

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 777**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/155 (2006.01)

A61K 31/7036 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2007** **E 12155194 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** **EP 2481420**

54 Título: **Vacuna porcina anti-PCV2 en dosis única**

30 Prioridad:

15.12.2006 US 870311 P

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

09.10.2019

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA
INC. (100.0%)**

**3239 Satellite Blvd
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 726 777 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 porcina anti-PCV2 en dosis única

Listado de secuencias

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

Antecedentes de la invención**Campo de la Invención**

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

Descripción de la Técnica Anterior

15 El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus de ADN pequeño (17 - 22 nm de diámetro), icosaédrico, sin cubierta, que contiene un genoma circular de cadena sencilla. PCV2 comparte una identidad de secuencia de aproximadamente el 80% con el circovirus porcino tipo 1 (PCV1). Sin embargo, a diferencia de PCV1 que generalmente no es virulento, la infección de cerdos con PCV2 se ha asociado recientemente con varios síndromes patológicos que se han denominado colectivamente Enfermedades asociadas con el Circovirus Porcino (PCVAD) (también denominadas Enfermedades del Circovirus Porcino (PCVD)) (Allan et al, 2006, IPVS Congress). El Síndrome Multisistémico de Desmedro Post-desdete (PMWS) se considera generalmente como la manifestación clínica más importante de PCVAD. (Harding et al., 1997, Swine Health Prod; 5: 201-203; Kennedy et al., 2000, J Comp Pathol; 122: 9-24). El PMWS afecta a cerdos de entre 5-18 semanas de vida. Clínicamente, el PMWS se caracteriza por un adelgazamiento, palidez de la piel, un desarrollo poco vigoroso, dificultad respiratoria, diarrea, icterus e ictericia. En algunos cerdos afectados, resultará evidente una combinación de todos los síntomas, mientras que otros cerdos afectados solamente tendrán uno o dos de estos síntomas. (Muirhead, 2002, Vet. Rec.; 150: 456) Durante la necropsia, también aparecen lesiones microscópicas y macroscópicas en múltiples tejidos y órganos, siendo los órganos linfoides el sitio más común para las lesiones. (Allan y Ellis, 2000; J Vet. Diagn. Invest., 12: 3-14). Se ha observado una fuerte correlación entre la cantidad de ácidos nucleicos o antígenos PCV2 y la gravedad de las lesiones linfoides microscópicas. Las tasas de mortalidad para cerdos infectados con PCV2 pueden aproximarse al 80%. Además del PMWS, PCV2 se ha asociado a varias infecciones más, incluyendo pseudorrabia, síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis post-destete, hepatitis dietética y bronconeumonía supurativa. Sin embargo, la investigación llevada a cabo hasta ahora no ha confirmado si alguno de estos síntomas son, de hecho, el resultado directo de una infección por PCV2. Además, aún no se conoce si alguno de estos síntomas clínicos puede ser reducido o curado de manera eficaz por un agente activo dirigido contra PCV2.

20 Los métodos para tratar las infecciones por PCV2 basados en una vacuna de ADN se describen en la Patente de EEUU No. 6.703.023. En el documento WO03/049703 se describe la producción de una vacuna quimérica viva, que comprende un núcleo de PCV-1 en donde un gen inmunogénico de una cepa patógena de PCV2 reemplaza un gen del núcleo de PCV-1. El documento WO99/18214 ha proporcionado varias cepas de PCV2 y procedimientos para la preparación de una vacuna muerta de PVC2. Sin embargo, no se ha mostrado ningún dato de eficacia. Una vacuna de subunidades eficaz basada en ORF-2 se ha mostrado en WO06/072065 y en WO2007/028823. Se pretende que estas dos vacunas se utilicen para la vacunación/tratamiento de cerdos o cerdos mayores de 3 semanas de vida. Ninguna de estas vacunas se ha descrito para utilizarse en lechones jóvenes, menores de 3 ó 2 semanas de vida.

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

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

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

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

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

Descripción breve de los dibujos

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

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

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

Descripción de la invención

La invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención proporciona:

- 5 [1] Uso de una composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 del circovirus porcino recombinante tipo 2 (PCV2) o de una cantidad eficaz de la proteína ORF2 del PCV2 recombinante para la preparación de un medicamento para ser administrado a animales de 1 a 22 días de vida
- a) para el tratamiento o la profilaxis de la infección por PCV2 en dichos animales; o
- b) para la reducción de los síntomas clínicos causados por o asociados a una infección por PCV2 en dichos animales;
- 10 en donde dichos animales tienen anticuerpos anti-PCV2 de origen materno el día de la vacunación, y en donde dicho medicamento se administra solo una vez.
- [2] El uso de acuerdo con [1], en donde los animales tienen en el día de la vacunación un título de anticuerpos anti-PCV-2 de más de 1:100 en un ensayo inmunológico anti-PCV2 específico.
- 15 [3] El uso de acuerdo con [1] o [2], en donde los animales tienen en el día de la vacunación un título de anticuerpos anti-PCV-2 de más de 1:1000 en un ensayo inmunológico anti-PCV2 específico.
- [4] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en donde el medicamento se administra en el día 7 de vida o más tarde.
- [5] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en donde el medicamento se administra en el día 19 a 22 de vida.
- 20 [6] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde dicha proteína ORF-2 recombinante de PCV2 es una ORF-2 recombinante de PCV2 expresada en baculovirus.
- [7] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en donde el nivel de inclusión del antígeno ORF-2 de PCV2 en dicha composición inmunogénica es de 15 a 400 µg.
- [8] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], en donde el animal es porcino.
- 25 [9] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], en donde los síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductivos, por ejemplo aborto, mortinatos, momias, etc., (7) lesiones similares a Pia, normalmente conocidas por estar asociadas con infecciones por Lawsonia intracellularis (ileítis), (8) linfadenopatía, (9) agotamiento de linfoides y/o (10) histiocitos multinucleados/gigantes, 11) síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), (12) mortalidad asociada a PCVAD, (13) Pérdida de peso asociada a PCVAD, (14) reducción de la variabilidad del crecimiento, (15) reducción de la frecuencia de crías muy pequeñas y débiles, (16) reducción de coinfecciones con la enfermedad reproductiva y respiratoria compleja porcina (PRRSV), (17) inflamación linfoide.
- 30 [10] El uso de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], en donde dicho tratamiento o profilaxis de la infección por PCV2 da como resultado una mejora en comparación con los animales de un grupo control no tratado de la misma especie en un parámetro de eficacia de la vacuna seleccionado del grupo que consiste en una reducción en la pérdida de peso, una menor duración de la viremia, un final más temprano de la viremia, una menor carga de virus o combinaciones de las mismas.
- 35 [11] Una cantidad eficaz de la proteína ORF2 del circovirus porcino recombinante tipo 2 (PCV2) o una composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 del circovirus porcino recombinante tipo 2 (PCV2) para uso en un método para
- 40 a) el tratamiento o profilaxis de la infección por PCV2; o
- b) reducción de los síntomas clínicos causados por o asociados a una infección de PCV2;
- 45 en donde dicha cantidad eficaz de proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o dicha composición inmunogénica es para administrar solo una vez a animales que tengan anticuerpos anti-PCV2 de origen materno y que tengan entre 1 y 22 días de vida.
- [12] La cantidad eficaz de la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con [11], en donde los animales tienen un título de anticuerpos anti-PCV-2 de más de 1:100 en un ensayo inmunológico anti-PCV2 específico.

