



No. 10-025161- -00008-0000

Fecha: 2013-09-12 16:48:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 39

Señor Director
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 10.025.161
Asunto : Solicitud de patente para: **COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA DE PCV-2 ORF-2 Y PORTADORES VETERINARIOS ACEPTABLES**
Solicitante : **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC**
Fecha de solicitud : 3 de marzo de 2010

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. 8295 notificado por fijación en lista el 7 de mayo de 2013.

2. Mediante memorial del 30 de julio de 2013 se solicitó oportunamente plazo para responder la acción oficial.

3. Mediante oficio No. 8295 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio se refieren a la claridad del pliego reivindicatorio, a la claridad del capítulo descriptivo y a la novedad de la reivindicación 1 en vista del documento D2: WO 2007/094893.

4. **Respuesta a las objeciones**

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desea presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 y 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

4.1 Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 1 reivindicación, junto con un nuevo capítulo descriptivo.

Se han introducido las siguientes modificaciones al capítulo reivindicatorio:

- Se modificó la reivindicación 1

La reivindicación 1 se modificó para especificar las secuencias de la proteína PCV-2 ORF-2, lo cual está soportado en la descripción en la página 15, líneas 38 a 39. De esta manera se limitó la invención y respetuosamente se solicita aceptar este nuevo pliego reivindicatorio y otorgar la patente solicitada.

4.2 Descripción

Se definió la marca Ingelvac® CircoFLEX™ en la descripción en la página 23, línea 19. Por otro lado, no estamos de acuerdo con la objeción del Examinador ya que consideramos que la composición inmunogénica que se reclama en la reivindicación 1 sí está completamente descrita en la descripción como se observa desde la página 13 hasta la 23.

Así, se considera que la descripción de la presente solicitud cumple con los requerimientos establecidos en el Artículo 28 de la Decisión 486 y que la objeción formulada por el Examinador se ve superada.

4.3 Argumentos con respecto a la falta de Novedad

De acuerdo al artículo 16 de la Dec. 486, se determina:

Artículo 16: Una invención se considerará nueva cuando no esté comprendida en el estado de la técnica.

“El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de la prioridad reconocida.”

La novedad de una invención se evalúa a través de la comparación uno a uno de sus características esenciales. De este modo, una invención puede ser objetada por novedad cuando sus características esenciales son exactamente iguales a las de un antecedente que represente el estado de la técnica conocido al momento de presentar la solicitud. Por lo tanto en caso que llegue a existir al menos una diferencia en dicha comparación, se afirma que la invención SI cumple con el requisito de novedad.

Con base en lo anterior, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo por el Examinador y con las conclusiones del mismo y solicitamos atentamente la reconsideración de las razones por las cuales se objeta la novedad, ya que es claro que dicha anterioridad no afecta la novedad del nuevo capítulo reivindicatorio. Se debe tener en cuenta que el objeto de la presente invención es una composición efectiva para la protección inmunitaria en cerdos contra infecciones concomitantes con uno o más patógenos que no sea PCV2, mientras que el objeto de la solicitud relacionado en el documento D1 solo refiere a la composición para las infecciones con PCV2.

4.4 Conclusiones

A partir de la modificación del pliego reivindicatorio, se superaron las objeciones de claridad y de novedad y con lo anterior, se ven satisfechos todos los requisitos

imprescindibles para que el presente Despacho otorgue el derecho de patente a la invención de la presente solicitud.

5. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador, se solicita atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente. En este sentido, respetuosamente recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. 8295, toda vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad.

6. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 1 reivindicación
- Nuevo capítulo descriptivo

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COMPOSICIÓN INMUNOGENICA DE PCV-2 ORF-2 Y PORTADORES VETERINARIOS
ACEPTABLES

5 LISTADO DE SECUENCIAS

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

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención:

La presente invención se refiere al campo de la medicina veterinaria, en particular al campo de las enfermedades infecciosas. Además, la presente invención se refiere a un método para reducir infecciones concomitantes en cerdos causadas por patógenos que no son PCV-2.

Antecedentes

En 1996 se describió una nueva enfermedad emergente denominada "Síndrome Multisistémico de Emaciación Posdestete" (PMWS, del inglés "Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome") en referencia a varios casos observados en Canadá cinco años antes (Clark T. Pathology of the Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome of Pigs. 1996 p. 22-5). Se identificó el circovirus tipo 2 (PCV2) como un agente causante esencial de dicho síndrome. Desde entonces el PMWS ha sido observado en virtualmente todas las regiones del mundo que producen cerdos (Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. J Virol Methods 2004 15 diciembre; 122 (2): 171-8). Los cerdos de 5 a 15 semanas de edad son los afectados más habitualmente (Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: Diagnosis, Disease and Control: What do we know? 2006 16 Julio-2006 19 Julio; 2006; Allan GM, y col., Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 165-8; Chae C. Vet J 2004 Julio; 168 (1): 41-9). Los síntomas clínicos incluyen un marcado aumento de la tasa de mortalidad, de emaciación, un crecimiento generalizado de linfonodos, síntomas respiratorios y, ocasionalmente, palidez, ictericia y diarrea (Chae C. Vet J 2005 Mayo; 169 (3): 326-36; Segales J. y col. Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 151-8). Estos síntomas clínicos no son observados todos al mismo tiempo en una misma piara de cerdos afectada por PMWS, pero parece que la expresión de síntomas clínicos está relacionada indirectamente a co-patógenos específicos de granja que atacan preferencialmente a diferentes sistemas de órganos (Krakowka S. y col., Vet Pathol 2001 Enero; 38 (1): 31-42). Investigaciones epidemiológicas han demostrado que el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV, del inglés "Porcine Reproductive and Respiratory Síndrome Virus"), el virus de gripe porcina (SIV, del inglés "Swine Influenza

Virus"), el parvovirus porcino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Streptococcus suis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Chae C. Vet J 2004 Julio; 168 (1): 41-9) son observados muy habitualmente en combinación con el síndrome de la enfermedad.

5

Para la producción de PMWS se ha postulado la activación del sistema inmune como un evento fundamental (Krakowka S. y col., Vet Pathol 2001 Enero; 38 (1): 31-42). Aunque la inoculación experimental sólo con PCV2 únicamente produjo infecciones clínicamente asintomáticas y una evidencia histológica muy modesta de inflamación, la infección dual con PCV2 y PPV o PRRSV dio como resultado síntomas clínicos más severos, lesiones flagrantes e histológicas, una carga viral mayor de PCV2 y más dispersa en los tejidos afectados. Estos descubrimientos parecen estar provocados predominantemente por PCV2 ya que la infección con PRRSV o PPV por sí solos no produjo síntomas o lesiones clínicas comparables (Allan y col., J Comp Pathol 1999 Julio; 121 (1): 1-11; Allan GM, y col., Arch Virol 2000; 145 (11): 2421-9; Harms PA, y col., Vet Pathol 2001 Septiembre; 38 (5): 528-39; Krakowka S, y col., Vet Pathol 2000 Mayo; 37 (3): 254-63; Ostanello F, y col., Vet Microbiol 2005 1 Julio; 108 (3-4): 179-86; Rovira A, y col., J Virol 2002 Abril; 76 (7): 3232-9). Adicionalmente, también podría lograrse un aumento similar de la severidad de la enfermedad en ausencia de otros agentes co-infectantes si los cerdos fueran inmunoestimulados con hemocianina de lapa californiana en adyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA) (Krakowka S. y col., Vet Pathol 2001 Enero; 38 (1): 31-42).

