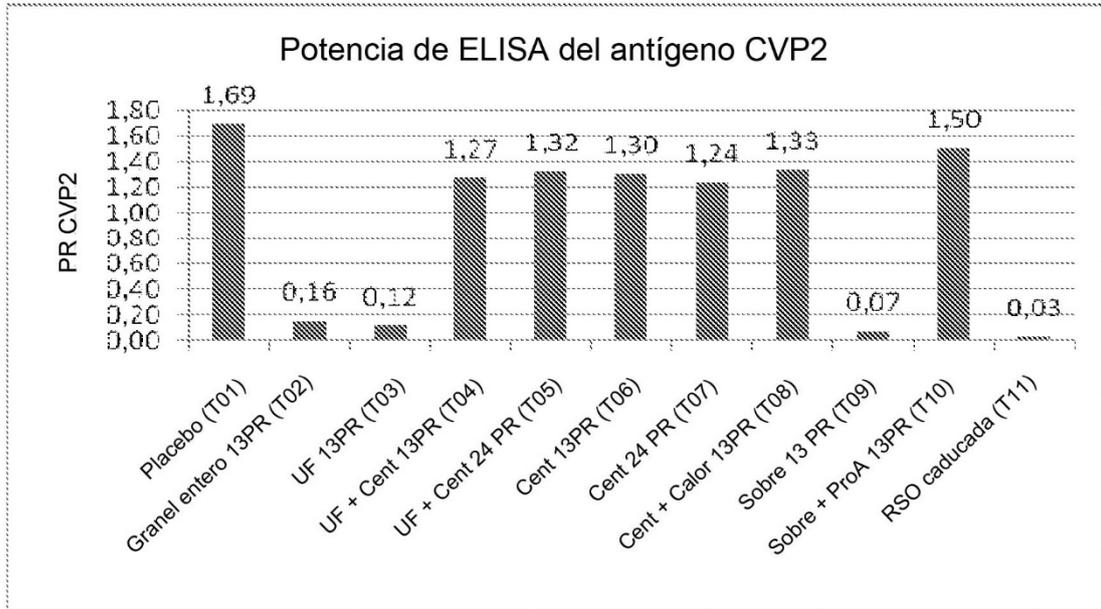


Figura 3

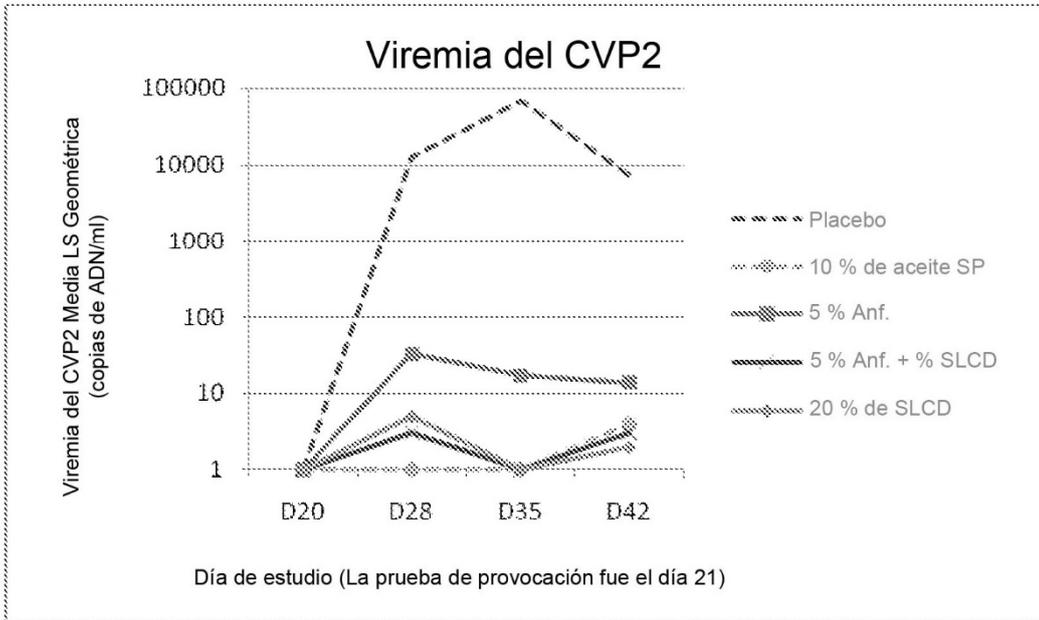


Figura 4

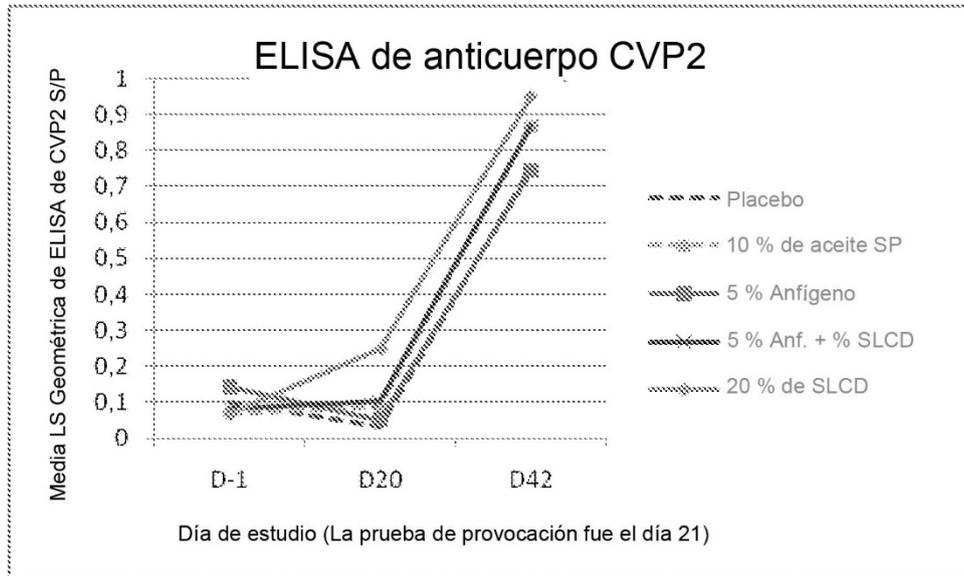


Figura 5