[13] La cantidad eficaz de la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con [11] o [12], en donde los animales tienen un título de anticuerpos anti-PCV-2 de más de 1:1000 en un ensayo inmunológico anti-PCV2.

5 [14] La cantidad eficaz de la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con uno cualquiera de [11] a [13], en donde la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 se administra el día 7 de vida o más tarde.

10 [15] La cantidad eficaz de la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con uno cualquiera de [11] a [14], en donde la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 se administra en el periodo de 19 a 22 días de vida.

[16] La cantidad eficaz de la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con uno cualquiera de [11] a [15], en donde dicha proteína ORF-2 recombinante de PCV2 es una ORF-2 recombinante de PCV2 expresada en baculovirus.

15 [17] La cantidad eficaz de proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con uno cualquiera de [11] a [16], en donde el nivel de inclusión del antígeno ORF-2 de PCV2 en dicha composición inmunogénica es de 15 a 400 µg .

20 [18] La cantidad eficaz de proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con uno cualquiera de [11] a [17], en donde el animal es porcino.

25 [19] La cantidad eficaz de la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con uno cualquiera de [11] a [18], en donde los síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductivos, por ejemplo aborto, mortinatos, momias, etc., (7) lesiones similares a Pia, normalmente conocidas por estar asociadas con infecciones por *Lawsonia intracellularis* (ileítis), (8) linfadenopatía, (9) agotamiento de linfoides y/o (10) histiocitos multinucleados/gigantes, (11) síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), (12) mortalidad asociada a PCVAD, (13) pérdida de peso asociada a PCVAD, (14) reducción de la variabilidad del crecimiento, (15) reducción de la frecuencia de crías muy pequeñas y débiles, (16) reducción de coinfecciones con enfermedad reproductiva y respiratoria compleja porcina (PRRSV), (17) inflamación linfoide.

30

35 [20] La cantidad eficaz de la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF-2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con uno cualquiera de [11] a [19], en donde dicho tratamiento o profilaxis de la infección por PCV2 da como resultado una mejora en comparación con los animales de un grupo control no tratado de la misma especie en un parámetro de eficacia de la vacuna seleccionado del grupo que consiste en una reducción de la pérdida de peso, una menor duración de la viremia, un final más temprano de la viremia, una menor carga de virus o combinaciones de las mismas.

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

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

50

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

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

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

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

También se incluyen dentro de la definición antígenos sintéticos, por ejemplo poliepítomos, epítomos flanqueantes y otros antígenos recombinantes u obtenidos de forma sintética. Véanse, por ejemplo, Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de junio - 3 de julio, 1998.

Según un aspecto adicional, la composición inmunogénica tal y como se utiliza en la presente memoria comprende más preferiblemente el polipéptido, o un fragmento de éste, expresado por ORF-2 de PCV2. El ADN y proteína ORF-2 de PCV2, utilizados en la presente memoria para la preparación de las composiciones y en los procesos proporcionados en la presente memoria, es un dominio altamente conservado en aislados de PCV2 y, por esto, cualquier ORF-2 de PCV2 será eficaz como fuente del ADN y/o polipéptido de ORF-2 de PCV tal y como se utiliza en la presente memoria. Una proteína ORF-2 de PCV2 preferida es la de SEQ ID NO: 11 de WO06/072065. Un polipéptido ORF-2 de PCV más preferido se proporciona como SEQ ID NO: 5 de WO06/072065. Sin embargo, se entiende por los expertos en la técnica que esta secuencia podría variar tanto como 6-10% en la homología de la secuencia y aún así conservar las características antigénicas que la hacen útil en las composiciones inmunogénicas. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden estimarse, por ejemplo, por el experimento de exposición tal y como se proporciona en el Ejemplo 4 de WO06/072065. Más aún, se sigue conservando la característica antigénica de un antígeno modificado cuando el antígeno modificado confiere al menos un 70%, preferiblemente un 80%, más preferiblemente un 90% de la inmunidad protectora si se compara con la proteína ORF-2 de PCV2 codificada por la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 tal y como se proporciona en WO06/072065.

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en donde el antígeno PCV2 es una proteína antigénica ORF-2 de PCV2 que tiene al menos un 70%, preferiblemente un 80%, aún más preferiblemente un 90% de la inmunidad protectora si se compara con la proteína ORF-2 de PCV2 codificada por la

secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 tal y como se proporciona en WO06/072065. Preferiblemente dicha ORF-2 de PCV2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID N°: 5 de WO06/072065.

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

Como se ha mencionado anteriormente, un polipéptido ORF-2 de PCV2 más preferido es uno cualquiera codificado por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Sin embargo, se entiende por los expertos en la técnica que esta secuencia podría variar tanto como 6-20% en la homología de la secuencia y aún así conservar las características antigénicas que la hacen útil en las composiciones inmunogénicas. En algunas formas, se utiliza una forma truncada o sustituida, o fragmento de este polipéptido ORF-2 de PCV2 como el componente antigénico en la composición. Preferiblemente, dichas formas truncadas o sustituidas, o fragmentos comprenderán al menos 18 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos de longitud completa de ORF-2 de PCV2, por ejemplo de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, las formas truncadas o sustituidas, o fragmentos, tendrán al menos 30, más preferiblemente al menos 45, y todavía más preferiblemente al menos 57 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos de longitud completa de ORF-2 de PCV2, por ejemplo la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

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

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

20 “Homología de secuencia”, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un método para determinar el grado de relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, se alinean óptimamente dos o más secuencias y, si es necesario, se introducen huecos. Sin embargo, en contraposición con la “identidad de secuencia”, las sustituciones conservativas de aminoácidos se cuentan como un apareamiento cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido que tiene un 95% de homología de secuencia con una secuencia de referencia, el 85%, preferiblemente el 90%, aún más preferiblemente el 95% de los restos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de referencia debe aparecerse o comprender una sustitución conservativa con otro aminoácido o nucleótido, o un cierto número de aminoácidos o nucleótidos hasta el 25 15%, preferiblemente hasta el 10%, aún más preferiblemente hasta el 5% del total de restos de aminoácidos o nucleótidos, que no incluyen sustituciones conservativas, en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Preferiblemente, la secuencia homóloga comprende al menos un tramo de 50, aún más preferiblemente de al menos 100, aún más preferiblemente de al menos 250, y aún más preferiblemente de al menos 500 nucleótidos.