10
15
20

Los efectos de PCV2 en el sistema inmune del cerdo no se conocen completamente. Se ha publicado que las principales células diana de la replicación de PCV2 es el linaje de monocitos/macrófagos, así como otras células que presentan antígenos tales como las células dendríticas foliculares (Darwich L, y col., Arch Virol 2004 Mayo; 149 (5): 857-74). Diversos estudios sugirieron que el PCV2 infecta células que se dividen, macrófagos y linfocitos B, induciendo la apoptosis de las células B, lo que produce daño en los tejidos linfoides y da como resultado un agotamiento extensivo de linfocitos (Darwich L, y col., Arch Virol 2004 Mayo; 149 (5): 857-74). En particular, los cerdos afectados de PMWS muestran infiltración histiocítica y agotamiento de linfocitos en centros de folículo y en zonas parafooliculares, síntomas asociados a la presencia de PCV2 (Segales J. y col. Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 151-8; Darwich L, y col., Arch Virol 2004 Mayo; 149 (5): 857-74). Estos hechos han llevado a algunos a sugerir que la infección de PCV2 podría causar inmunosupresión (Darwich L, y col., Arch Virol 2004 Mayo; 149 (5): 857-74; Krakowka S, y col., Viral Immunol 2002; 15 (4): 567-82).

25
30
35

Los métodos para tratar las infecciones de PCV2, en particular de PMWS, basados en una vacuna de ADN se describen en la Patente de EEUU N° 6.703.023. En el documento

WO 03/049703 se describe la producción de una vacuna quimérica viva, que comprende un esqueleto de PCV1 en el que un gen inmunogénico de una cepa patógena de PCV2 sustituye a un gen del esqueleto del PCV1. El documento WO99/18214 ha proporcionado varias cepas de PCV2 y procedimientos para la preparación de una vacuna muerta de PVC2. En el documento WO06/072065 se ha mostrado una vacuna de subunidades eficaz basada en la ORF-2. Cualquiera de dichas vacunas tiene el objetivo de ser usadas en la vacunación/tratamiento de cerdos contra PMWS.

No existen publicaciones acerca del impacto potencial de las infecciones del PCV2 sobre la incidencia de infecciones concomitantes provocadas por varios patógenos de cerdo relevantes. Particularmente, no hay nada publicado acerca del impacto potencial del PCV2 sobre patógenos específicos, tales como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida*, *PRRSV*, *Salmonella* spp., *SIV* o *Streptococcus suis*. Además, aunque se conozcan durante un breve tiempo diferentes vacunas de PCV2, su impacto en infecciones concomitantes diferentes a la de PCV2 en cerdos todavía se desconoce.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Perfil de viremia de PCV2. Se tomaron muestras de sangre de animales preseleccionados tratados con placebo (Figura 1A; n=110) y de animales vacunados (Figura 1B; n=110) a los tiempos indicados. En base a los resultados de PCR cuantitativos los animales se agruparon en clases de animales con cargas víricas subclínicas ($10^4 - 10^6$ gE/mL) y con cargas víricas clínicas relevantes ($> 10^6$ gE/mL). Las barras blancas representan la proporción de animales con cargas víricas subclínicas y las barras negras ilustran la proporción de animales con cargas víricas clínicas relevantes por día de muestreo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención está basada en el descubrimiento sorprendente de que la vacuna de PCV2 no solo no puede reducir el porcentaje de infecciones de PCV2 en cerdos o en piaras de cerdos, sino que tampoco puede reducir el porcentaje de infecciones concomitantes causadas por patógenos diferentes a circovirus, en particular diferentes a PCV2.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir las infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos diferentes al PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2.

El término "infecciones concomitantes" tal como se usa en la presente memoria significa, aunque no se limita a ello, cualquier infección de cerdos provocada por patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o gusanos que no sean circovirus, en particular que no sean PCV2.

- 5 El término "patógeno concomitante" tal como se usa en la presente memoria significa, aunque sin limitarse a ello, un patógeno de cerdo que no es circovirus, en particular que no es PCV2. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o de
- 10 gusanos, diferentes a circovirus, en particular diferentes al PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2. Preferiblemente, las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos bacterianos, víricos o fúngicos, o por combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, las
- 15 infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos bacterianos o víricos, o por una combinación de los mismos.

- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el término "infecciones concomitantes" también significa que el cerdo infectado con uno o más patógenos
- 20 concomitantes diferentes de circovirus, en particular diferentes de PCV2, está infectado también con PCV2. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos coinfectados con PCV2, en donde las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos diferentes a circovirus, en particular
- 25 diferentes a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2. Preferiblemente, las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o de gusanos que no sean circovirus, en particular que no sean PCV2.

- 30 El término "coinfectado con PCV2" tal como se usa en la presente memoria significa, aunque sin limitación, cualquier forma de coinfección con PCV2, lo que significa que la infección de PCV2 se produce antes, simultáneamente o después de la infección de los patógenos que son diferentes a circovirus, en particular diferentes a PCV2. También
- 35 incluye cursos subclínicos, clínicos aparentes, fulminantes y crónicos de infecciones de PCV2. En este contexto, los cursos aparentes no se limitan a PMWS, sino que también incluyen cualquier otras apariciones clínicas de infecciones de PCV2 tales como el complejo de enfermedad respiratoria porcina (PRDC, del inglés "Porcine Respiratory Disease Complex"), el síndrome de dermatopatía y nefropatía porcina (PDNS, del inglés

"Porcine Dermatopathy and Nephropathy Syndrome"), el fallo reproductivo, la enteritis granulomatosa, potencialmente, temblores congénitos (CT-All) y miocarditis perinatal (Chae, Veterinary J., 2005; 169: 326-336).

5 Sin embargo, el término "infección concomitante" no significa necesariamente que el cerdo o la piara de cerdos estén coinfectados con PCV2. El término "infección concomitante" también se refiere, aunque sin limitación, a casos en los que los cerdos o las piaras de cerdos son expuestos a PCV2, o en los que existe riesgo de ser infectados con PCV2. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un
10 método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos expuestos a PCV2, o en peligro o susceptibles de ser infectados con PCV2, en donde las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos diferentes a circovirus, en particular diferentes a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una
15 composición inmunogénica que comprende PCV2. Preferiblemente, las infecciones concomitantes están provocadas por uno o más patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o de gusanos que no sean circovirus, en particular que no sean PCV2.

La expresión "el porcentaje de infecciones concomitantes se reduce" significa que el
20 número de cerdos infectados con un patógeno que no es circovirus se reduce para dicho patógeno en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%,
25 en comparación con un grupo de control no vacunado. En este contexto, la expresión "grupo de control no vacunado" significa un grupo de cerdos al que no se ha administrado una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para reducir el porcentaje de infecciones
30 concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por un patógeno diferente a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde el número de cerdos infectados con dicho patógeno diferente a circovirus, se reduce para dicho patógeno en más de un 10%, preferiblemente en más de
35 un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. Preferiblemente, la infección concomitante está provocada por un patógeno vírico,

bacteriano o fúngico diferente a circovirus, en particular diferente a PCV2. Más preferiblemente, dichos cerdos o piara de cerdos están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2.