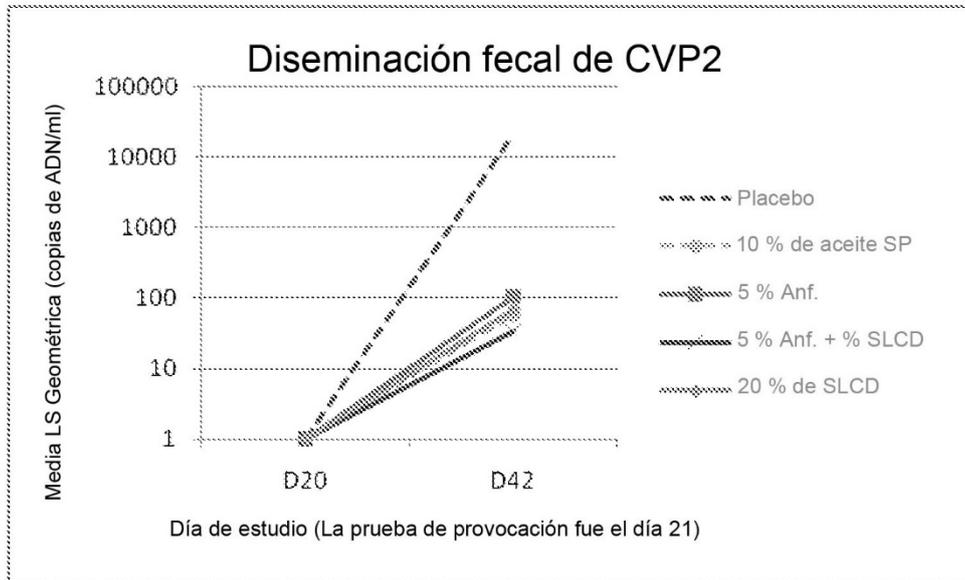


Figura 6

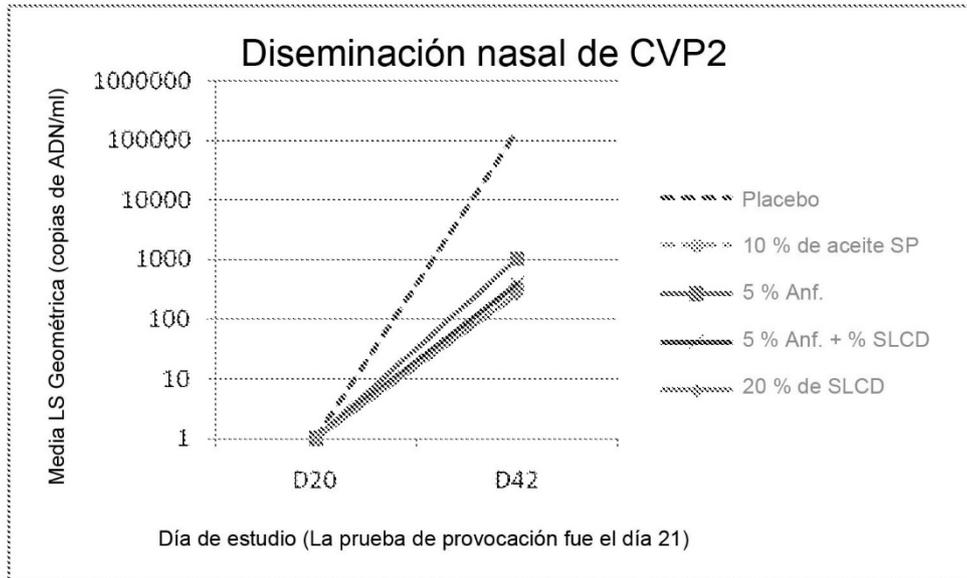


Figura 7A

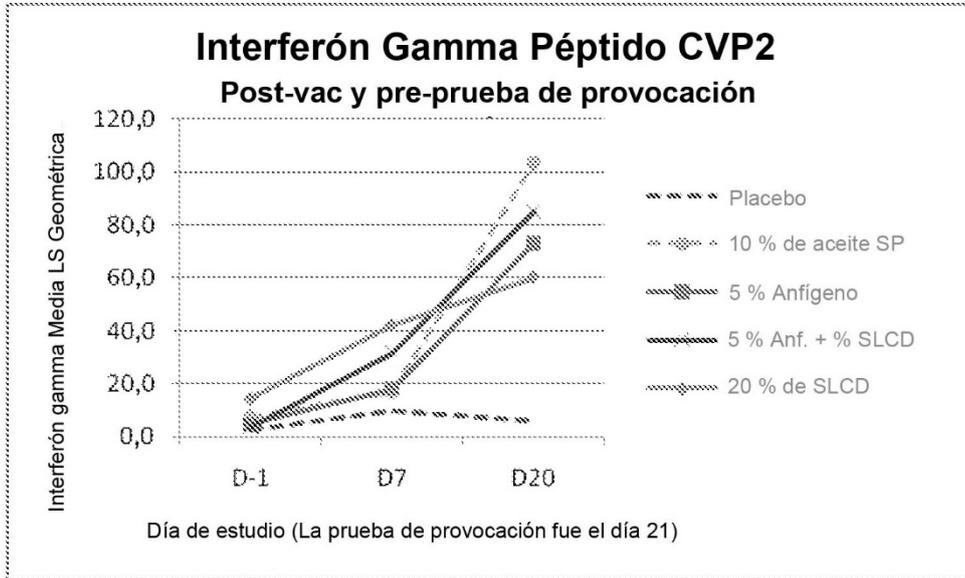


Figura 7B

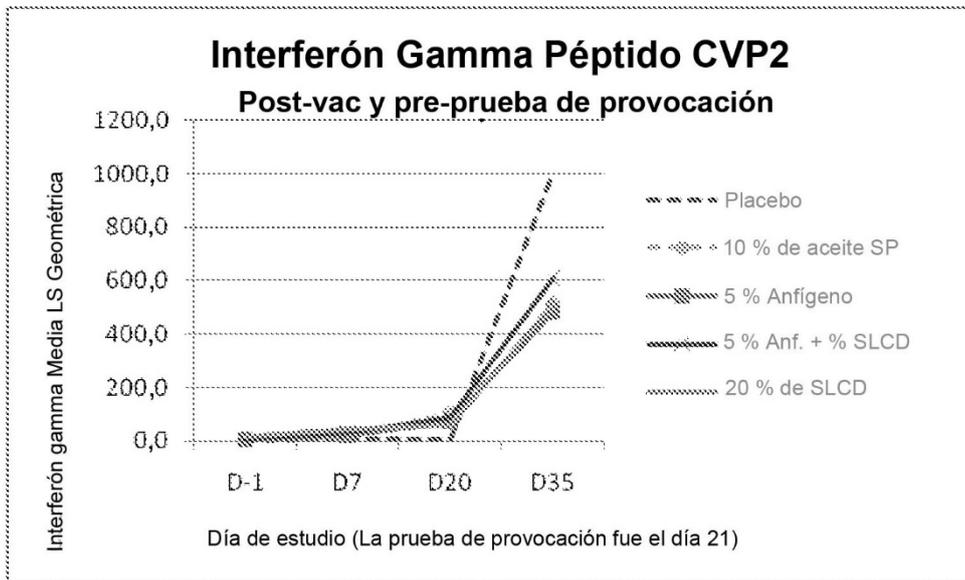


Figura 8A

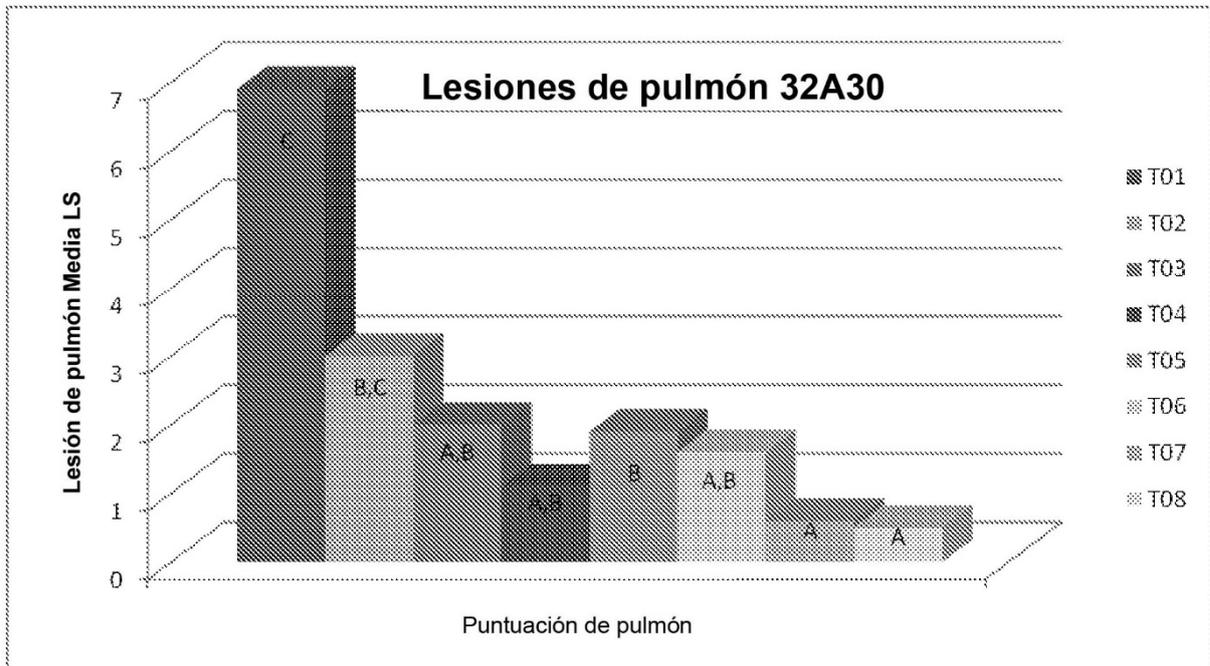


Figura 8B

Contraste	Fracción mitigada	intervalo de confianza del 95 %
T01 vs T02	41,2	-5,9 a 76,5
T01 vs T03	64,7	29,4 a 100
T01 vs T04	76,5	41,2 a 100
T01 vs T05	73,3	33,3 a 100
T01 vs T06	62,5	25 a 100
T01 vs T07	87,5	62,5 a 100
T01 vs T08	88,2	64,7 a 100

Figura 9

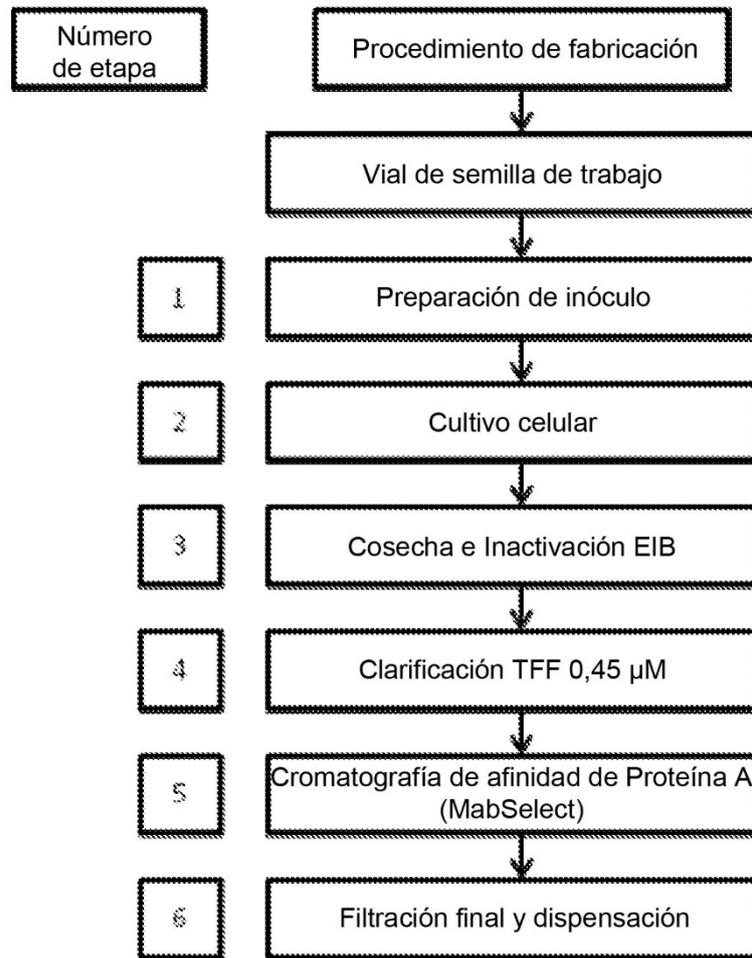


Figura 10

Actividad viricida preliminar	Diferencia del agua			
	100 % rehid.	90/10	90/10	Actividad viricida promedio
	Título liofilizado	Liq. (DMEM) 90/10	Liq. (Ultra) 90/10	
20 % de SLCD	0,8	0,7	2,0	1,3
0,2 % de Carbopol	0,3	-0,3	0,2	-0,1
10 % de aceite SP	0,2	0,0	0,0	0,0
10 % de aceite SP/0,2 % de Carbopol	0,3	-0,2	0,0	-0,1
20 % de SLCD/10 % de aceite SP	1,0	0,3	0,7	0,5
20 % de SLCD/10 % de aceite SP/0,2 % de Carbopol	0,2	0,0	0,5	0,3
5 % de Anfígeno (del almacén del 40 %)	1,0	0,7	1,5	1,1
2,5 % de Anfígeno (del almacén del 40 %)	ND	-0,2	ND	-0,2
5 % de Anfígeno (del almacén del 20 %)	ND	0,8	ND	0,8
2,5 % de Anfígeno (del almacén del 20 %)	ND	0,2	ND	0,2
5 % de Anfígeno (del almacén del 40 %)	ND	1,3	ND	1,3
2,5 % de Anfígeno (del almacén del 40 %)	ND	0,8	ND	0,8
	Indica actividad viricida potencial			

Figura 11

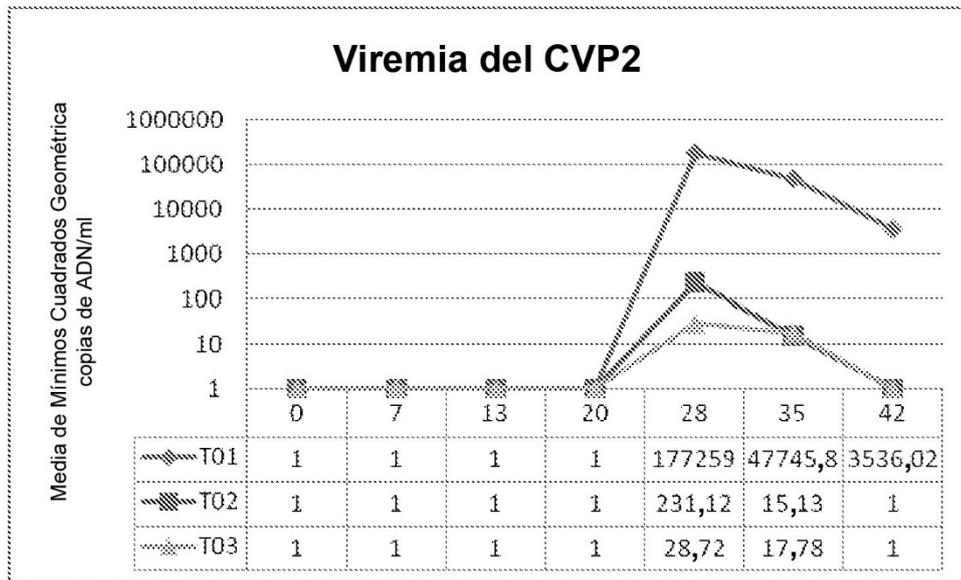


Figura 12

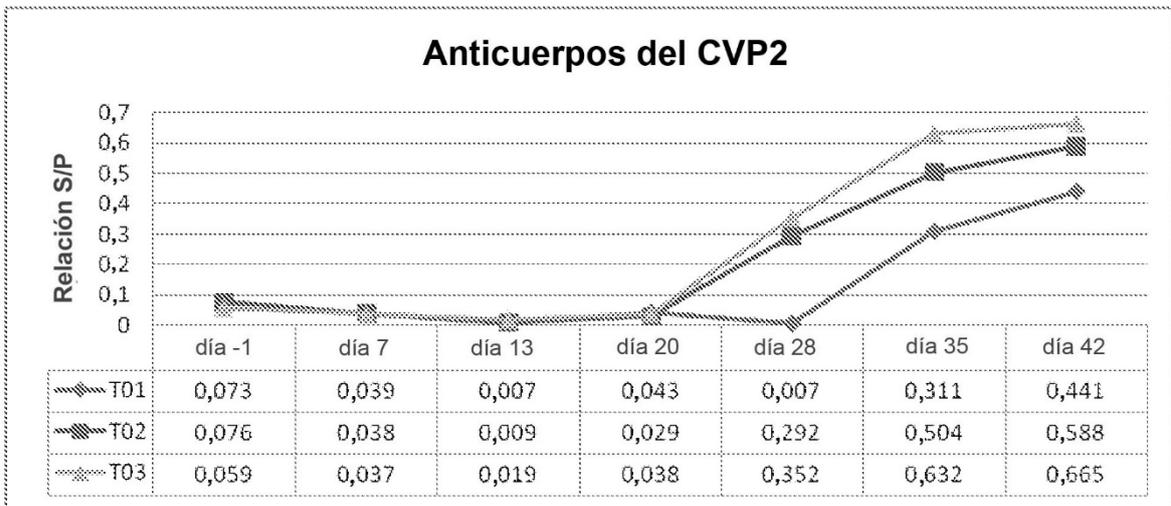


Figura 13