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

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

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

45 i) un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 de WO06/07065;

ii) cualquier polipéptido que es al menos un 80% homólogo con el polipéptido de i),

iii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos de i) y/o ii),

iv) la porción inmunogénica de iii), que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos incluidos en las secuencias de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 de WO06/072065,

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

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

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

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

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

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

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

El polipéptido ORF-2 de PCV2 utilizado en la composición inmunogénica según la presente invención se puede obtener de cualquier manera, incluyendo el aislamiento y la purificación de ORF-2 de PCV2, síntesis estándar de proteínas y metodología recombinante. Los métodos preferidos para obtener el polipéptido ORF-2 de PCV2 se proporcionan en WO06/072065. Brevemente, se infectan células susceptibles con un vector viral recombinante que contiene secuencias codificadoras de ADN de ORF-2 de PCV2, el polipéptido ORF-2 de PCV2 es expresado por el virus recombinante, y el polipéptido ORF-2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración y se inactiva por cualquier método convencional, preferiblemente utilizando etilénimina binaria, que luego se neutraliza para detener el proceso de inactivación.

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

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, en donde el antígeno PCV2 es ORF-2 recombinante de PCV2, preferiblemente ORF-2 de PCV2 expresada en un baculovirus. Preferiblemente, las ORF-2 recombinante de PCV2s o expresadas en baculovirus que tienen la secuencia descrita

anteriormente.

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

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

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

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

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

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

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

Un ejemplo adicional de adyuvante es un compuesto elegido entre los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están entrecruzados, especialmente con polialquenoil-éteres de azúcares o

- polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, nº 2, junio 1996). Las personas expertas en la técnica también pueden aludir a la patente de EEUU. No. 2.909.462 que describe dichos polímeros acrílicos entrecruzados con un compuesto polihidroxiado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos reemplazados por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener por sí mismos otros sustituyentes tal como metilo. Los productos vendidos con el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EEUU) son particularmente apropiados. Carbopol™ tal como se utiliza en toda esta memoria descriptiva es una designación comercial para polímeros de poli(ácido acrílico) que se conocen también como Carbomer. Están entrecruzados con una alil-sacarosa o con alil-pentaeritritol. Entre ellos se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, aún más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferido, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.
- Los adyuvantes adecuados adicionales incluyen, pero no están limitados a, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), copolímero de bloques (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil- lípido A, adyuvante de lípido-amina Avridina, enterotoxina térmicamente lábil procedente de E. coli (recombinante o de otra forma), toxina del cólera, IMS 1314, o dipéptido muramilo, entre muchos otros.
- Preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. Aún más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis. Lo más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.
- Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más vehículos aceptables farmacéuticamente. Tal y como se utiliza en la presente memoria, "un vehículo aceptable farmacéuticamente" incluye cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retardan la adsorción y similares. Lo más preferiblemente, la composición proporcionada con la presente, contiene proteína ORF-2 de PCV2 recuperada del sobrenadante de células cultivadas in vitro, en donde dichas células estaban infectadas con un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF-2 de PCV2 y que expresan proteína ORF-2 de PCV2, y en donde dicho cultivo celular se trató con aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM de BEI, preferiblemente con aproximadamente 5 mM de BEI, para inactivar el vector viral, y una concentración equivalente de un agente de neutralización, preferiblemente disolución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM.
- La presente descripción también se refiere a una composición inmunogénica, que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF-2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF-2 de PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) un agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, preferiblemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; y vi) un adyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971 en las cantidades descritas anteriormente; en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor de 1 µm. Según un aspecto adicional, esta composición inmunogénica comprende, además, una sal aceptable farmacéuticamente, preferiblemente una sal fosfato en concentraciones aceptables fisiológicamente. Preferiblemente, el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a un pH fisiológico, lo que significa entre aproximadamente 6,5 y 7,5.
- La composición inmunogénica, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una composición que comprende, por un ml i) al menos 1,6 µg de proteína ORF-2 de PCV2 descrita anteriormente, preferiblemente menos de 20 µg ii) al menos una porción de baculovirus que expresa dicha proteína ORF-2 de PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) aproximadamente 2 a 8 mM de BEI, v) tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; y vi) aproximadamente 1 mg de Carbopol 971, y vii) sal fosfato en una concentración aceptable fisiológicamente; en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor de 1 µm y el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a aproximadamente 6,5 a 7,5.
- Las composiciones inmunogénicas pueden incluir además uno o más agentes inmunomoduladores adicionales tales como, por ejemplo, interleuquinas, interferones u otras citoquinas. Las composiciones inmunogénicas también pueden incluir Gentamicina y Mertiolato. Si bien las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 2.000 µg de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 250 µg/ml de dosis de la composición de vacuna. Así, la composición inmunogénica, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere también a una composición que comprende de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos

de aproximadamente 30 µg/ml de antibióticos.

La composición inmunogénica, tal y como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF-2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector viral que expresa dicha proteína ORF-2 de PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) un agente inactivante para inactivar el vector viral recombinante, preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, preferiblemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; vi) un adyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971, en las cantidades descritas anteriormente; vii) una concentración aceptable farmacéuticamente de un tampón salino, preferiblemente de una sal fosfato, y viii) un agente anti-microbiológico activo; en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor de 1 µm.

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

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

Para la investigación de una posible interferencia del antígeno PCV2 con el anticuerpo materno se realizó un estudio en donde se determinaron las titulaciones de anticuerpo de los animales en estudio en el momento de la vacunación que se agruparon en una clase de anticuerpos baja, moderada y alta: Las titulaciones medias geométricas de < 1:100 se consideraron como titulaciones bajas de anticuerpo, las titulaciones de 1:100 a 1:1.000 se consideraron como titulaciones moderadas de anticuerpo y las titulaciones de >1:1.000 se consideraron como titulaciones altas de anticuerpo. Este patrón de agrupamiento es comparable con el realizado en un estudio de campo Canadiense en donde las titulaciones de anticuerpo de 1:80 se consideraron como bajas, las titulaciones de anticuerpo de 1:640 como moderadas y las titulaciones de anticuerpo de > 1:1.280 como altas (Larochelle et al., 2003, Can. J. Vet. Res.; 67: 114-120). Con el fin de analizar el impacto de las titulaciones bajas, moderadas y altas de anticuerpo en el momento de la vacunación en la viremia, se compararon los animales vacunados y los tratados con placebo respecto a la aparición, finalización, duración de la viremia, el número de días de muestreo positivos y la carga viral. Sorprendentemente, se encontró que la presencia de anticuerpos anti-PCV2, en particular de anticuerpos procedentes de la madre, no tenía un impacto significativo en ninguno de estos parámetros. En otras palabras, sorprendentemente se encontró que la eficacia del antígeno PCV2 en la prevención y tratamiento de una infección por PCV2 o en la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales no se vio afectada en el día de la vacunación por la presencia de anticuerpos anti-PCV2, preferiblemente por títulos de anticuerpo anti-PCV2 de hasta 1:100, preferiblemente de más de 1:100, aún más preferiblemente de más de 1:250, aún más preferiblemente de más de 1:500, aún más preferiblemente de 1:640; aún más preferiblemente de más de 1:750, lo más preferiblemente de más de 1:1.000. Este efecto podría mostrarse en un experimento de vacunación de una administración, que significa que el antígeno PCV2 se administró sólo una vez y sin ninguna administración posterior de antígeno PCV2.