5

Las infecciones concomitantes provocadas por un patógeno vírico, bacteriano o fúngico diferente de circovirus, en particular diferente de PCV2, pueden provocar en los animales infectados síntomas entéricos, respiratorios, reproductivos, del sistema nervioso central o del sistema locomotor. La incidencia de cualquiera de dichos síntomas clínicos, provocados por los respectivos patógenos, puede reducirse. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos entéricos, respiratorios, reproductivos, del sistema nervioso central o del sistema locomotor, diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con un patógeno entérico, respiratorio, reproductivo, del sistema nervioso central o del sistema locomotor diferente de circovirus, se reduce para dicho patógeno entérico, respiratorio, reproductivo, del sistema nervioso central o del sistema locomotor en más del 10%, preferiblemente en más del 20%, más preferiblemente en más del 30%, incluso más preferiblemente en más del 40%, incluso más preferiblemente en más del 50%, incluso más preferiblemente en más del 60%, incluso más preferiblemente en más del 80% e incluso más preferiblemente el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

20

25

Por ejemplo, los patógenos entéricos son *Lawsonia intracellularis*, *E. coli*, *Streptococcus suis*, *Clostridium* spp, *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp., rotavirus o coronavirus. Los patógenos respiratorios son por ejemplo PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*. Los patógenos reproductivos por ejemplo son *Leptospira* spp., PRRSV, *Chlamydia* spp. Los patógenos del sistema locomotor son por ejemplo *S. suis*, *M. hyorhinis*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*. Los patógenos del sistema nervioso central son por ejemplo el virus de la Pseudorabia, *S. suis*., *Haemophilus* sp.

30

35

En general, la expresión "patógeno diferente de PCV2" significa, aunque sin limitación, uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP); virus de la fiebre porcina africana; *Aspergillus* spp.; *Astrovirus*; *Ascaris suum*; *Blastocystis* spp.; *Bordetella*

bronchiseptica; *Brachyspira* spp., *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*; *Brucella suis*, *Brucella suis* biovars 1, 2 y 3; *Candida* spp.; virus de la fiebre porcina clásica; *Clostridium* spp., en particular *C. difficile*, *C. perfringens* tipos A, B y C, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. tetani*; *Chlamydia* spp., *Cryptosporidium* spp.; virus de encefalomiocarditis;

5 *Eperythrozoonosis suis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Fusarium* spp.; *Haemophilus parasuis*; virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante; virus de Hepatitis E; virus de la encefalitis japonesa; *Hyostrongylus rubidus*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., *L. australis*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. interrogans*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. sejroe*, *L. bratislava*;

10 *Mannheimia haemolytica*; virus Menangle; *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp., *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; virus Nipah; *Oesophagostom* spp., *Oesophagostom dentatum*, *Oesophagostom quadrospinulatum*; *Pasteurella* spp., *P. multocida*; *Penicillium* spp.; adenovirus porcino; citomegalovirus porcino; calicivirus entéricos porcinos; picornavirus entéricos porcinos;

15 parvovirus porcino; coronavirus respiratorio porcino; virus PRRS; virus de pseudorrabia; Reovirus; Rotavirus; Rubulavirus; *Salmonella* spp., *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*; *Sarcoptes* spp.; *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp., *S. suis*, *S. porcinus*, *S. dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; *Strongyloides ransomi*; virus de herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus de la varicela porcina; virus de gastroenteritis

20 transmisible; *Trichuris* spp. *Taenia* spp., *Trichinella spiralis*; virus de la estomatitis vesicular; virus de exantema vesicular de cerdos; virus del Nilo Occidental; o *Yersinia* spp., *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para

25 reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos diferentes a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde los patógenos que provocan las infecciones concomitantes se seleccionan del grupo que consiste en:

30 *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP); virus de la fiebre porcina africana; *Aspergillus* spp.; *Astrovirus*; *Ascaris suum*; *Blastocystis* spp.; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*; *Brucella suis*, *Brucella suis* biovars 1, 2 y 3; *Candida* spp.; virus de la fiebre porcina clásica; *Clostridium* spp., en particular *C. difficile*, *C. perfringens* tipos A, B y C, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. tetani*; *Chlamydia* spp., *Cryptosporidium* spp.; virus de

35 encefalomiocarditis; *Eperythrozoonosis suis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Fusarium* spp.; *Haemophilus parasuis*; virus de la encefalomiелitis hemoaglutinante; virus de Hepatitis E; virus de la encefalitis japonesa; *Hyostrongylus rubidus*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., *L. australis*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L.*

icterohaemorrhagicae, *L. interrogans*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. sejroe*, *L. bratislava*; *Mannheimia haemolytica*; virus Menangle; *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp., *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; virus Nipah; *Oesophagostom* spp., *Oesophagostom dentatum*, *Oesophagostom quadrosinulatum*; *Pasteurella* spp., *P. multocida*; *Penicillium* spp.; adenovirus porcino; citomegalovirus porcino; calicivirus entéricos porcinos; picornavirus entéricos porcinos; parvovirus porcino; coronavirus respiratorio porcino; virus PRRS; virus de pseudorabia; Reovirus; Rotavirus; Rubulavirus; *Salmonella* spp., *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*; *Sarcoptes* spp.; *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp., *S. suis*, *S. porcinus*, *S. dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; *Strongyloides ransomi*; virus herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus varicela porcina; virus de gastroenteritis transmisible; *Trichuris* spp. *Taenia* spp., *Trichinella spiralis*; virus de la estomatitis vesicular; virus de exantema vesicular de cerdos; virus del Nilo Occidental; o *Yersinia* spp., *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*.

Preferiblemente dichas infecciones concomitantes están causadas por uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Mycoplasma hyrhinis*; *Pasteurella multocida*; PRRS; *Salmonella* spp. y *Streptococcus suis*. Más preferiblemente dichas infecciones concomitantes están causadas por uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Mycoplasma hyrhinis*; *Pasteurella multocida*; PRRS; *Salmonella* spp. y *Streptococcus suis*. Más preferiblemente dichas infecciones concomitantes están causadas por uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Mycoplasma hyrhinis*, y PRRS. Más preferiblemente por *Mycoplasma hyrhinis* y/o PRRS.

Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con uno o más de dichos patógenos anteriores, que no son circovirus, se reduce para dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. En caso de infecciones múltiples, las tasas de reducción descritas se refieren a cada patógeno específico. Por ejemplo, una reducción de más del 10% de infecciones concomitantes en un cerdo infectado múltiplemente significa que la tasa de infección con respecto a un patógeno específico se reduce en más de un 10%. No significa necesariamente que la tasa de infección con respecto a todos los patógenos se reduzca en más del 10% en comparación con un grupo

de control no vacunado, o con respecto a una piara de cerdos que menos del 10% de los cerdos de dicha piara están infectados con todos los patógenos.

El término "antígeno de PCV2", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos que provoca una respuesta inmunológica contra PCV2 en un hospedante. Un antígeno, tal como se usa en la presente memoria, incluye la secuencia de longitud completa de cualquier proteína del PCV2, sus análogos o sus fragmentos inmunogénicos.