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

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos maternos, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 al animal que necesite dicho tratamiento, preferiblemente de menos de 20 µg/dosis en donde dicho animal tiene una titulación detectable de anticuerpo anti-PCV2 de hasta 1:100, preferiblemente de más de 1:100, aún más preferiblemente de más de 1:250, aún más preferiblemente de más de 1:500, aún más preferiblemente de 1:640; aún más preferiblemente de más de 1:750, lo más preferiblemente de más de 1:1.000.. Preferiblemente, esta titulación de anticuerpos anti-PCV2 es detectable y cuantificable en un ensayo inmunológico específico anti-PCV2, preferiblemente en el ensayo tal y como se describe en el Ejemplo 2. Más preferiblemente, estos anticuerpos anti-PCV-2 son anticuerpos procedentes de la

madre. El antígeno PCV2 sólo se administra una vez, preferiblemente con una dosis de menos de 20 µg/dosis.

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

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

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

Debido a la ubicuidad de PCV2 en el campo la mayoría de los lechones jóvenes son seropositivos respecto a PCV2. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o

profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los síntomas clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes que tienen anticuerpos anti-PCV2 en el día de la vacunación, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antígeno PCV2 a un animal de 1 a 22 días de vida, preferiblemente de 1 a 20 días de vida, más preferiblemente de 1 a 15 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 14 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 12 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 10 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 8 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 7 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 6 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 5 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 4 días de vida, aún más preferiblemente de 1 a 3 días de vida, aún más preferiblemente en el día 1 ó 2 de vida, lo más preferiblemente en el día 1 de vida que necesite dicho tratamiento. Preferiblemente dichos animales jóvenes, en el día de la vacunación/tratamiento, tienen una titulación detectable de anticuerpo anti-PCV2 de hasta 1:100, preferiblemente de más de 1:100, aún más preferiblemente de más de 1:250, aún más preferiblemente de más de 1:500, aún más preferiblemente de 1:640, aún más preferiblemente de más de 1:750, lo más preferiblemente de más de 1:1.000 en el día de la vacunación/tratamiento. Preferiblemente, se requiere menos de 20 µg/dosis de antígeno PCV2 para conferir una inmunidad suficiente a estos animales jóvenes. De acuerdo con una realización más preferida, el antígeno PCV2, preferiblemente menos de 20 µg, se administra sólo una vez al animal joven que necesite dicho tratamiento.

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

El término "una cantidad eficaz" tal y como se utiliza en la presente memoria significa, pero no está limitado a, una cantidad de antígeno que incita o es capaz de incitar una respuesta inmune en un animal, al que se administra dicha dosis eficaz del antígeno PCV2. Preferiblemente, una cantidad eficaz se define como una cantidad de antígeno que confiere al menos una duración de la inmunidad (DOI) de 10 semanas, preferiblemente al menos una (DOI) de 12 semanas, más preferiblemente al menos una (DOI) de 15 semanas, lo más preferiblemente al menos una (DOI) de 20 semanas.

La cantidad que es eficaz depende de los ingredientes de la vacuna y del esquema de administración. Típicamente, cuando se utiliza una preparación con un virus inactivado o un virus vivo modificado en la vacuna de combinación, se utilizará una cantidad de vacuna que contenga aproximadamente $10^{2.0}$ a aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀ por dosis, preferiblemente aproximadamente $10^{3.0}$ a aproximadamente $10^{8.0}$ DICT₅₀ por dosis, más preferiblemente, aproximadamente $10^{4.0}$ a aproximadamente $10^{8.0}$ DICT₅₀ por dosis. En particular, cuando se utiliza en las vacunas PCV2 vivo modificado, la dosis recomendada para administrarse al animal susceptible es preferiblemente aproximadamente $10^{3.0}$ DICT₅₀ (dosis que infecta al 50% de los cultivos de tejido)/dosis a aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/dosis y más preferiblemente aproximadamente $10^{4.0}$ DICT₅₀/dosis a aproximadamente $10^{5.0}$ DICT₅₀/dosis. En general, la cantidad de antígeno será entre 0,2 y 5.000 microgramos, y entre $10^{2.0}$ y $10^{9.0}$ DICT₅₀, preferiblemente entre $10^{3.0}$ y $10^{6.0}$ DICT₅₀, más preferiblemente entre $10^{4.0}$ y $10^{5.0}$ DICT₅₀, cuando se utiliza antígeno purificado.

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

aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/dosis.

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

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

60 La composición según la invención puede aplicarse por vía oral, intradérmica, intratraqueal o intravaginal. Preferiblemente, la composición puede aplicarse por vía intramuscular o intranasal, lo más preferiblemente por vía intramuscular. En un cuerpo animal, se puede manifestar ventajoso aplicar las composiciones farmacéuticas, según se ha descrito anteriormente, en tejidos diana a través de una inyección intravenosa o por inyección directa. Para la

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

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

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

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

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

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

Ejemplo 1

Preparación del antígeno ORF-2 de PCV2

Se crecieron cultivos de células SF+ almacenados en nitrógeno líquido en medio Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) en suspensión en matraces de centrifugación estériles con agitación constante. Los cultivos se crecieron en matraces de centrifugación de 100 mL a 250 mL con 25 a 150 mL de medio exento de suero Excell 420. Cuando las células se habían multiplicado hasta una densidad de células de $1,0 - 8,0 \times 10^6$ células/mL, éstas se dividieron en nuevos recipientes con una densidad de siembra de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. Los cultivos por expansión subsiguientes se crecieron en matraces de centrifugación de hasta 36 litros de capacidad o en biorreactores de acero inoxidable de hasta 300 litros durante un periodo de 2-7 días a $25 - 29^\circ\text{C}$.

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

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

µg de antígeno ORF-2 de PCV2.

Ejemplo 2

Inmunoensayo Anti PCV-2

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

Ejemplo 3

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

25 que tienen niveles bajos o altos de anticuerpos anti-PCV2

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

Realización del estudio

35 En el estudio se incluyeron aproximadamente 500 animales. Los animales del estudio se equilibraron y distribuyeron por igual en los dos grupos de tratamiento respecto al peso corporal inicial y asignación de lecho. A los 20 días de vida todos los animales del estudio recibieron una única dosis (1 ml) de la vacuna de PCV2 (Producto Veterinario en Investigación, IVP) o una única dosis (1 ml) de un sobrenadante de cultivo celular adyuvado que contiene placebo (Producto Control, CP) por inyección intramuscular en el lado derecho del cuello. Los animales del estudio se evaluaron hasta el final del engorde.

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

45 Resultados

Titulaciones de Anticuerpo Iniciales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25

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

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

r: coeficiente de correlación por rangos de Spearman
P: valor p del ensayo en r=0: ns: no significativo, p>0,05;
** significativo, p< 0,01
n: Número de animales

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

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

15 Conclusión

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

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

Ejemplo 4

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

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

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

Realización del estudio

Ciento veinte (120) cerdos criados convencionalmente, 21 días de vida en el Día 0 (D0), fueron asignados

completamente al azar a uno de cinco grupos de tratamiento. En el D0, se recogieron muestras de sangre de todos los cerdos,

- El Grupo 1a se trató con el Producto Veterinario en Investigación (IVP; vacuna de referencia de PCV2) a las 3 semanas de vida.

5 • El Grupo 1b se trató con el Producto Veterinario en Investigación (IVP; vacuna de referencia de PCV2) a las 8 semanas de vida.

- El Grupo 2 se trató con Producto Control (CP) a las 3 semanas de vida.

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

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

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

15 Todos los cerdos restantes recibieron 2,0 mL de hemocianina de lapa (KLH) emulsionada en adyuvante de Freund incompleto (ICFA) IM en D60 (Día Después de la Exposición (DPC) -3) y D66 (DPC 3). En D63 (DPC 0), los cerdos restantes recibieron 1,0 mL de material de exposición de PCV2 Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory (ISUVDL) (4,75 log₁₀ DICT₅₀/mL) IM y 1,0 mL del mismo material IN. Se recogieron los pesos corporales, temperaturas rectales, observaciones clínicas, muestras de sangre y torundas nasales en el día de la exposición y periódicamente después de la exposición. En la necropsia de cada cerdo, se anotaron las grandes lesiones y se

20 recogieron muestras de tejido pulmonar y linfoide. Los tejidos pulmonar y linfoide se examinaron microscópicamente por ISUVDL para detectar lesiones y para detectar la presencia de antígeno PCV2 por ensayo de IHC. En la Tabla 4 siguiente se muestra una descripción general de la fase de exposición del estudio.

Tabla 4: Fase de Exposición del Estudio

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

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

Resultados

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

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

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

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

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

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

Listado de secuencias

- <110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
- <120> Tratamiento de cerdos con antígenos de PCV2
- <130> P01-2169
- <160> 11
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 8
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Esta es una secuencia de Kozak modificada.
- <400> 1

ES 2 726 777 T3

ccgccatg 8
 <210> 2
 <211> 6
 <212> DNA
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Esta es una secuencia Eco R1 recombinante.
 <400> 2
 gaattc 6
 10 <210> 3
 <211> 713
 <212> DNA
 <213> Circovirus porcino
 <400> 3
 cagctatgac gtatccaagg aggcggtacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgcccgc cgcccctggc tcgtccacc cccgccaccgc taccggtgga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccggcc tctcccgcac cttcggatat actgtggaga 180
 aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240
 ttgttcccc ggagggggg accaacaana tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgcata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcaactgctt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 15 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttaa accctaaatg aat 713
 <210> 4
 <211> 713
 <212> DNA
 <213> Circovirus porcino
 20 <400> 4
 ccgccatgac gtatccaagg aggcggtacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgcccgc cgcccctggc tcgtccacc cccgccaccgc taccggtgga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccggcc tctcccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
 ctaccacagt cacaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
 ttgttcccc ggagggggg accaacaana tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct cccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgcata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcaactgctt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttga accctaagaa ttc 713
 <210> 5
 <211> 233
 <212> PRT
 25 <213> Circovirus porcino
 <400> 5

ES 2 726 777 T3

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

- 5 <210> 6
<211> 233
<212> PRT
<213> Circovirus porcino
<400> 6

ES 2 726 777 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
 225 230

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

5

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

<400> 7
 gcgccgcgcg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcggtaccg cagaagaaga 60
 caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcccgc gccctggct cgtccacccc 120
 cgccaccgct accggtggag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctccgcacc 180
 ttccgatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgcct cctgggcggt ggacatgatg 240
 agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc 300
 tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggcctgctc ccccatcacc 360
 cagggtgata ggggagtggt ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaaag 420
 gccacagccc taacctatga cccatagta aactactcct cccgccatac aatcccccaa 480
 cccttctcct accactcccg ttacttcaca ccaaacctg ttcttgactc cactattgat 540
 tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggtgta ggctacaaac ctctagaaat 600
 gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat 660
 atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagacc 720
 ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggcgcg 756

10

<210> 8

ES 2 726 777 T3

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

<220>

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

<400> 8

```

aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgtttatg agataagatt 60
gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt 120
ataaaagatt ctaaatctgat atgtttttaa acacctttgc ggcccgagtt gtttgcgtac 180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt 240
ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca tttttgcgg 300
gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata 360
gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa ttacagaaa agtgtcccgg catgttgggtg 420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgca atatttaatg 480
cacaccctgg gtattgccc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac 540
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc 600
tttaacaaat actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaacta 660
tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttccaa tcgacggtag 720
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttacgt ttatgctttt 780
ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgtca 840
cgcacaacac cggatgtttg cgcttgtccg cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat 900
ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttctctt 960
tcttttgcat ggtttcctgg aagccggtgt acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg 1020
tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgccttgat ggcaacgat cgttcaataa 1080
actcttgttt tttaacaagt tcctcggttt tttgcgccac caccgcttgc agcgcgtttg 1140
tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctcccgtt 1200
gtttgatcgc gggatcgtag ttgccggtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa 1260
gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc 1320
cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaataacag cgggtcgccc cttttcacga 1380
cgctgtaga ggtagggccc ccattttgga tggctctgctc aaataacgat ttgtatttat 1440
tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaactg tttagcgacgt 1500
ccttgccac gaaccggacc tgttggctgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat 1560
cttctccaaa tttaaatctt ccaattttaa cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat 1620
  