La expresión "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y, así, provoca la respuesta inmunológica en un huésped. Dichos fragmentos pueden identificarse utilizando cualquier técnica de representación en mapas de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales se pueden determinar, por ejemplo, sintetizando concurrentemente una gran cantidad de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos, a la vez que los péptidos siguen estando fijados a los soportes. Dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 4.708.871; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3998-4002; Geysen *et al.* (1986) *Molec. Immunol.* 23: 709-715. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, *supra*.

Dentro de la definición de antígenos sintéticos también se incluyen, por ejemplo, los poliepítopos, epítopos flanqueantes y otros antígenos recombinantes u obtenidos de forma sintética. Véase, 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) 12ª Conferencia Mundial del SIDA, Ginebra, Suiza, 28 de junio-3 de julio de 1998.

Una "respuesta inmunológica" significa, pero no se limita al desarrollo en un huésped de una respuesta inmunológica celular y/o mediada por anticuerpos a un antígeno, composición inmunológica o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmune" incluye pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped exhibirá bien una

respuesta inmunológica terapéutica o bien protectora (memoria), de modo que la resistencia a una nueva infección resultará reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad quedará reducida. Esta protección se verá demostrada bien por una reducción en el número o en la gravedad de los síntomas, o bien por la ausencia de uno o más de los síntomas asociados con las infecciones por PCV2; por un retraso en la aparición de viremia, por una persistencia vírica reducida, por una reducción en la carga vírica global y/o por una reducción en la excreción vírica.

La expresión "composición inmunogénica" o el término "vacuna" (ambos términos se utilizan como sinónimos), tal como se utilizan en la presente, se refieren a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno del PCV2, pudiéndose utilizar dicha composición para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado con una infección por PCV2 en un sujeto. Una composición inmunogénica preferida puede inducir, estimular o reforzar la respuesta inmune frente al PCV2. Por lo tanto, la expresión abarca tanto composiciones inmunogénicas de subunidades, tales como las que se describen a continuación, así como composiciones que contienen PCV2 completo matado o atenuado y/o desactivado.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en el que la composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2 es una composición inmunogénica de subunidades, una composición que contiene PCV2 enteros muertos, o atenuados y/o desactivados. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

La expresión "composición inmunogénica de subunidades", tal 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, derivados u homólogos de un antígeno procedente del 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 del PCV2 al menos parcialmente purificados o fraccionados (preferiblemente esencialmente purificados), o análogos recombinantes de los mismos. Una composición inmunogénica de subunidades puede comprender las subunidades del antígeno o antígenos de interés esencialmente exentas de otros antígenos o polipéptidos procedentes del PCV2, o en forma fraccionada. Una composición inmunogénica de subunidades preferida comprende la proteína ORF-2 del PCV2, como se describe a continuación. Las composiciones más preferidas son las composiciones inmunogénicas de subunidades que comprenden cualquiera de los antígenos del PCV2 proporcionados en el documento WO06/072065, que se incorporan todos en la presente memoria como referencia en su totalidad.

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

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por patógenos diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde el antígeno de PCV2 es una proteína ORF-2 de antígeno de PCV2 que tiene al menos un 70%, preferiblemente un

80%, incluso más preferiblemente un 90% de inmunidad protectora, en comparación con la proteína ORF-2 del PCV2, codificada por la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 3 ó de la SEQ ID NO: 4, tal como se proporciona en el documento WO06/072065. Preferiblemente, dicha ORF-2 del PCV2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 5 del documento WO06/072065. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus se reduce en más de un 40%, preferiblemente en más de un 50%, más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

En algunas formas, las porciones inmunogénicas de la proteína ORF-2 del PCV2 se usan como el componente antigénico en la composición inmunogénica, que comprende el antígeno del PCV2. La expresión "porción inmunogénica", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a formas truncadas y/o sustituidas, o a fragmentos de la proteína y/o del polinucleótido ORF-2 del 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 del documento 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 del PCV2 preferido adicionalmente es cualquiera codificado por las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que esta secuencia podría variar tanto como 6-20% en homología de secuencia y aún conservar las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. En algunas formas, se utiliza una forma truncada o sustituida o un fragmento de este polipéptido ORF-2 del PVC2 como el componente antigénico en la composición. Preferiblemente, dichas formas truncadas o sustituidas o fragmentos comprenderán al menos 18 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos de longitud completa del ORF-2 del PCV2, por ejemplo de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, las formas truncadas o sustituidas, o los fragmentos, tendrán al menos 30, más preferiblemente al menos 45, y aún más preferiblemente al menos 57 nucleótidos

contiguos de la secuencia de nucleótidos del ORF-2 del PCV2 de longitud completa, por ejemplo, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

“Identidad de secuencia”, tal como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, es decir una secuencia de referencia y una secuencia dada que debe ser comparada con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de haber alineado de forma óptima las secuencias para producir el grado más alto de similitud de secuencia, según se determina por el apareamiento entre las hebras de dichas secuencias. Tras el alineamiento, la identidad de secuencia se constata sobre una base de posición-a-posición, por ejemplo, las secuencias son “idénticas” en una posición particular si en esa posición los restos de nucleótidos o 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 se limitan a los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., comp., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., comp., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M. y Griffin, H. G., comps., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., comps., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria como referencia. Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia se diseñan para obtener el apareamiento mayor entre las secuencias sometidas a ensayo. Los métodos para determinar la identidad de secuencia están codificados en programas informáticos disponibles públicamente que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Ejemplos de este tipo de programas incluyen, pero no se limitan al paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215: 403-410 (1990). El programa BLASTX está públicamente disponible en el 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), cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria como referencia). Estos programas alinean de forma óptima las secuencias utilizando pesos de huecos por defecto con el fin de producir el nivel más alto de la identidad de secuencia entre las secuencias dada y de referencia. Como ilustración, para un nucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, 85%, preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de “identidad de secuencia”

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

"Homología de secuencia", tal 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 de forma óptima 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 95% de homología de secuencia con una secuencia de referencia, 85%, preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de los restos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de referencia debe aparearse o comprender una sustitución conservativa con otro aminoácido o nucleótido, o un cierto número de aminoácidos o nucleótidos hasta 15%, preferiblemente hasta 10%, incluso más preferiblemente hasta 5% del total de restos de aminoácidos o nucleótidos, sin incluir las sustituciones conservativas, en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Preferiblemente, la secuencia homóloga comprende al menos un tramo de 50, incluso más preferiblemente de al menos 100, incluso más preferiblemente de al menos 250 e incluso más preferiblemente de al menos 500 nucleótidos.

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

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

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos que no son PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde dicha proteína ORF-2 del PCV2 es cualquiera de las descritas anteriormente. Preferiblemente, dicha proteína ORF-2 del PCV2 es

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

- ii) cualquier polipéptido que es al menos 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 del documento WO06/072065,
- v) un polipéptido que es codificado por un ADN que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 del documento WO06/072065,
- vi) cualquier polipéptido que es codificado por un polinucleótido que es al menos 80% homólogo con el polinucleótido de v),
- vii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos codificados por el polinucleótido de v) y/o vi),
- viii) la porción inmunogénica de vii), en la que el polinucleótido que codifica dicha porción inmunogénica comprende al menos 30 nucleótidos contiguos incluidos en las secuencias de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 del documento WO06/072065,

Preferiblemente, cualquiera de esas porciones inmunogénicas tiene las características inmunogénicas de la proteína ORF-2 del PCV2 que es codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 del documento WO06/072065.

Preferiblemente, dichos cerdos infectados están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

Según un aspecto adicional, la proteína ORF-2 del PCV2 se proporciona en la composición inmunogénica en un nivel de inclusión de antígeno eficaz para el tratamiento de animales infectados subclínicamente con PCV2. Preferiblemente, el nivel de inclusión de la proteína ORF-2 del 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, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a

aproximadamente 30 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 µg /ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 µg/ml, y lo más preferible de aproximadamente 1,6 µg/ml.

Según otro aspecto, el nivel de inclusión del antígeno ORF-2 del PCV es al menos 0,2 µg/proteína ORF-2 del PCV2, tal como se ha descrito anteriormente, por dosis de la composición antigénica final (µg/dosis), más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 µg/dosis, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 µg/dosis, y lo más preferible aproximadamente 1,6 µg/dosis.

El polipéptido ORF-2 del PCV2 utilizado en la composición inmunogénica según la presente invención se puede obtener de cualquier manera, incluyendo el aislamiento y la purificación del ORF2 del PCV2, síntesis convencional de proteínas y metodología recombinante. Los métodos preferidos para obtener el polipéptido ORF-2 del PCV2 se proporcionan en el documento WO06/072065, cuyas enseñanzas y contenido se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. Brevemente, se infectan células susceptibles con un vector vírico recombinante que contiene secuencias codificadoras del ADN de la ORF-2 del PCV2, el polipéptido ORF-2 del PCV2 es expresado por el virus recombinante, y el polipéptido ORF-2 del PCV2 expresado se recupera del sobrenadante por filtración y se desactiva mediante cualquier método convencional, preferiblemente utilizando etilenimina binaria, que luego se neutraliza para detener el proceso de desactivación.

La composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF-2 del PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente,

y ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante. Además, la composición inmunogénica puede comprender i) cualquiera de las proteínas ORF-2 del PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante y iii) una porción del sobrenadante del cultivo celular.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos que no son PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde dicho antígeno de PCV2 es ORF-2 de PCV2 recombinante, preferiblemente una ORF-2 de PCV2 expresada en baculovirus. Preferiblemente, aquellos ORF-2 del PCV2 recombinante o expresado por baculovirus tienen la secuencia como se ha descrito anteriormente.

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

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

una porción del cultivo celular, iv) un agente desactivante para desactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la desactivación mediada por el agente desactivante, en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño menor que 1 μm . Preferiblemente, si el agente desactivante es la BEI, dicha composición comprende tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a la BEI.

El polipéptido se incorpora en una composición que puede ser administrada a un animal susceptible de una infección por PCV2. En las formas preferidas, la composición puede incluir también componentes adicionales conocidos por los expertos en la técnica (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18ª ed. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes aceptables desde un punto de vista veterinario. Tal como se emplea en esta memoria, "un soporte aceptable desde el 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 demoran la adsorción y similares. En un modo de realización preferido, la composición inmunogénica comprende la proteína ORF-2 del PCV2 según se proporciona en la presente memoria, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, la cual se mezcla 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 el uso para inyección parenteral o infusión, se encuentran disponibles fácilmente disoluciones isotónicas acuosas, tales como, por ejemplo, disolución salina o correspondientes disoluciones de proteínas en plasma. Además, las composiciones de vacuna e inmunogénicas de la presente invención pueden incluir diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes. Los diluyentes pueden incluir agua, disolución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetracético, entre otros.

"Adyuvantes", tal 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 y emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede tener una base, en particular, de aceite de parafina líquido

ligero (tipo de la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide, tal como aceite de escualano o de escualeno, que resulta de la teoligomerización de alquénos, 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 opcionalmente etoxilados, y copolímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, especialmente L121. Véase Hunter *et al.*, *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). 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 y Adjuvant Approach" editada por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 del mismo libro.

Un ejemplo adicional de un 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 reticulados, especialmente con polialquenoil-éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el término de carbómero (*Pharmeuropa*, vol. 8, nº 2, junio 1996). Los expertos en la técnica también pueden referirse a la patente de EE.UU. nº 2.909.462 que describe polímeros acrílicos de este tipo reticulados con un compuesto polihidroxiado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos sustituidos con 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 también pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos con el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alilsacarosa o con alilpentaeritritol. Entre ellos se pueden mencionar el Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferido, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

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

Preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis. Lo más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. Tal como se utiliza en la presente memoria, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye uno y cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, agentes estabilizadores, 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 la que dichas células estaban infectadas con un vector viral recombinante que contiene ADN de ORF-2 de PCV2 y que expresan proteína ORF-2 de PCV2, y en el que dicho cultivo celular se trató con aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM de BEI, preferiblemente con aproximadamente 5 mM de BEI, para desactivar 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.

De acuerdo con otra realización adicional, la presente invención también se refiere al uso de antígeno de PCV2 para la preparación de una composición inmunogénica para la reducción de infecciones concomitantes provocadas por uno o más patógenos que no son PCV-2 en cerdos o en una piara de cerdos, en donde dicha composición inmunogénica comprende i) cualquiera de las proteína ORF-2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 de PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) un agente desactivante para desactivar el vector vírico recombinante,

preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la desactivación mediada por el agente de desactivación, preferiblemente tiosulfato sódico en cantidades equivalentes al BEI; y vi) un adyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971, en las cantidades descritas anteriormente; en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tiene un tamaño menor que 1 μm . Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PCV2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

Según un aspecto adicional, esta composición inmunogénica comprende, además, una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una sal de fosfato, en concentraciones fisiológicamente aceptables. Preferiblemente, el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a un pH fisiológico, lo que significa entre aproximadamente 6,5 y 7,5.

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

Las composiciones inmunogénicas pueden además incluir uno o más agentes adicionales inmunomoduladores, tales como, por ejemplo, interleuquinas, interferones u otras citoquinas. Las composiciones inmunogénicas pueden también incluir gentamicina y mertiolato. Si bien las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden de aproximadamente 50 μg a aproximadamente 2.000 μg de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 250 $\mu\text{g/mL}$ de dosis de la composición de vacuna. Así, la composición inmunogénica, tal 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.

- 5 La composición inmunogénica, tal como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a una composición que comprende i) cualquier proteína ORF-2 del PCV2 descrita anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF-2 del PCV2, iii) una porción del cultivo celular, iv) un agente desactivante para desactivar el vector vírico
10 recombinante, preferiblemente BEI, v) un agente de neutralización para detener la desactivación mediada por el agente desactivante, preferiblemente tiosulfato sódico en cantidades equivalentes al BEI; vi) un adyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971, en las cantidades descritas anteriormente; vii) una concentración farmacéuticamente aceptable de una disolución tampón salina, preferiblemente de una sal fosfato, y viii) un
15 agente anti-microbiológico activo; en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tiene un tamaño menor que 1 µm.

La composición inmunogénica, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere también a Ingelvac® CircoFLEX™ (Proteína ORF2 de circovirus porcino Tipo 2)
20 (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 tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más
25 patógenos diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde dicha composición inmunogénica que comprende un antígeno de PCV2 es Ingelvac® CircoFLEX™, CircoVac®, CircoVent y/o Suvaxyn PCV-2 One Dose®, preferiblemente es Ingelvac® CircoFLEX™. Preferiblemente,
30 dichos cerdos infectados están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2. Más preferiblemente, el número de cerdos infectados con dichos patógenos que no son circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente
35 en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado.