```

ES 2 726 777 T3

tttgaacaa	ctattgtttt	ttaacgcaa	ctaaacttat	tgtggaagc	aataattaaa	1680
tatgggggaa	catgcgccgc	tacaacactc	gtcgttatga	acgcagacgg	cgccggctctc	1740
ggcgcaagcg	gctaaaacgt	gttgcgcggt	caacgcggca	aacatcgcaa	aagccaatag	1800
tacagttttg	atttgcatat	taacgcggat	tttttaaat	atcttattta	ataaatagtt	1860
atgacgceta	caactccccg	cccgcgttga	ctcgetgcac	ctcagacagt	tcgttgacgc	1920
cttctccgt	gtggccgaac	acgtcgagcg	ggtggtcgat	gaccagcggc	gtgcccacg	1980
cgacgcacaa	gtatctgtac	accgaatgat	cgtcgggcga	aggcacgtcg	gcctccaagt	2040
ggcaatattg	gcaaattcga	aaatatatac	agttggggtg	tttggcgata	tctatcgtgg	2100
cgttgggcat	gtacgtccga	acgttgattt	gcatgcaagc	cgaaattaaa	tcattgcgat	2160
tagtgcgatt	aaaacgttgt	acatcctcgc	ttttaatcat	gccgtcgatt	aaatcgcgca	2220
atcgagtcaa	gtgatcaaa	tgtggaataa	tgttttcttt	gtattcccga	gtcaagcgca	2280
gcgcgatatt	taacaaacta	gccatcttgt	aagttagttt	catttaatgc	aactttatcc	2340
aataatata	tatgtatcgc	acgtcaagaa	ttaacaatgc	gccggttgc	gcatctcaac	2400
acgactatga	tagagatcaa	ataaagcgcg	aattaaatag	cttgcgacgc	aacgtgcacg	2460
atctgtgcac	gcgttccggc	acgagctttg	attgtaataa	gtttttacga	agcgatgaca	2520
tgacccccgt	agtgacaacg	atcacgccca	aaagaactgc	cgactacaaa	attaccgagt	2580
atgtcggatg	cgttaaaact	attaagccat	ccaatcgacc	gttagtcgaa	tcaggaccgc	2640
tgtgcgaga	aacgcggaag	tatggcgaat	gcatcgtata	acgtgtggag	tcgctcatt	2700
agagcgtcat	gtttagacaa	gaaagctaca	tatttaattg	atcccgatga	ttttattgat	2760
aaatlgaccc	taactccata	cacggtatcc	tacaatggcg	gggttttgg	caaaatctcc	2820
ggactcggat	tgtacatgct	gttaacggct	ccgcccacta	ttaatgaaat	taaaaattcc	2880
aattttaaaa	aacgcagcaa	gagaaaacatt	tgtatgaaag	aatgcgtaga	aggaagaaa	2940
aatgctgctg	acatgctgaa	caacaagatt	aatatgcctc	cgtgtataaa	aaaaatattg	3000
aacgatttga	aagaaaacaa	tgtaccgcgc	ggcggatgt	acaggaagag	gtttataacta	3060
aactgttaca	ttgcaaacgt	ggtttcgtgt	gccaaagtgtg	aaaaccgatg	tttaatacaag	3120
gctctgacgc	atttctacaa	ccacgactcc	aagtgtgtgg	gtgaagtcat	gcatctttta	3180
atcaaatccc	aagatgtgta	taaaccacca	aactgccaaa	aaatgaaaac	tgtcgacaag	3240
ctctgtccgt	ttgctggcaa	ctgcaagggt	ctcaatccta	tttgaatta	ttgataata	3300
aaacaattat	aaatgctaaa	tttgtttttt	attaacgata	caaaccaaac	gcaacaagaa	3360
catttgtagt	attatctata	attgaaaacg	cgtagttata	atcgtgagg	taatatttaa	3420
aatcattttc	aaatgattca	cagtttaattt	gcgacaatat	aattttattt	tcacataaac	3480
tagacgcctt	gtcgtcttct	tcttcgtatt	ccttctcttt	ttcatttttc	tcctcataaa	3540
aattaacata	gttatatocg	tatccatata	tgtatctatc	gtatagagta	aattttttgt	3600
tgtcataaa	atatatgctc	tttttaatgg	ggtgtatagt	accgctgcgc	atagtttttc	3660
tgtaatttac	aacagtgcta	ttttctggta	gttcttcgga	gtgtgttgc	ttaattatta	3720
aatttatata	atcaatgaat	ttgggatcgt	cggttttgta	caatatggtg	ccggcatagt	3780
acgcagcttc	ttctagttca	attacaccat	tttttagcag	caaccgatta	acataacttt	3840
ccaaaatggt	gtacgaaccg	ttaaaacaaa	acagttcacc	tcccttttct	atactattgt	3900
ctgcgagcag	ttgtttgttg	ttaaaaataa	cagccattgt	aatgagacgc	acaactaat	3960
atcacaaact	ggaaatgtct	atcaatata	agttgctgat	atcatggaga	taattaaaat	4020
gataaccatc	tcgcaataaa	ataagtattt	tactgttttc	gtaacagttt	tgtataaaaa	4080
aaacctataa	atattccgga	ttattcatac	cgteccacca	tcgggcccgg	atcagatctg	4140
cagcggccgc	gggaattcga	tcgcctatga	cgatccaag	gagggcttac	cgcagaagaa	4200
gacaccgcc	ccgcagccat	cttggccaga	tcctccgcgc	ccgcccctgg	ctcgtccacc	4260
cccgccaccg	ctaccgttgg	agaaggaaaa	atggcatctt	caacaccgcg	ctctcccga	4320
ccttcggata	tactgtcaag	gctaccacag	tcacaacgcc	ctcctggcgc	gtggacatga	4380
tgagatttaa	tattgacgac	tttgttcccc	cgggaggggg	gaccaacaaa	atctctatac	4440
cctttgaata	ctacagaata	agaaaggtta	aggttgaatt	ctggccctgc	tcccccatca	4500
cccaggttga	taggggagtg	ggctccactg	ctgttattct	agatgataac	tttgaacaa	4560
aggccacagc	cctaacctat	gacccatatg	taaactactc	ctcccgccat	acaatcccc	4620
aacctttctc	ctaccactcc	cgttacttca	cacccaaacc	tgttcttgac	tcactattg	4680
attacttcca	accaaataac	aaaaggaatc	agctttggct	gaggctacaa	acctctagaa	4740
atgtggacca	cgtaggctc	ggcactgcgt	tcgaaaacag	taaatacgac	caggactaca	4800
atatacogtg	aacctatgat	gtacaattca	gagaatttaa	tcttaaagac	ccccacttg	4860
aaccttaaga	attctatcac	tagtgaattc	gcggccgcgc	gccgctccag	aattctagaa	4920
ggtaccggg	atcctttcct	gggacccggc	aagaaccaa	aactcactct	cttcaaggaa	4980
atccgtaatg	ttaaaccoga	cacgatgaag	cttgcgttgg	gatggaaaag	aaaagagttc	5040
tacagggaaa	cttggaccgc	cttcatggaa	gacagcttcc	ccattgttaa	cgaccaagaa	5100
gtgatggatg	ttttccttgt	tgtcaacatg	cgteccacta	gaccaaccgc	ttgttacaaa	5160
ttcctggccc	aacacgctct	gcggtgcgac	cccgactatg	tacctatga	cgtgattag	5220
atcgtcgagc	cttcatgggt	gggcagcaac	aacgagtacc	gcatcagcct	ggctaagaag	5280