La expresión "una cantidad eficaz de un antígeno de PCV2", tal como se utiliza en la presente memoria, significa, aunque sin limitación, una cantidad de un antígeno de PCV2 que provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunológica en un animal, al cual se administra dicha cantidad eficaz de un antígeno de PCV2.

5

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 desactivado o un virus vivo modificado en la vacuna de combinación, se utilizará una cantidad de vacuna que contenga aproximadamente de $10^{2,0}$ a aproximadamente $10^{9,0}$ DICT₅₀ por dosis, preferiblemente aproximadamente de $10^{3,0}$ a aproximadamente $10^{8,0}$ DICT₅₀ por dosis, más preferiblemente, aproximadamente de $10^{4,0}$ a aproximadamente $10^{8,0}$ DICT₅₀ por dosis. En particular, cuando se utiliza PCV2 vivo modificado en las vacunas, la dosis recomendada para ser administrada al animal susceptible es preferiblemente de aproximadamente $10^{3,0}$ DICT₅₀ (50% del punto final de la dosis infecciosa en cultivo de tejido) /dosis a aproximadamente $10^{6,0}$ DICT₅₀/dosis, y más preferiblemente de aproximadamente $10^{4,0}$ DICT₅₀/dosis a aproximadamente $10^{5,0}$ DICT₅₀/dosis. En general, la cantidad de antígeno estará 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 un antígeno purificado.

20

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 hasta aproximadamente 400 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 200 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,35 hasta aproximadamente 100 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 50 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,45 hasta aproximadamente 30 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,6 hasta aproximadamente 16 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,75 hasta aproximadamente 8 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 1,0 hasta aproximadamente 6 µg/dosis, y incluso más preferiblemente con aproximadamente 1,3 hasta aproximadamente 3,0 µg/dosis.

30

La administración de antígeno de PCV2 a cerdos no sólo produce la reducción del porcentaje de infecciones concomitantes provocadas por patógenos diferentes de circovirus, en particular diferentes de PCV2, sino que también produce una mejoría general de la salud, particularmente de la resistencia frente a dichas infecciones concomitantes. Así, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para mejorar la resistencia de cerdos contra una o más infecciones

35

concomitantes con patógenos diferentes de PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad eficaz de antígeno PCV2 o de una composición inmunogénica que comprende el antígeno de PCV2. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2.

La expresión "mejorar la resistencia de los cerdos contra infecciones concomitantes" tal como se usa en la presente memoria se refiere, aunque sin limitación, a un proceso en el que el número de cerdos infectados con un patógeno diferente de circovirus se reduce con respecto a dicho patógeno en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para mejorar la resistencia de cerdos frente a infecciones concomitantes con uno o más patógenos diferentes a PCV2, que comprende la etapa de administrar a dicho(s) cerdo(s) una cantidad efectiva de antígeno de PCV2 o una composición inmunogénica que comprende antígeno de PCV2, en donde el número de cerdos infectados con uno o más de dichos patógenos diferentes a circovirus, se reduce con respecto a uno o más de dichos patógenos en más de un 10%, preferiblemente en más de un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más de un 40%, incluso más preferiblemente en más de un 50%, incluso más preferiblemente en más de un 60%, incluso más preferiblemente en más de un 80%, incluso más preferiblemente en el 100%, en comparación con un grupo de control no vacunado. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PVC2 tal como se ha definido anteriormente, han sido expuestos a PCV2 o están en peligro o son susceptibles de ser infectados con PCV2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN PREFERIDOS

Los siguientes ejemplos recogen los materiales y procedimientos preferidos de acuerdo con la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria pueden usarse en la práctica o en ensayos de la presente invención, se describen ahora los métodos, mecanismos y materiales preferidos. 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

Detección de infecciones concomitantes en animales infectados con PCV-2Población de estudio

El estudio se llevó a cabo en la zona sur de Alemania. Se obtuvieron cerdos híbridos de líneas de cría comerciales (Landrace o Edelschwein (f) x Pietrain (m)) de 15 granjas de cría diferentes que son parte de una "comunidad productora de cerdos". Las granjas de cría presentaban distinto tamaño (de 50 a 300 cerdas), manejo y estado de salud. Las medidas rutinarias preventivas de los cochinitos de todas las granjas de cría incluían inyección de hierro, cortado de dientes y cola y castración. Tras el destete a la edad aproximada de 4 semanas, se transfirieron cochinitos de las diferentes granjas de cría a una granja guardería con un sistema de producción todo-dentro-todo-fuera. Fueron alojados combinados en tres cuadras con corrales diseñados para entre 60 y 120 cerdos por corral. Las medidas preventivas rutinarias en la zona de guardería incluían tratamiento profiláctico con tetraciclina hidrócloruro para los primeros diez días tras la llegada. Se realizaron cuatro cambios en la composición de la comida durante la guardería. El alimento proporcionado a los animales fue auto-preparado en base a cebada y minerales. A la edad aproximada de 12 semanas los cerdos fueron trasladados a una granja de engorde con un sistema de producción todo-dentro-todo-fuera. Nuevamente fueron combinados y alojados en dos establos con corrales diseñados para entre 10 y 30 cerdos por corral. Se realizaron tres cambios en la composición de la comida durante el engorde. El alimento proporcionado a los animales fue auto-preparado en base a cebada, trigo, maíz y concentrado de suero. Los cerdos permanecieron en la granja de engorde durante de 13 a 18 semanas.

Historial de la enfermedad

El modelo de enfermedad de PMWS se había vuelto clínicamente aparente aproximadamente tres años antes del inicio del estudio, en noviembre de 2002, y fue confirmado serológicamente en diciembre de 2002. Al final de la guardería / principio del engorde, los animales comenzaron a mostrar los signos típicos de PMWS, tales como emaciación, síntomas respiratorios y un marcado incremento de la tasa de mortalidad. La enfermedad se complicó con dos coinfecciones con PRRSV. La tasa de mortalidad durante la guardería (4-12 semanas de edad) normalmente osciló entre 3,5 y 4,8 %, pero también se produjeron ocasionalmente picos de hasta un 10% de mortalidad. Durante la mitad de la fase tardía del engorde, los síntomas respiratorios y el retraso en el crecimiento fueron predominantes en los animales infectados con PCV2. La tasa de mortalidad durante el engorde (cerdos de 12-26 semanas de edad) fue aproximadamente 1,7-2,4 % y el número de muertes selectivas fue del 1%. La

ganancia de peso media diaria sólo fue moderada (719-731 g/día). Tres meses antes del inicio del estudio se verificó el diagnóstico de PMWS en base a los signos clínicos y la viremia de PCV2, produciéndose ambos cuando los animales tenían una edad aproximada de 9 a 13 semanas. Como patógenos coinfectantes, se identificaron PRRSV y *Mycoplasma hyorhinis* en muestras de irrigación de pulmón de animales infectados con PCV2.

Artículos de ensayo

Para la vacunación activa contra PCV2, se administró una vacuna de subunidad desactivada (Ingelvac® CircoFLEX™, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH). La vacuna contenía la proteína de cápsida ORF2 del PCV2 como componente activo, y carbómero como adyuvante. La secuencia de ORF2 fue derivada de un elemento aislado de PCV2 Norte Americano que había sido aislado a partir de muestras de amígdala y de hígado de dos cerdos con síntomas de PMWS. La secuencia de ORF2 fue insertada posteriormente en un sistema de expresión de baculovirus usando una línea celular de insecto derivada de ovarios del gusano *Sodoptera frugiperda* (células SF+) como hospedante.

Como artículo de control se empleó un placebo que contenía sobrenadante de cultivo celular libre de proteína de cápsida de PCV2, y carbómero como adyuvante.

Diseño experimental

El ensayo de campo se llevó a cabo de acuerdo con los principios de "Buenas Prácticas Clínicas" (BPC) y siguió un diseño de estudio paralelo aleatorio, con control negativo, doblemente ciego. Un total de 1519 cochinitos sanos fueron distribuidos homogéneamente en dos grupos de tratamiento con respecto al peso corporal inicial y la asignación de lecho. Una semana antes del destete, se vacunó un grupo de cochinitos (n = 754) con Ingelvac® CircoFLEX™ y el otro grupo (n = 765) recibió un placebo. Los artículos evaluados fueron administrados como dosis sencillas de 1 mL intramuscularmente en la región derecha del cuello cuando los cochinitos tenían una edad de $25,4 \pm 3,18$ días (media $\pm$ S.D.). Tras el destete, cerdos de ambos grupos de tratamiento fueron mantenidos en grupos mixtos hasta el final a fin de maximizar la exposición uniforme a patógenos.

Reacciones en cadena de polimerasa

Los ensayos de reacción en cadena de polimerasa fueron usados tal como se describe a fin de detectar ácidos nucleicos específicos para PRRSV (Mardassi H, y col., J Clin Microbiol 1994; 32 (9): 2197-203), *Mycoplasma hyorhinis* (Caron J., y col., J Clin Microbiol 2000; 38 (4): 1390-6), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Calsamiglia M, y col., J Vet Diagn Invest 1999 Mayo; 11 (3): 246-51), *Streptococcus suis* (Wisselink HJ,

y col., J Clin Microbiol 2002 Agosto; 40 (8): 2922-9), *Pasteurella multocida* (Townsend KM, y col., J Clin Microbiol 1998 Abril; 36 (4): 1096-100), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Schaller A, y col., Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. Vet Microbiol 2000 12 de Junio; 74 (4): 365-76), *Bordetella bronchiseptica* (Hozbor D, y col., Res Microbiol 1999 Junio; 150 (5): 333-41) y *Haemophilus parasuis* (Calsamiglia M, y col., J Vet Diagn Invest 1999 Marzo; 11 (2): 140-5) en muestras de tejido de pulmón.

Para la cuantificación de la carga vírica de PCV2 en suero, se cuantifican/cuantificaron equivalentes de genoma de PCV2 de acuerdo con el método descrito en Brunborg y col., 2004; *J. Virol. Methods* 122: 171-178. Para la amplificación del PCV2 se usaron/usan iniciadores PCV2-84-1265U21 y PCV2-84-1319L21. El nivel de corte para una muestra positiva se fijó en 10^4 copias de plantilla por mL de suero en base a experimentos de validación. Todos los ensayos de cuantificación de ADN de PCV2 se llevaron a cabo en bioScreen GmbH, Münster, Alemania.

Resultados

Viremia de PCV2

Se investigó si el comienzo y la gravedad de los síntomas clínicos y lesiones observados característicos de PMWS estaban relacionados con el inicio de la viremia de PCV2 en la sangre de "animales de muestra" preseleccionados. Tal como se ilustra en la Figura 1, el inicio de la viremia de PCV2 comenzó en el grupo tratado con placebo cuando los animales tenían una edad de aproximadamente 9-10 semanas. Se alcanzaron niveles máximos de hasta un 85% de animales positivos en PCV2 cuando los animales tenían una edad aproximada de entre 11 y 14 semanas. A partir de las 14 semanas de edad y hasta el final del engorde, la proporción de animales virémicos con PCV2 fue decreciendo sin que sin embargo se alcanzaran de nuevo los niveles de línea base. De media, la duración individual de la viremia duró 56 días (datos no mostrados).

En comparación con el grupo tratado con placebo, la proporción de animales positivos en PCV2 del grupo vacunado fue significativamente más reducida ($p < 0,0001$) con no más del 35% de animales positivos en el máximo de viremia (Figura 1B). La duración media de la viremia en los animales vacunados se redujo en 31 días ($p < 0,0001$; datos no mostrados).

También se realizó un examen de la carga vírica en los animales. En este estudio se observaron principalmente cargas víricas de relevancia clínica ($> 10^6$ gE/mL de suero) en los animales tratados con placebo en la fase temprana de la viremia, cuando los animales tenían aproximadamente 10-15 semanas de edad (Figura 1A). A la edad de 11 semanas, la proporción de animales con cargas víricas clínicas relevantes (40%) era mayor que la proporción de animales con cargas víricas subclínicas relevantes

(37%). Esta relación fue cambiando dramáticamente en la última fase de la viremia (17-25 semanas de edad) debido a una reducción significativa de las infecciones de relevancia clínica. En los animales vacunados que fueron positivos en PCV2, las infecciones subclínicas fueron predominantes en todos los puntos temporales analizados (Figura 1B).

En resumen, el perfil de PCV2 en las zonas de estudio seleccionadas durante el tiempo del estudio se caracterizó por lo siguiente: a) un inicio de la viremia de PCV2 en la semana de estudio 9-10 que coincidió con el inicio de los síntomas clínicos y de las lesiones de PMWS, b) una elevada carga vírica en los animales tratados con placebo en la fase inicial de la viremia de PCV2, c) una reducción significativa de la duración de la viremia y del porcentaje de animales con cargas víricas clínicas y subclínicas relevantes en los animales vacunados en comparación con los animales tratados con placebo.

Presencia de infecciones concomitantes en los animales tratados con placebo

Los resultados obtenidos hasta el momento confirman el diagnóstico de PMWS en la población de estudio analizada, e indican que la vacunación contra PCV2 puede proteger considerablemente a los animales frente al PMWS. Este experimento de inmunización controlado con placebo permitió por tanto la evaluación de la hipótesis de que el PMWS causa una inmunosupresión subyacente en los animales. Se especuló que en el caso de una inmunodeficiencia asociada a PCV2, la frecuencia de coinfecciones tras el inicio de la viremia de PCV2 sería mayor en los animales tratados con placebo que en los animales vacunados. Por tanto, en una primera etapa se analizó con más detalle la exposición de los animales del estudio a organismos oportunistas. Ya que la monitorización de los síntomas clínicos había mostrado que los animales padecían predominantemente síntomas respiratorios, se decidió seleccionar muestras pulmonares de los animales muertos para el respectivo escrutinio de patógenos mediante PCR. En la Tabla 3 se presentan los resultados de los animales tratados con placebo únicamente, ya que se considera que son los reflejan más estrechamente las condiciones de campo naturales.