ES 2 726 777 T3

ggcggggget gcccaataat gaaccttcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagttc 5340
 atcgatcgtg tcatctggga gaacttctac aagcccacog tttacatcgg taccgactct 5400
 gctgaagagg aggaaattct ccttgaagtt tccctgggtg tcaaagtaaa ggagtttgca 5460
 ccagacgcac ctctgttcac tggcgcggcg tattaaaaca cgatacattg ttattagtag 5520
 atttattaag cgctagattc tgtgcggtgt tgatttacag acaattgttg tacgtatfff 5580
 aataattcat taaatttata atctttaggg tggtatgtta gagogaaaaat caaatgattt 5640
 tcagcgtcct tatarctgaa tttaaatatt aaatcctcaa tagatfttga aaataggttt 5700
 cgattagttt caaacaaggg ttgfttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt 5760
 tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc 5820
 gtttgtggtt tgttttgtaa taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgtttttgta 5880
 tttctttcat cactgtcgtt agtgtacaat tgactcagcg taacacgctt aaataaagct 5940
 tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattaggcc gattatcgtc gtcgtcccaa 6000
 ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gatftttgcca tagccacacg acgctatta 6060
 attgtgtcgg ctaaacagtc cgcgatcaaa tttgtagttg agctftttgg aattatttct 6120
 gattgcggggc gtttttgggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattftaa ttcagacaac 6180
 acgttagaaa gcgatgggtc aggcggtggg aacatttcag acggcaaatc tactaatggc 6240
 ggcggtggg gagctgatga taaactacc atcgggtggg gcgcagggcg ggctggcggc 6300
 ggagggcgat gtcgtgggtg tggcaggtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct 6360
 ttaggcaaca cagtcggcac ctcaactatt gtactggttt cgggcgcccgt ttttggtttg 6420
 accggtctga gacgagtgcg atftttttcgt tttctaatag ctccaacaa tttgtgtctg 6480
 tcgctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca 6540
 gacatcgatg aattttggtg tgggtgaggc gctggaatgt taggcacggg agaaggtggt 6600
 ggcggcgggt ccgcccgtat aattttgtct ggtttagttt gttcgcgcac gattgtgggc 6660
 accggcgcag gcgcccgtgg ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcttcgagg cagcgtttgg 6720
 ggtggtggca atftcaatatt ataattggaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt 6780
 gtaatttcgc tctcgtttac cgtcccgata tttaaacaac gctcaatgta agcaattgta 6840
 ttgtaaagag attgtctcaa gctcgcgcga ccgcgataac aagccttttc atttttacta 6900
 cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgcagta catgtatgct ttgtgtcaa 6960
 aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt 7020
 tgtcgtaaat gttgtttttg ataatttgcg cttccgcagt atcgacacgt tcaaaaaatt 7080
 gatcgcgatc aattttggtg ttcctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc 7140
 tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgtgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200
 actgcaaaaa cgtcaaaaact cgggtataaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta 7260
 ttttatcgca caagcccact agcaaatgt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt 7320
 ttaacgctga cgaataaaaa gttcaccagt taatgagcga caaccctaat tttataaaaa 7380
 tctatfttaa tcacggttcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc 7440
 ccgatttatt tgaaacacta caaattaaag gcgagctttc gtaccaactt gttagcaata 7500
 ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg 7560
 acataaaaact cgaaaatgtc aagcacttga tcgcgtgtat gtttgcgatt 7620
 acggtattgt caaacacgaa aactcactta gcgtgcagca cggcacgctg gattattfta 7680
 gtcgggaaaa aattcgacac acaactatgc acgtttcgtt tgactggtac gcggcgtggt 7740
 aacatacaag ttgctaacgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 7800
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 7860
 atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 7920
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 7980
 tgggcgctct tccgcttccct cgtcactga ctgcgtcgcg tcggtcgttc gctgcggcg 8040
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 8100
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa agcccgctt 8160
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 8220
 tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8280
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacggga tactctgccc cttttctccc 8340
 ttccgggaagc gtggcgtttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgtgttaggt 8400
 cgttcgtccc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccagcc gctgcgctt 8460
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8520
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8580
 gtggtggcct aactacgget acaactagaag gacagttatt ggtatctgcg ctctgctgaa 8640
 gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg 8700
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 8760
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt aacgaaaaat cacgttaagg 8820
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atcctftftaa attaaaaatg 8880
 aagftftaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacftgg tctgacagtt accaatgctt 8940

ES 2 726 777 T3

```

aatcagtgag gcaacctatct cagcgatctg tctatcttctg tcatccatag ttgcctgact 9000
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 9060
gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatctatca gcaataaacc agccagccgg 9120
aagggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9180
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttggtgccaat 9240
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttgggatg gcttcattca gctccggttc 9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catggtgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 9360
cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tgggtatggc 9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactygtga 9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 9540
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 9600
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9660
acccactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaaata agggcgacac ggaatggtg 9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat 9840
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcacgaggc ctttctgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 10020
ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag 10080
acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg 10200
cgtaaggaga aaataaccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggetgcgca actgttggga 10260
agggcgatcg gtgcgggctt cttcgtctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 10320
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc 10380
cagtgcc

```

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Circovirus porcino

<400> 9

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

His Leu Gly Gln
20

<210> 10

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 10

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

Thr Leu Ser

15 <210> 11

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

20 <400> 11

ES 2 726 777 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 Lys Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 recombinante del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) o de una cantidad eficaz de la proteína ORF2 recombinante de PCV2 para la preparación de un medicamento para ser administrado a animales de 1 a 22 días de vida
- 5 a) para el tratamiento o la profilaxis de la infección por PCV2 en dichos animales; o
- b) para la reducción de los síntomas clínicos causados por o asociados a una infección por PCV2 en dichos animales;
- en donde dichos animales tienen anticuerpos anti-PCV2 de origen materno el día de la vacunación, y en donde dicho medicamento se administra solo una vez.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los animales tienen en el día de la vacunación un título de anticuerpo anti-PCV-2 de más de 1:100 en un ensayo inmunológico anti-PCV2 específico.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los animales tienen en el día de la vacunación un título de anticuerpo anti-PCV-2 de más de 1:1000 en un ensayo inmunológico anti-PCV2 específico.
- 15 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medicamento se administra en el día 7 de vida o más tarde.
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el medicamento se administra del día 19 al día 22 de vida.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha proteína ORF2 recombinante de PCV2 es una ORF-2 recombinante de PCV2 expresada en baculovirus.
- 20 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el nivel de inclusión del antígeno ORF-2 de PCV2 en dicha composición inmunogénica es de 15 a 400 µg.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el animal es porcino.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde los síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3)
- 25 hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductivos, por ejemplo aborto, mortinatos, momias, etc., (7) lesiones similares a Pia, normalmente conocidas por estar asociadas con infecciones por *Lawsonia intracellularis* (ileítis), (8) linfadenopatía, (9) agotamiento de linfoides y/o (10) histiocitos multinucleados/gigantes, (11) dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS), (12) mortalidad asociada a PCVAD, (13) pérdida de peso asociada a PCVAD, (14) reducción de la variabilidad del crecimiento, (15) reducción
- 30 de la frecuencia crías muy pequeñas y débiles, (16) reducción de coinfecciones con enfermedad compleja reproductiva y respiratoria porcina (PRRSV), (17) inflamación linfoide.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho tratamiento o profilaxis de la infección por PCV2 da como resultado una mejora en comparación con los animales de un grupo control no tratado de la misma especie en un parámetro de eficacia de vacuna seleccionado del grupo que consiste en una reducción
- 35 de la pérdida de peso, una menor duración de la viremia, un final más temprano de la viremia, una menor carga de virus o combinaciones de las mismas.
11. Una cantidad eficaz de la proteína ORF2 recombinante del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) o de una composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 recombinante del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) para usar en un método para
- 40 a) el tratamiento o profilaxis de la infección por PCV2; o
- b) reducción de los síntomas clínicos causados por o asociados a una infección de PCV2;
- en donde dicha cantidad eficaz de proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de dicha composición inmunogénica se debe administrar solo una vez a animales que tengan anticuerpos anti-PCV2 de origen materno y que tengan de 1 a 22 días de vida.
- 45 12. La cantidad eficaz de proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 recombinante de PCV2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde los animales tienen un título de anticuerpos anti-PCV-2 de más de 1:100 en un ensayo inmunológico anti-PCV2 específico.
13. La cantidad eficaz de proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en donde los animales
- 50 tienen un título de anticuerpos anti-PCV-2 de más de 1:1000 en un ensayo inmunológico anti-PCV2 específico.