Antes del inicio de la viremia de PCV2 (a las 3-8 semanas de edad), el único patógeno que se detectó en 2 de cada 5 muestras de pulmón de animales tratados con placebo fue el *Streptococcus suis*. En el inicio de la viremia de PCV2 (a las 9-10 semanas de edad), 1 de cada 8 muestras de pulmón de animales tratados con placebo era positiva en PCV2, mientras 4 de cada 8 muestras de pulmón analizadas fueron positivas en PRRSV. Otros patógenos detectados en baja cantidad tanto por sí solos como en combinación con estos dos patógenos fueron *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Streptococcus suis*. La mayor cantidad de patógenos coinfectantes se detectó en muestras de pulmón de animales tratados con placebo durante la fase

aguda de la viremia de PCV2 (de 11 a 16 semanas de edad). Entre las 17 muestras de pulmón evaluadas como positivas para PCV2, 12 también resultaron positivas para PRRSV y 13 para *Mycoplasma hyorhinis*. Además, esporádicamente se detectaron coinfecciones con *Streptococcus suis* o *Pasteurella multocida*. Finalmente, en la última fase de la viremia (de 17 a 26 semanas de edad), las coinfecciones con *Mycoplasma hyopneumoniae* fueron predominantes (6 de cada 7 muestras positivas para PCV2), pero también se detectaron coinfecciones con *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Streptococcus suis*. Para el periodo completo de tiempo tras el inicio de la viremia (9-26 semanas de vida), sólo 2 de cada 22 muestras de pulmón de animales tratados con placebo fueron evaluados como positivos únicamente para PCV2. En la mayoría de las muestras de pulmón analizadas positivas para PCV2, se detectaron combinaciones de dos o tres organismos. Durante el transcurso del estudio se observó por tanto infección de PCV2 en asociación con varias infecciones respiratorias concomitantes. El inicio y el máximo de la viremia de PCV2 coincidió con los inicios y los máximos de las coinfecciones con PRRSV y *Mycoplasma hyorhinis*, mientras que la última fase de la viremia de PCV2 vino acompañada del inicio de una infección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Reducción de coinfecciones mediante vacunación contra PCV2

La comparación de la frecuencia de patógenos respiratorios detectados en muestras de pulmón no reveló diferencias importantes entre ambos grupos de tratamiento para el momento anterior al inicio de la viremia de PCV2 (datos no mostrados). Tras el inicio de la viremia de PCV2 (10-26 semanas de edad), la proporción de muestras de pulmón de animales vacunados que fueron evaluados como positivos para *Mycoplasma hyorhinis* y PRRSV se redujo en un 71% (p = 0,0293) y un 46% (p = 0,2847), respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1: Resultados del estudio de B05 BIVI 030

	Placebo		Vacuna		Reducción
	%	(N)	%	(N)	
Exposición a	92	(24/26)	55	(6/11)	40
PRRSV	50	(13/26)	27	(3/11)	46
<i>M. hyorhinis</i>	62	(16/26)	18	(2/11)	71
<i>M. hyopneumoniae</i>	23	(6/26)	45	(5/11)	-
<i>S. suis</i>	12	(3/26)	27	(3/11)	-
<i>P. multocida</i>	4	(1/26)	9	(1/11)	-
APP	8	(2/26)	0	(0/11)	100
<i>B. bronchiseptica</i>	0	(0/26)	0	(0/11)	0
<i>H. parasuis</i>	0	(0/26)	0	(0/11)	0

Además, esporádicamente se descubrieron muestras pulmonares de animales tratados con placebo positivas para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se observaron pequeñas diferencias en el número de muestras pulmonares positivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis* o *Pasteurella multocida* en un segundo estudio entre ambos grupos de tratamiento. Tal como se indica en la Tabla 2, estos patógenos estaban presentes en bajas frecuencias (*Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*) o aparecían en la fase final de la infección de PCV2 (*Mycoplasma hyopneumoniae*).

En otro estudio (estudio B05 BIVI 013), se observó una resistencia similar a patógenos concomitantes en los animales vacunados, tal como se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados del estudio de B05 BIVI 013

	Placebo		Vacuna		Reducción
	%	(N)	%	(N)	%
<i>P. multocida</i>	14	15/109	0	0/32	100
<i>H. parasuis</i>	3	3/109	0	0/32	100
Salmonella spp.	5	5/109	0	0/32	100
APP	4	4/109	0	0/32	100
<i>S. suis</i>	50	15/30	n.a.	n.a.	n.a.

Por lo tanto, bajo la influencia de la vacunación contra PCV-2, se redujo notablemente la frecuencia de infecciones de PCV2, así como la frecuencia de coinfecciones de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyrhinis*, *Pasteurella multocida*, PRRSV, *Salmonella* spp., *Strepococcus suis*.

Asimismo, en otro estudio se observó una resistencia similar a *Mycoplasma hypopneumoniae* en los animales vacunados.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Clark T. Pathology of the Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome of Pigs. 1996 p. 22-5.
- 5 [2] Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. J Virol Methods 2004 15 diciembre; 122 (2): 171-8.
- 10 [3] Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: Diagnosis, Disease and Control: What do we know? 2006 16 Julio-2006 19 Julio; 2006.
- [4] Allan GM, McNeilly F, Ellis J, y col. PMWS: experimental model and co-infections. Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 165-8.
- [5] Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. Vet J 2004 Julio; 168 (1): 41-9.
- 15 [6] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Vet J 2005 Mayo; 169 (3): 326-36.
- [7] Segales J, Domingo M, Chianini F, y col. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. Vet Microbiol 2004 4 Febrero; 98 (2): 151-8.
- 20 [8] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). Vet Pathol 2001 Enero; 38 (1): 31-42.
- [9] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, y col. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. J Comp Pathol 1999 Julio; 121 (1): 1-11.
- 25 [10] Allan GM, McNeilly F, Ellis J, y col. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. Arch Virol 2000; 145 (11): 2421-9.
- 30 [11] Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, y col. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Pathol 2001 Septiembre; 38 (5): 528-39.

- [12] Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 2000 Mayo; 37 (3): 254-63.
- 5 [13] Ostanello F, Caprioli A, Di FA, y col. Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol* 2005 1 Julio; 108 (3-4): 179-86.
- [14] Rovira A, Balasch M, Segales J, y col. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 2002 Abril; 76 (7): 3232-9.
- 10 [15] Darwich L, Segales J, Mateu E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 2004 Mayo; 149 (5): 857-74.
- [16] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, y col. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* 2002; 15 (4): 567-82.
- 15 [17] Batista L. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrom (PMWS) in Quebec, is it an emerging disease? 2006 4 Marzo-7 Marzo; 2006.
- [18] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, y col. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 2003 7 Noviembre; 21 (31): 4565-75.
- 20 [19] Caron J., Ouardani M., Dea S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (4): 1390-6.
- [20] Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest* 1999 Mayo; 11 (3): 246-51.
- 25 [21] Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *J Clin Microbiol* 2002 Agosto; 40 (8): 2922-9.
- 30 [22] Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 1998 Abril; 36 (4): 1096-100.

- [23] Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. Vet Microbiol 2000 12 Junio; 74 (4): 365-76.
- [24] Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of Bordetella bronchiseptica by the polymerase chain reaction. Res Microbiol 1999 Junio; 150 (5): 333-41.
- 5 [25] Calsamiglia M, Pijoan C, Solano G, Rapp-Gabrielson V. Development of an oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay for detection of Haemophilus

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que consiste de proteínas PCV-2 ORF-2, en donde la proteína PCV-2 ORF-2 es un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 11 y portadores veterinarios aceptables seleccionados de entre un grupo que consiste de disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes de adsorción retardantes.

FBJ\FBJ\ID-251089\WPC15149