14. La cantidad eficaz de proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la proteína ORF2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 recombinante de PCV2 se administra en el día 7 de vida o más tarde.
- 5 15. La cantidad eficaz de la proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 recombinante de PCV2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde la proteína ORF2 recombinante de PCV2 o la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 recombinante de PCV2 se administra del día 19 al día 22 de vida.
- 10 16. La cantidad eficaz de la proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende la proteína ORF2 recombinante de PCV2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde dicha proteína ORF2 recombinante de PCV2 es una ORF-2 recombinante expresada en baculovirus de PCV2.
- 15 17. La cantidad eficaz de proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en donde el nivel de inclusión del antígeno PCV2 ORF-2 en dicha composición inmunogénica es de 15 a 400 µg.
18. La cantidad eficaz de proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en donde el animal es porcino.
- 20 19. La cantidad eficaz de proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en donde los síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez cutánea o ictericia, (3) hígados atróficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductivos, por ejemplo aborto, mortinatos, momias, etc., (7) lesiones similares a Pia, normalmente conocidas por estar asociadas con infecciones por *Lawsonia intracellularis* (ileítis), (8) linfadenopatía, (9) agotamiento de linfoides y/o (10) histiocitos multinucleados/gigantes, (11) síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), (12) mortalidad asociada a PCVAD, (13) pérdida de peso asociada a PCVAD, (14) reducción de la variabilidad del crecimiento, (15) reducción de la frecuencia de crías muy pequeñas y débiles, (16) reducción de coinfecciones con enfermedad compleja reproductiva y respiratoria porcina (PRRSV), (17) inflamación linfoide.
- 25 20. La cantidad eficaz de proteína ORF2 recombinante de PCV2 o de la composición inmunogénica que comprende proteína ORF2 recombinante de PCV2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en donde dicho tratamiento o profilaxis de la infección por PCV2 da como resultado una mejora en comparación con animales del grupo de control no tratado de la misma especie en un parámetro de eficacia de la vacuna seleccionado del grupo que consiste en una reducción en la pérdida de peso, una menor duración de la viremia, un final más temprano de la viremia, una menor carga de virus o combinaciones de las mismas.

35

Figura 1:

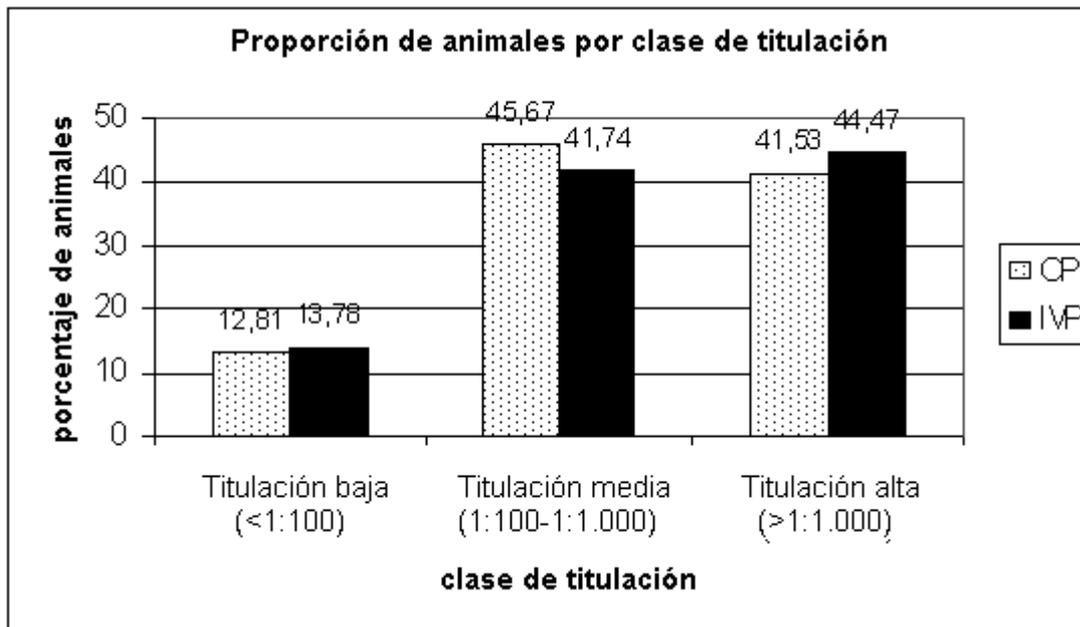


Figura 2:

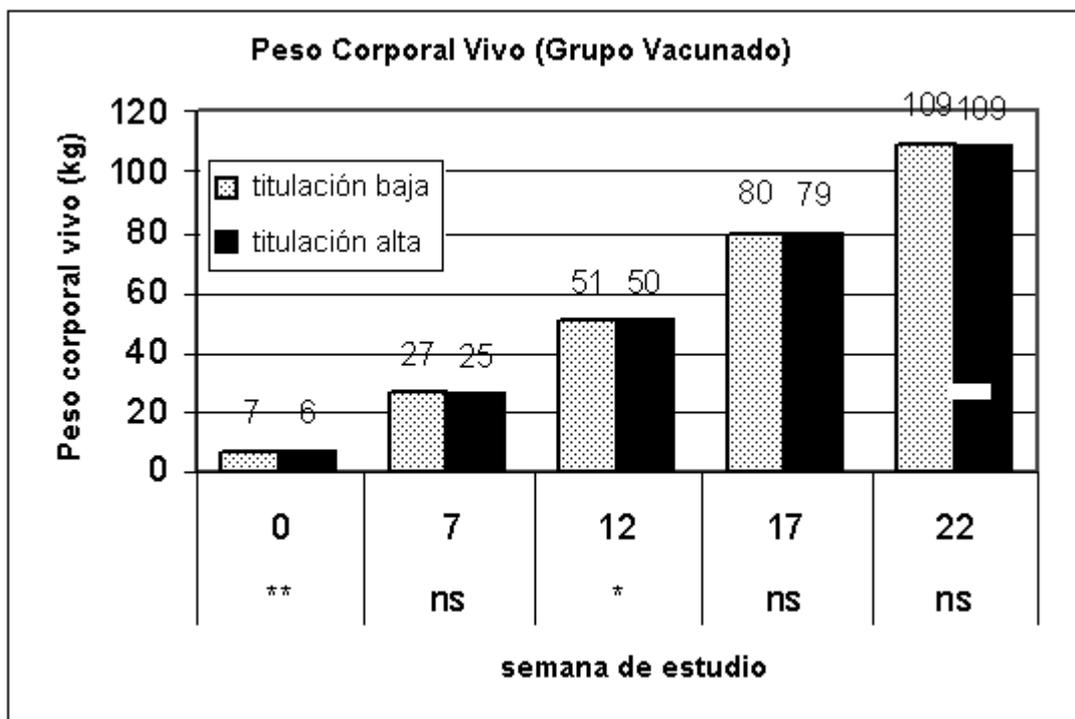


Figura 3:

