



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PGT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.**

10-25161

54. **TÍTULO**

REDUCCION DE INFECCIONES CONCOMITANTES EN CERDOS
MEDIANTE EL USO DE ANTIGENO PCV2

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE**

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

DOMICILIO

ST. JOSEPH, MISSOURI, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO**

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.356.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

21/10
04-04-2010

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-025161- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 16:52:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA, INC.**Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.Dirección: 2621 North Belt Highway,
St. Joseph,
Missouri 64506-2002,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: St. Joseph,
Missouri,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456/344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Vicky FACHINGER**Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents,
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein,
Alemania3. **Marion KIXMOELLER**Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents,
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein,
Alemania2. **Knut ELBERS**Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents,
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein,
Alemania

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/061566Fecha: 2 de septiembre de 2008Publicación Internacional No. WO 2009/030684 A3Fecha: 12 de marzo de 2009

6

Título (54)**REDUCCIÓN DE INFECCIONES CONCOMITANTES EN CERDOS MEDIANTE EL
USO DE ANTIGENO PCV2**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 039/012

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

DE

(32) Fecha

4 de septiembre de 2007

(31) Número de Solicitud

EP07115609.5

9

Comprobante de pago No.: 10- 160
10-14,394
10-16,062

Fecha: 5 de enero de 2010
22 de febrero de 2010
1 de marzo de 2010

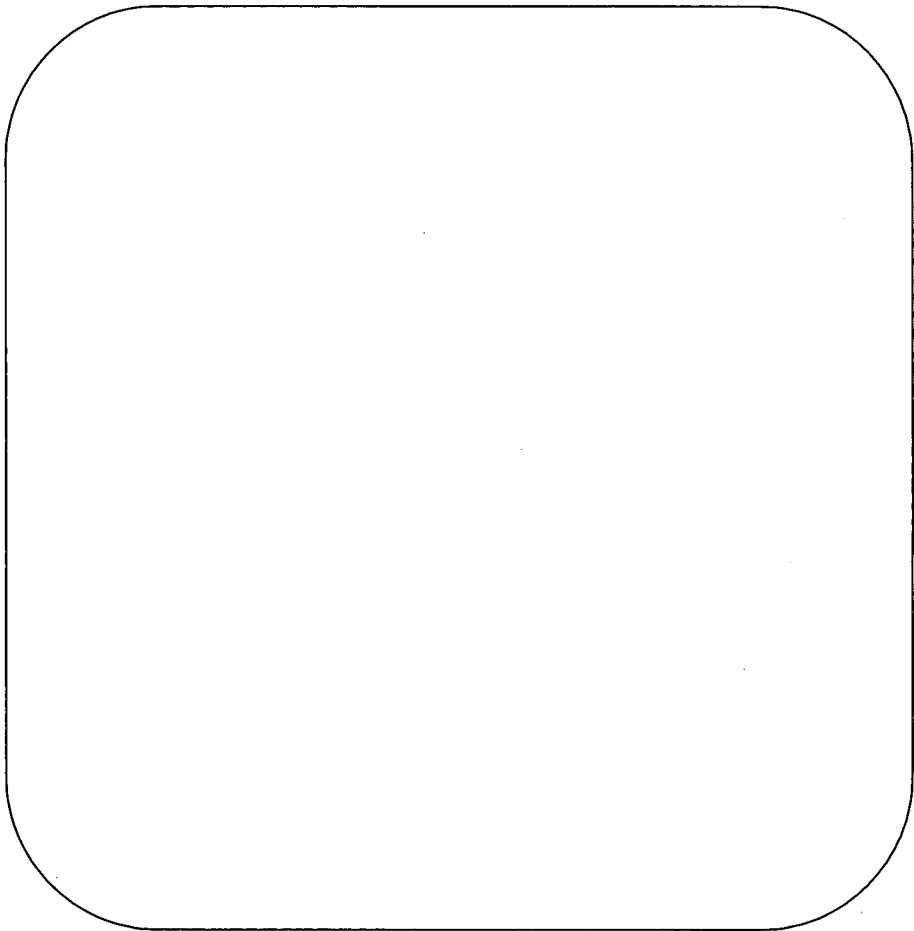
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 22 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$572.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/030684 A3

Descripción:

Páginas 43 en el idioma original

Páginas 39 en español

Reivindicaciones: Número (s) 32

Figuras: Número (s) 1

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

11965

15149
6364

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: The United States of America

THIS PUBLIC DOCUMENT

2. has been signed by JEANNE E. ROGERS

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. in the State of Connecticut for the term of November 26, 2001 to November 30, 2006

CERTIFIED

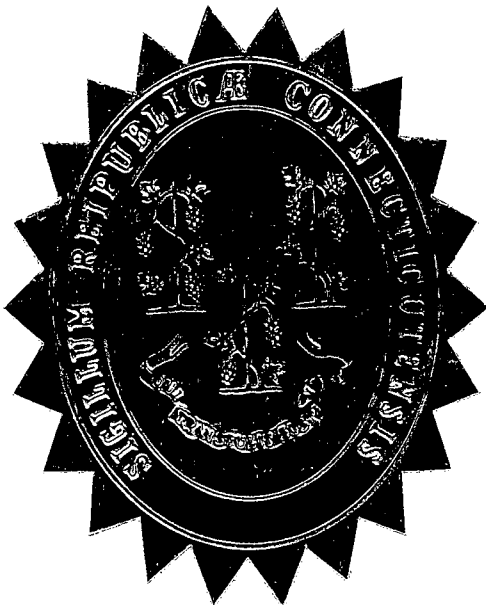
5. at Hartford, Connecticut

6. on March 13, 2006

7. by SUSAN BYSIEWICZ Secretary of the State of Connecticut

8. Number : 2006-3439

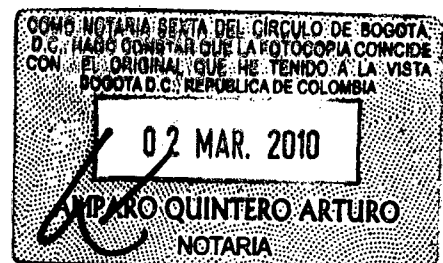
9. Seal :



10. Signature

Susan Bysiewicz

Secretary of the State



REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciliado (s)
en/of

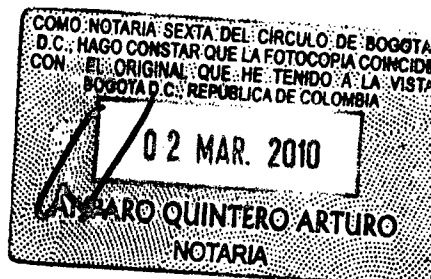
2621 North Belt Highway,

St. Joseph, MO 64506, Estados Unidos de América

hereby ratify the patent appl. No. 06.006.798 filed by Emilio Ferrero on Jan. 25, 2006, and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

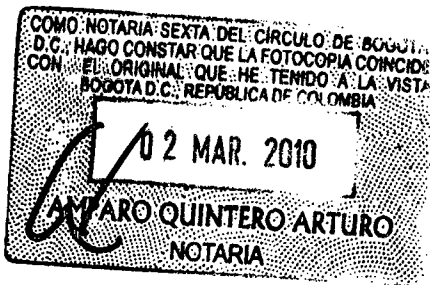
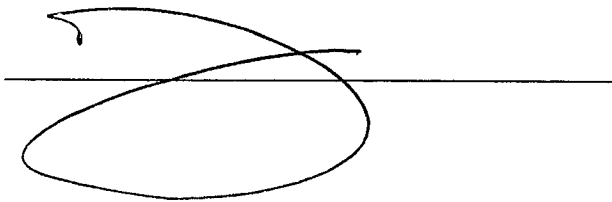


Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.	In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.
---	--

Dado y firmado hoy/Given and signed this 9th Day of March, 2006
en/in Ridgefield, Connecticut USA

por/by Marla S. Persky, Secretary

Firma/Signature



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200 ____ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado de

compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 9 días del mes de MARZO

de 200 6 compareció(eron) ante mí,

Marla S. Persky

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

**NOMBRAMIENTO/RESOLUCION DE LA JUNTA
DIRECTIVA EN RIDGEFIELD, CONNECTICUT
FECHADO 2 MAYO 2005**

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que MARLA S. PERSKY ES SECRETARIA

DE BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de
acuerdo con las leyes de Estado de Delaware

2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
2621 North Belt Highway

St. Joseph, Missouri 64506 EUA

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Marla S. Persky

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Ridgefield

Estado Connecticut

Hoy 9 Marzo de 200 6

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200 ____ before me, a Notary Public or Attesting Official of

personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 9th day of March

2006 ____ appeared before me

Marla S. Persky

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

Appoint/Resolution by the Board of Directors in Ridgefield,
Connecticut dated May, 2, 2005.

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Marla S. Persky is Secretary to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws The State of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
2621 North Belt Highway

St. Joseph, Missouri 64506 USA

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr. (Messrs.) _____

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City Ridgefield

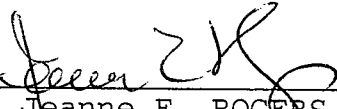
State Connecticut

This 9th day of March 2006 ____

* Documents must be identified with date and origin

Jeanne E. Rogers
JEANNE E. ROGERS
NOTARY PUBLIC

Personally appeared, Marla S. Persky, signer and sealer of the foregoing instrument and acknowledged the same to be her free act and deed before me this 9th day of March, 2006.



Jeanne E. ROGERS
Notary Public
My Commission Expires: 11/30/2006

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:

This public document

2. has been signed by

3. acting in the capacity of

4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at

6. the

7. by

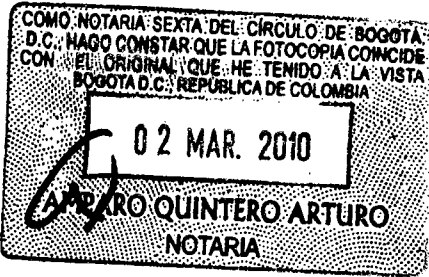
8. No.

9. Seal/stamp

10. Signature

.....

.....



10

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 15/05.06 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante resolución 2879 de 1999 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Poder en inglés y español, por el cual **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**, sociedad domiciliada en 2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 6406, Estados Unidos de América, **ratifica la solicitud de patente No. 06.006.798** presentada por Emilio Ferrero el 25 de enero de 2006 y otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER**.

Dado y firmado el 9 de marzo de 2006 en Ridgefield, Connecticut, E.U.A.

Por Marla S. Persky, Secretaria

Firma: (firma ilegible)

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**, y a la capacidad legal de Marla S. Persky para otorgar poder.

Dado y firmado en la ciudad de Ridgefield

Estado de Connecticut

El 9 de marzo de 2006

(Firma), JEANNE E. ROGERS, Notario Público, Mi comisión expira el 30 de noviembre de 2006.

Al dorso:

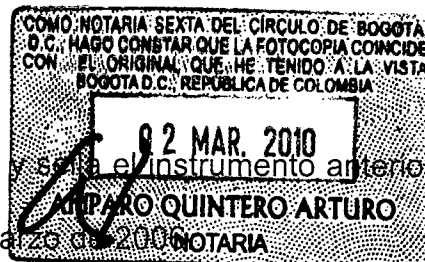
Compareció personalmente Marla S. Persky, quien firma y sella el instrumento anterior y reconoció a éste como un acto libre ante mí hoy 9 de marzo de 2006

(Firmado)

JEANNE E. ROGERS

Notario Público

Mi comisión expira el 30 de noviembre de 2006



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

ESTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. ha sido firmado por **JEANNE E. ROGERS**

3. actuando en su capacidad de **NOTARIO PÚBLICO**

4. del estado de Connecticut por el término 26 de noviembre de 2001 a 30 de noviembre de 2006

CERTIFICADO

5. en Hartford, Connecticut

6. el 13 de marzo de 2006

7. por **SUSAN BYSIEWICZ**, Secretario de Estado de Connecticut

8. Número: **2006-3439**

9. Sello: sello del Estado de Connecticut

10. Firma: (firmado), Susan Bysiewicz, Secretario de Estado

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 15149-841-001-9

WPC 15149 - ID 12

MAR 31/06

Maria E. Martelo
TRADUCCION No.: 15105.06
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

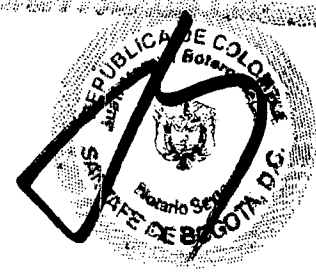
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

451535
Marta Martelo
FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENADO
ACCIONES INDICADAS

2006 JUN -1 A 11:56
Cm
OFICINA DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LAS FIRMA(S) DE
[Firma]
[Firma]
COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA.
01 JUN 2006
CODEX JURIS CIVILIS



Assignment of Inventors

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

Vicky FACHINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany, a citizen of Germany

Knut ELBERS, Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany, a citizen of Germany

Marion KIXMOELLER, Mariahilfstr. 1, 81541 Muenchen, Germany, a citizen of Germany

inventor/s of an invention related to:

"REDUCTION OF CONCOMITANT INFECTIONS IN PIGS BY THE USE OF PCV2 ANTIGEN"

for which a first application was filed in **Europe**

Serial No.: **EP 07115609.5**

Filing Date: **September 4, 2007**

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

residing in

2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-2002, USA

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, India, Indonesia, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates

aforesaid without any restriction whatever.

Done and signed at

Vicky FACHINGER

Date

Knut ELBERS

Date

Marion Kixmoeller

Marion KIXMOELLER

08/22/2008

Date

URNr. Z/ 1615 / 2008

Ich beglaube hiermit die Echtheit der umstehenden vor mir anerkannten Unterschrift von

Frau Dr. Marion **Kixmüller**,
geboren am 22. August 1975,
wohnhaft 81541 München, Mariahilfstraße 1,
ausgewiesen durch ihren Bundespersonalausweis
Nr. 8020684275.

München, den 22. August 2008



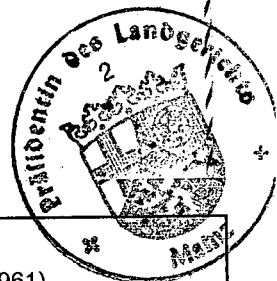
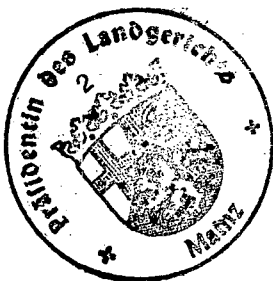
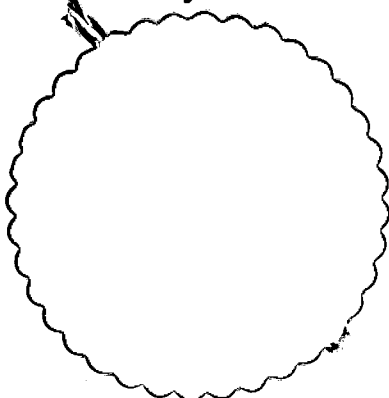
Joanna Zehetmeier, Notarin

Conformity of the above copy with the original
is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 21st day of January 2010 /Ge

Mr. Wichard Bolle

Notary a.D. Wichard Bolle
as officially appointed representative of
the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland
- Diese öffentliche Urkunde**
2. ist unterschrieben von Notar a.D. Wichard Bolle
3. in seiner Eigenschaft als amtlich bestellter Vertreter des Notars Horst Heintskill mit dem Amtssitz in Ingelheim am Rhein
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

5. in Mainz
6. am 25.01.2010
7. durch die Präsidentin des Landgerichts
8. unter Nr. 110/2010
9. Siegel/Stempel
10. Unterschrift

Kostenrechnung:

Gebühr für die Erteilung
der Legalisation

Wert: 3.000,00 €

JVKostO v. 26.7.1957

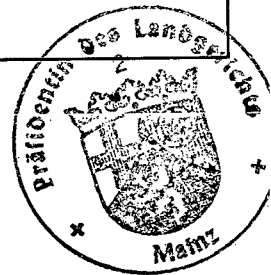
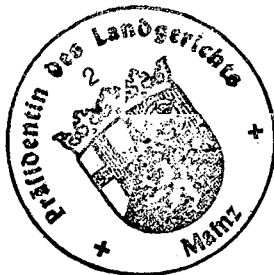
i.V.m. § 45 KostO

Gebühr: 10,00 €

Mainz, 25.01.10

Laux

Amtsinspektor



Marliese Dicke
Marliese Dicke

Assignment of Inventors

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

**Vicky FACHINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Str. 173,
55216 Ingelheim am Rhein, Germany, a citizen of Germany**

**Knut ELBERS, Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Str. 173,
55216 Ingelheim am Rhein, Germany, a citizen of Germany**

**Marion KIXMOELLER, Mariahilfstr. 1, 81541 Muenchen, Germany, a citizen of
Germany**

inventor/s of an invention related to:

"REDUCTION OF CONCOMITANT INFECTIONS IN PIGS BY THE USE OF PCV2 ANTIGEN"

for which a first application was filed in **Europe**

Serial No.: **EP 07115609.5**

Filing Date: **September 4, 2007**

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

residing in

2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-2002, USA

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the
following territories:

**Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, India,
Indonesia, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela,
Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates**

aforesaid without any restriction whatever.

Done and signed at

V. Fachinger
Vicky FACHINGER

July 18th 2008
Date

K. Elbers
Knut ELBERS

July 18/08
Date

Marion KIXMOELLER

Date

UR.Nr. 144/2008 H

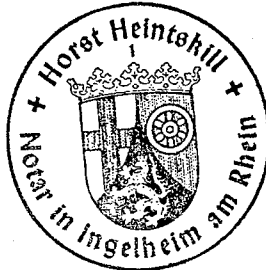
It is herewith certified that above signatures of

Mr. Dr. Knut E l b e r s, born 20th day of September 1964, residing at 55435 Gau-Algesheim, Caprino-Veronese-Straße 4a, personally known,

Mrs. Vicky F a c h i n g e r, born 14th day of December 1970, residing at 65812 Bad Soden, Bismarckstraße 13, identified by presentation of her valid ID-card, were duly given in my presence.

Ingelheim/Rhein, the 18th day of July 2008/Ge

Notary

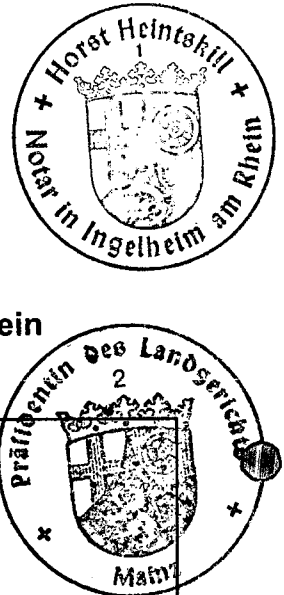
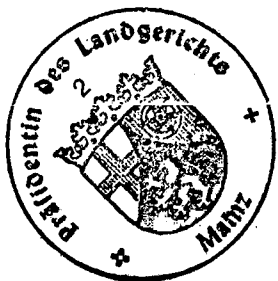


Conformity of the above copy with the original is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 21st day of January 2010 /Ge

Notary a.D. Wichard Bolle

as officially appointed representative of the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- Land: Bundesrepublik Deutschland
- ist unterschrieben von Notar a.D. Wichard Bolle
- in seiner Eigenschaft als amtlich bestellter Vertreter des Notars Horst Heintskill mit dem Amtssitz in Ingelheim am Rhein
- sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

- in Mainz
- am 25.01.2010
- durch die Präsidentin des Landgerichts
- unter Nr. 111/2010
- Siegel/Stempel
- Unterschrift

Marliese Dicke

Kostenrechnung:

Gebühr für die Erteilung der Legalisation

Wert: 3.000,00 €

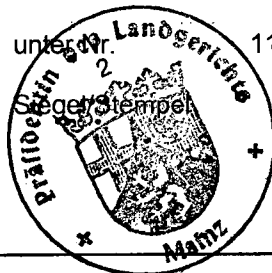
JVKostO v. 26.7.1957

i.V.m. § 45 KostO

Gebühr: 10,00 €

Mainz, 25.01.10

Laux
Amtsinspektor



15

La presente traducción oficial No. 0019/10 fue elaborada por Hernando Torres Barrera, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución 01305 de 1998 del Ministerio de Justicia y del Derecho.

A continuación se traduce a) una certificación notarial y su correspondiente apostilla en alemán, b) una apostilla en alemán, que acompaña a la Certificación Notarial No. 144 / 2008 H en idioma inglés, que aparecen en un DOCUMENTO DE CESIÓN.

Certificación Notarial No. 1615 / 2008

Certifico por el presente la autenticidad de la firma que aparece al dorso de la página, reconocida en mi presencia de

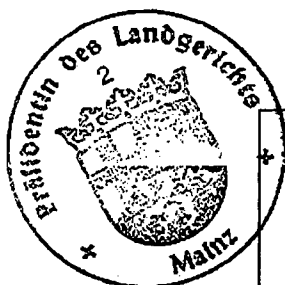
la señora Dra. Marion Kixmüller,
con fecha de nacimiento 22 de agosto de 1975,
residente en 81541 Munich, Mariahilfstraße 1
identificada con documento de identidad personal de la República Federal de
Alemania No. 8020684275.

Munich, 22 de agosto de 2008


Joanna Zehetmeier, Notaria

13


HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998



Factura de gastos:

Tasa por impartir la legalización
Valor: 3.000,00 €
JVKostO¹ del 26.7.1957
en conexión con § 45 KostO²
Tasa: 10,00 €

Maguncia, 25.01.2010

Laux
Inspector Oficial

APOSTILLA

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

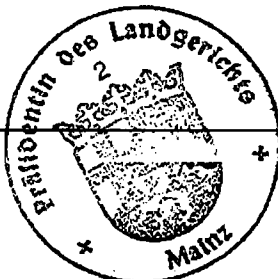
1. País: República Federal de Alemania

Este documento público

2. está firmado por Notario jubilado (a.D.) Wichard Bolle
3. en su calidad de Suplente oficialmente designada del Notario Horst Heintskill con oficinas en Ingelheim am Rhein
4. lleva el sello de Horst Heintskill - Notario en Ingelheim am Rhein

Certificado

5. en Maguncia 6. el 25 de enero de 2010
7. por la Presidenta del Tribunal Regional
8. bajo el No. 110/2010
9. Sello/timbre 10. Firma



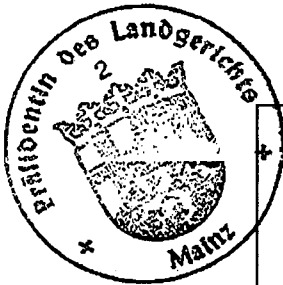
Marliese Dicke
Marliese Dicke

SELLO: PRESIDENTA DEL TRIBUNAL REGIONAL * MAGUNCIA *

Hernando Torres Barrera
HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305-MINJUSTICIA 1998

¹ JVKostO = Reglamento de gastos de administración de justicia.

² KostO = Reglamento de gastos notariales



Factura de gastos:

Tasa por impartir la legalización
Valor: 3.000,00 €
JVKostO¹ del 26.7.1957
en conexión con § 45 KostO²
Tasa: 10,00 €

Maguncia, 25.01.2010

Laux
Inspector Oficial

APOSTILLA

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

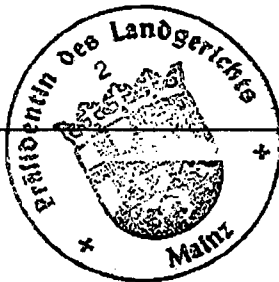
1. País: República Federal de Alemania

Este documento público

2. está firmado por Notario jubilado (a.D.) Wichard Bolle
3. en su calidad de Suplente oficialmente designada del Notario
Horst Heintskill con oficinas en Ingelheim
am Rhein
4. lleva el sello de Horst Heintskill - Notario en Ingelheim
am Rhein

Certificado

5. en Maguncia 6. el 25 de enero de 2010
7. por la Presidenta del Tribunal Regional
8. bajo el No. 111/2010
9. Sello/timbre 10. Firma



Marliese Dicke
Marliese Dicke

SELLO: PRESIDENTA DEL TRIBUNAL REGIONAL * MAGUNCIA *

Bogotá, D.C., 25 de febrero de 2010

Hernando Torres Barrera
HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

¹ JVKostO = Reglamento de gastos de administración de justicia.

² KostO = Reglamento de gastos notariales

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 03.01/10a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

Copia Certificada

Caso P10-100 CO

Cesión de Inventores

Por contraprestación legal y válida, el recibo y suficiencia de la cual se reconoce por el presente, los suscritos (los "Cedentes")

Vicky FACHINGER, Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Alemania - ciudadano de Alemania

Knut ELBERS, Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Alemania - ciudadano de Alemania

Marion KIXMOELLER, Mariahilfstr. 1, 81541 Muenchen, Alemania - ciudadano de Alemania

inventores de una invención relativa a:

"REDUCCIÓN DE INFECCIONES CONOCOMITANTES EN CERDOS MEDIANTE EL USO DE ANTÍGENO PCV2"

para la cual se presentó la primera solicitud en **Europa**

No. de Serie: **EP 07115609.5**

Fecha de presentación: **4 de septiembre de 2007**

por el presente cedemos y transferimos todos mis/nuestros derechos, título e interés en y la misma a

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciliada en

2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-2002, Estados Unidos de América

a la cual se le ha hecho la cesión de todos los derechos, título e interés para los siguientes territorios:

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999¹
MINISTERIO DE JUSTICIA

Argentina, Brasil, Canadá, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egipto,
India, Indonesia, Paquistán, Perú, Sudáfrica, Taiwán, Tailandia,
Uruguay, Venezuela, Vietnam, estados miembros del GCC y los
Emiratos Árabes Unidos

mencionados anteriormente sin ninguna limitación.

Dado y firmado en

Firma Ilegible
Marion KIXMOELLER

08/22/2008
Fecha

Certificación notarial URNr. 1615/2008 en alemán mediante la cual
se autentica la firma del Sr. Dr. Marion Kixmöller en el anterior
documento expedida por la Notaria Joanna Zehetmeier.

Por el presente se certifica la
correspondencia de la copia anterior con el original

Ingelheim am Rhein, el 21 de enero de 2010/Ge

Firma Ilegible

Notario a.D. Wichard Bolle

representante oficialmente nombrado del

Notario Horst Heintskill con oficina en Ingelheim am Rhein

Sello de Apostille expedido en la República Federal de Alemania y
certificado en Mainz el 25.01.2010 con el **Nr. 110/2010**.

EN OTRO EJEMPLAR DE CESIÓN IDÉNTICO AL MENCIONADA APARECEN LAS FIRMAS:

Dado y firmado en

Firma Ilegible
Vicky FACHINGER

Julio 18 de 2008
Fecha

Firma Ilegible
Knut ELBERS

Julio/18/08
Fecha


DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL 2
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

URNr. 144/2008 H

Por el presente se certifica que las firmas anteriores del

Señor Dr. Knut E l b e r s, nacido el 20 de septiembre de 1964, domiciliado en 55435 Gau-Algesheim, Caprino-Varonese-Straße 4a, a quien conozco personalmente,

La señora Vicky F a c h i n g e r, nacida el 14 de diciembre de 1970, domiciliada en 65812 Bad Soden, Bismarckstraße 13, identificada por medio de la presentación de su tarjeta de identificación,

fueron debidamente escritas en mí presencia.

Ingelheim/Rhein, el 18 de julio de 2008/Ge

Firma Ilegible

Notario Sello Notarial

Por el presente se certifica la correspondencia de la copia anterior con el original

Ingelheim am Rhein, el 21 de enero de 2010/Ge

Firma Ilegible

Notario a.D. Wichard Bolle

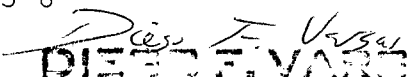
representante oficialmente nombrado del

Notario Horst Heintskill con oficina en Ingelheim am Rhein

Sello de Apostille expedido en la República Federal de Alemania y certificado en Mainz el 25.01.2010 con el **Nr. 111/2010**.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-166086\WPCL002H\COLO 09255-841-135-8


DIETRICH F. VARGHA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

21

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 March 2009 (12.03.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/030684 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2008/061566

(22) International Filing Date:

2 September 2008 (02.09.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

EP07115609.5 4 September 2007 (04.09.2007) DE

(71) Applicant (for all designated States except US):

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
[US/US]; 2621 North Belt Highway; St. Joseph, Mis-
souri, Iowa 64506-2002 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FACHINGER,

Vicky [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, CD
Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein
(DE). ELBERS, Knut [DE/DE]; Boehringer Ingelheim
GmbH, CD Patents, Binger Strasse 173, Ingelheim Am
Rhein (DE). KIXMOELLER, Marion [DE/DE];
Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Strasse
173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(74) Agent: HAMMANN, Heinz; Boehringer Ingelheim

GmbH, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim
Am Rhein (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:

20 August 2009

(54) Title: REDUCTION OF CONCOMITANT INFECTIONS IN PIGS BY THE USE OF PCV2 ANTIGEN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by pathogens other than PC V2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen. It also refers to a method for improving the resistance of pigs against concomitant infections with pathogens other than PCV2, comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen.



WO 2009/030684 A3

22

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 March 2009 (12.03.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/030684 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(74) Agent: HAMMANN, Heinz; Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/061566

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
2 September 2008 (02.09.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
EP07115609.5 4 September 2007 (04.09.2007) DE

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
[US/US]; 2621 North Belt Highway; St. Joseph, Missouri, Iowa 64506-2002 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FACHINGER, Vicky [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). ELBERS, Knut [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Strasse 173, Ingelheim Am Rhein (DE). KIXMOELLER, Marion [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau



WO 2009/030684 A2

(54) Title: REDUCTION OF CONCOMITANT INFECTIONS IN PIGS BY THE USE OF PCV2 ANTIGEN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by pathogens other than PC V2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen. It also refers to a method for improving the resistance of pigs against concomitant infections with pathogens other than PCV2, comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen.

REDUCTION OF CONCOMITANT INFECTIONS IN PIGS
BY THE USE OF PCV2 ANTIGEN

5

SEQUENCE LISTING

This application contains a sequence listing in paper format and in computer readable format, the teachings and content of which are hereby incorporated by reference. The sequences sequence listing is identical with that incorporated in WO06/072065.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention:

The present invention relates to the field of veterinary medicine, in particular to infectious diseases. Moreover, the present invention relates to a method for reducing concomitant
15 infections in pigs caused by pathogens other than PCV-2.

Background

In 1996 a new emerging disease termed "Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome" (PMWS) was described in reference to cases observed in Canada five years earlier (Clark T. Pathology of the Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome of Pigs. 1996 p. 22-5).
20 Porcine circovirus type 2 (PCV2) was identified as an essential causative agent of this disease syndrome. PMWS has meanwhile been observed in virtually all regions of the world that produce pigs (Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. J Virol Methods 2004 Dec 15;122(2):171-8). Pigs 5 to 15 weeks of age are most commonly affected (Allan G, McNeilly
25 F. PMWS/PCVD: Diagnosis, Disease and Control: What do we know? 2006 Jul 16-2006 Jul

19; 2006; Allan GM, et al., Vet Microbiol 2004 Feb 4;98(2):165-8; Chae C. Vet J 2004 Jul;168(1):41-9). Clinical signs include a marked increase in the mortality rate, wasting, generalized enlargement of lymphnodes, respiratory signs, and occasionally pallor, jaundice and diarrhoea (Chae C. Vet J 2005 May;169(3):326-36; Segales J. et al. Vet Microbiol 2004
5 Feb 4;98(2):151-8). These clinical signs are not all seen at the same time in a single PMWS affected pig herd but it appears that the expression of clinical signs is indirectly linked to farm-specific co-pathogens that preferentially target different organ systems (Krakowka S. et al., Vet Pathol 2001 Jan;38(1):31-42). Epidemiological investigations have shown that porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), swine influenza virus (SIV),
10 porcine parvovirus (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Streptococcus suis* and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Chae C. Vet J 2004 Jul;168(1):41-9) are most commonly seen in combination with the disease syndrome.

For the production of PMWS activation of the immune system has been postulated to be the
15 pivotal event (Krakowka S. et al., Vet Pathol 2001 Jan;38(1):31-42). While the experimental inoculation with PCV2 alone did only produce clinically asymptomatic infections and a very modest histologic evidence of inflammation the dual infection with PCV2 and PPV or PRRSV resulted in more severe clinical signs, gross and histological lesions, a wider spread and a higher PCV2 viral load within affected tissues. These findings seem to be
20 predominantly caused by PCV2 since infection with PRRSV or PPV alone did not result in comparable clinical signs or lesions (Allan et al., J Comp Pathol 1999 Jul;121(1):1-11; Allan GM, et al., Arch Virol 2000;145(11):2421-9; Harms PA, et al., Vet Pathol 2001 Sep;38(5):528-39; Krakowka S, et al., Vet Pathol 2000 May;37(3):254-63; Ostanello F, et al., Vet Microbiol 2005 Jul 1;108(3-4):179-86; Rovira A, et al., J Virol 2002 Apr;76(7):3232-9).
25 In addition, a similar increase in disease severity could also be achieved in the absence of

other co-infecting agents if pigs were immunostimulated with keyhole limpet hemocyanin in incomplete Freund's adjuvant (KLH/ICFA) (Krakowka S. et al., Vet Pathol 2001 Jan;38(1):31-42).

- 5 The effects of PCV2 on the pig immune system are not fully known. It has been reported that the main target cells for PCV2 replication are the monocyte/macrophage lineage as well as other antigen presenting cells such as follicular dendritic cells (Darwich L, et al., Arch Virol 2004 May;149(5):857-74). Several studies suggested that PCV2 infects dividing cells, macrophages and B lymphocytes, inducing apoptosis of the B cells that leads to the damage
- 10 of lymphoid tissues resulting in extensive lymphocyte depletion (Darwich L, et al., Arch Virol 2004 May;149(5):857-74). Particularly PMWS affected pigs show histiocytic infiltration and lymphocyte depletion of both follicle centers and parafollicular zones, symptoms associated with the presence of PCV2 (Segales J. et al. Vet Microbiol 2004 Feb 4;98(2):151-8; Darwich L, et al., Arch Virol 2004 May;149(5):857-74). These facts have led some to suggest that
- 15 PCV2 infection might cause immunosuppression (Darwich L, et al., Arch Virol 2004 May;149(5):857-74; Krakowka S, et al., Viral Immunol 2002;15(4):567-82).

- Approaches to treat PCV2 infections, in particular PMWS, based on a DNA vaccine are described in U.S. Patent No. 6,703,023. In WO 03/049703 production of a live chimeric
- 20 vaccine is described, comprising a PCV1 backbone in which an immunogenic gene of a pathogenic PCV2 strains replaces a gene of the PCV1 backbone. WO99/18214 has provided several PCV2 strains and procedures for the preparation of a killed PCV2 vaccine. An effective ORF-2 based subunit vaccine has been reported in WO06/072065. Any of such vaccines are intended to be used for the vaccination/treatment of swine against PMWS.

28

No reports exist about the potential impact of PCV2 infections on the incidence of concomitant infections caused by various swine relevant pathogens. Particularly, nothing is reported about the potential impact of PCV2 on specific pathogens, such as *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida*,
5 *PRRSV*, *Salmonella* spp., *SIV* or *Streptococcus suis*. Moreover, even if different PCV2 vaccines are known for a short time, their impact on concomitant infections other than PCV2 in swine is yet not known.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

10 **Figure 1:** Profile of PCV2 viraemia. Blood samples from pre-selected placebo-treated animals (Figure 1A; n=110) and vaccinated animals (Figure 1B; n=110) were collected at the indicated time points. On the basis of the quantitative PCR results animals were grouped into classes of animals with sub-clinical viral loads ($10^4 - 10^6$ gE/ml) and clinical relevant viral loads ($> 10^6$ gE/ml). White bars represent the proportion of animals with subclinical viral
15 loads and black bars illustrate the proportion of animals with clinical relevant viral loads per sampling day.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is based on the surprising finding, that PCV2 vaccine cannot only
20 reduce the percentage of PCV2 infections in pigs or a herd of pigs, but also the percentage of concomitant infections caused by pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2.

Therefore, according to one aspect, the present invention relates to a method for reducing the
25 percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more

pathogens other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen.

The term "concomitant infections" as used herein shall mean but is not limited to any
5 infection of swine caused by viral, bacterial, fungal or worm pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2. The term "concomitant pathogen" as used herein means but is not limited to a pathogen of swine other than circovirus, in particular other than PCV2. Thus according to another aspect, the present invention provides a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more viral,
10 bacterial, fungal or worm pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen. Preferably, the concomitant infections are caused by one or more bacterial, viral or fungal pathogens, or combinations thereof. More preferred, the concomitant infections are caused by one or more bacterial or viral pathogens,
15 or a combination thereof.

According to another aspect of the present invention, the term "concomitant infections" also means that the pig infected with one or more concomitant pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2 is co-infected with PCV2. Thus according to another aspect, the
20 present invention provides a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs co-infected with PCV2, wherein the concomitant infections are caused by one or more pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen. Preferably, the concomitant infections are caused by

one or more viral, bacterial, fungal or worm pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2.

The term “co-infected with PCV2” as used herein means but is not limited to any form of co-
5 infection with PCV2, which means that the PCV2 infection occurs prior to, simultaneously with or after the infection with the pathogens which are different from circovirus, in particular different from PCV2. It also includes sub-clinical, clinical apparent, fulminant and chronic courses of PCV2 infections. In this context, apparent courses are not limited to PMWS, but also include any other clinical appearances of PCV2 infections such as porcine respiratory
10 disease complex (PRDC), porcine dermatopathy and nephropathy syndrome (PDNS), reproductive failure, granulomatous enteritis, potentially, congenital tremors (CT-AII) and perinatal myocarditis (Chae, Veterinary J., 2005; 169: 326-336).

However, the term “concomitant infection” does not necessarily mean that the pig or herd of
15 pigs is co-infected with PCV2. The term “concomitant infection” also refers but is no limited to cases, where pigs or a herd of pigs are/is exposed to PCV2 or where a risk exist to get infected with PCV2. Thus according to another aspect, the present invention provides a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2, wherein the
20 concomitant infections are caused by one or more pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2. Preferably, the concomitant infections are caused by one or more viral, bacterial, fungal or worm pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2.

The term “ the percentage of concomitant infections is reduced “ shall mean that the number of pigs infected with a pathogen other than circovirus, is reduced for said pathogen for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group. In this context the term “non-vaccinated control group” shall mean a group of pigs which are not administered with an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen. Thus, according to another aspect, the present invention also provides a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by a pathogen other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen, wherein the number of pigs infected with said pathogen other than circovirus, is reduced for said pathogen for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group. Preferably, the concomitant infection is caused a by viral, bacterial or fungal pathogen other than circovirus, in particular other than PCV2. More preferably, said pigs or herd of pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2.

Concomitant infections caused by a viral, bacterial or fungal pathogen other than circovirus, in particular other than PCV2 may cause enteric, respiratory, reproductive, central nervous or locomotory symptoms in the infected animals. Incidence of any of those clinical symptoms,

- caused the by the respective pathogens can be reduced. Thus according to another aspect, the present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more enteric, respiratory, reproductive, central nervous or locomotory pathogens other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an
- 5 effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen. Preferably, said pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2. More preferred, the number of pigs infected with an enteric, respiratory, reproductive, central nervous or locomotory pathogen other than circovirus, is reduced for said enteric, respiratory, reproductive, central nervous or
- 10 locomotory pathogen for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group.
- 15 Enteric pathogens are for example *Lawsonia intracellularis*, *E.coli*, *Streptococcus suis*, *Clostridium* spp, *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp., rotaviruses or coronaviruses. Respiratory pathogens are for example PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*. Reproductive pathogens are for example *Leptospira* spp., PRRSV, *Chlamydia* spp. Locomotory pathogens are for example *S. suis*, *M. hyorhinis*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*.
- 20 Pathogens of the central nervous system are for example *Pseudorabies virus*, *S. suis*., *Haemophilus* sp.

In general the term "pathogen other than PCV2" means but is not limited to one or more of the pathogens selected from the group consisting of: *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus pleuropneumonia (APP)*; African swine fever virus; *Aspergillus*

25

spp.; Astroviruses; Ascaris suum; Blastocystis spp.; Bordetella bronchiseptica; Brachyspira spp., B. hyodysenteriae, B. pilosicoli; Brucella suis, Brucella suis biovars 1, 2 and 3; Candida spp.; Classical swine fever virus; Clostridium spp., in particular C. difficile, C. perfringens types A, B and C, C. novyi, C. septicum, C. difficile, C. tetani; Chlamydia spp.,
5 Cryptosporidium spp.; Encephalomyocarditis virus; Eperythrozoonosis suis; Erysipelothrix rhusiopathiae; Escherichia coli; Fusarium spp.; Haemophilus parasuis; Hemagglutinating encephalomyelitis virus; Hepatitis E virus; Japanese encephalitis virus; 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.
10 bratislava; Mannheimia haemolytica; Menangle virus; Mycobacterium spp., M. avium, M. intracellulare, M. tuberculosis; Mycoplasma spp., M. hyopneumoniae, M. hyorhinis; Nipah virus; Oesophagostom spp., Oesophagostom dentatum, Oesophagostom quadrosinulatum; Pasteurella spp., P. multocida; Penicillium spp.; Porcine adenovirus; Porcine cytomegalovirus; Porcine enteric caliciviruses; Porcine enteric picornaviruses; Porcine
15 parvovirus; Porcine respiratory corona virus; PRRS virus; Pseudorabies virus; 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; Swine herpes virus; Swine influenza virus; Swine pox virus; Transmissible gastroenteritis virus; Trichuris spp.
20 Taenia spp., Trichinella spiralis; Vesicular stomatitis virus; Virus of vesicular exanthema of swine; West Nile virus; or Yersinia spp., Y. pseudotuberculosis, Y. enterocolitica.

Thus according to another aspect, the present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more
25 pathogens other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective

amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen, wherein the pathogens cause the concomitant infections are selected from the group consisting of: *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP); African swine fever virus; *Aspergillus* spp.; Astroviruses; *Ascaris suum*; *Blastocystis* spp.;

5 *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*; *Brucella suis*, *Brucella suis* biovars 1, 2 and 3; *Candida* spp.; Classical swine fever virus; *Clostridium* spp., in particular *C. difficile*, *C. perfringens* types A, B and C, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. tetani*; *Chlamydia* spp., *Cryptosporidium* spp.; *Encephalomyocarditis* virus; *Eperythrozoonosis suis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Fusarium* spp.;

10 *Haemophilus parasuis*; Hemagglutinating encephalomyelitis virus; Hepatitis E virus; Japanese encephalitis virus; *Hyostrogylus 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*; Menangle virus; *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp., *M.*

15 *hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; Nipah virus; *Oesophagostum* spp., *Oesophagostum dentatum*, *Oesophagostum quadrosinulatum*; *Pasteurella* spp., *P. multocida*; *Penicillium* spp.; Porcine adenovirus; Porcine cytomegalovirus; Porcine enteric caliciviruses; Porcine enteric picornaviruses; Porcine parvovirus; Porcine respiratory corona virus; PRRS virus; *Pseudorabies* virus; Reovirus; Rotavirus; Rubulavirus; *Salmonella* spp., *S. typhimurium*, *S.*

20 *choleraesuis*, *S. dublin*; *Sarcoptes* spp.; *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp., *S. suis*, *S. porcinus*, *S. dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; *Strongyloides ransomi*; Swine herpes virus; Swine influenza virus; Swine pox virus; Transmissible gastroenteritis virus; *Trichuris* spp. *Taenia* spp., *Trichinella spiralis*; Vesicular stomatitis virus; Virus of vesicular exanthema of swine; West Nile virus; or *Yersinia* spp., *Y. pseudotuberculosis*, *Y.*

25 *enterocolitica*.

Preferably said concomitant infections are caused by one or more of the pathogens selected from the group consisting of: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Mycoplasma hyrhinis*; *Pasteurella multocida*; PRRS; *Salmonella* spp. and *Streptococcus suis*. Most preferred said concomitant infections are caused by one or more of the pathogens selected from the group consisting of: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Mycoplasma hyrhinis*; *Pasteurella multocida*; PRRS; *Salmonella* spp. and *Streptococcus suis*. More preferred said concomitant infections are caused by one or more of the pathogens selected from the group consisting of: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Mycoplasma hyrhinis*, and PRRS. Most preferred by *Mycoplasma hyrhinis* and/or PRRS.

Preferably, said pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2. More preferred, the number of pigs infected with one or more of said pathogens above other than circovirus, is reduced for said pathogens for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group. In case of multiple infections, the reduction rates as described above refers to each specific pathogen. For example, reduction of more than 10% concomitant infections in a multiple infected pig means that the infection rate with regard to a specific pathogen is reduced for more than 10%. It does not necessarily mean that the infection rate with regard to all pathogen is reduced for more than 10% as compared to a non-vaccinated control group, or with regard to a herd of pigs that less than 10% of the pigs of said herd are infected by all of said pathogens.

The terms "PCV2 antigen" as used herein refer to an amino acid sequence which elicits an immune response against PCV2 in a host. An antigen, as used herein, includes the full-length sequence of any PCV2 proteins, analogs thereof, or immunogenic fragments thereof.

- 5 The term "immunogenic fragment" refers to a fragment of a protein which includes one or more epitopes and thus elicits the immune response in a host. Such fragments can be identified using any number of epitope mapping techniques, well known in the art. See, e.g., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. For example, linear epitopes may be determined
- 10 by e.g., concurrently synthesizing large numbers of peptides on solid supports, the peptides corresponding to portions of the protein molecule, and reacting the peptides with antibodies while the peptides are still attached to the supports. Such techniques are known in the art and described in, e.g., U.S. Patent 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. Similarly,
- 15 conformational epitopes are readily identified by determining spatial conformation of amino acids such as by, e.g., x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. See, e.g., Epitope Mapping Protocols, *supra*.

- Synthetic antigens are also included within the definition, for example, polyepitopes, flanking
- 20 epitopes, and other recombinant or synthetically derived antigens. See, e.g., Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998.

85

An "immune response" means but is not limited to the development in a host of a cellular and/or antibody-mediated immune response to an antigen, a immunogenic composition or vaccine of interest. Usually, an "immune response" includes but is not limited to one or more of the following effects: the production or activation of antibodies, B cells, helper T cells, 5 suppressor T cells, and/or cytotoxic T cells, directed specifically to an antigen or antigens included in the composition or vaccine of interest. Preferably, the host will display either a therapeutic or a protective immunological (memory) response such that resistance to new infection will be enhanced and/or the clinical severity of the disease reduced. Such protection will be demonstrated by either a reduction in number or severity of, or lack of one or more of 10 the symptoms associated with PCV2 infections, in delay of onset of viremia, in a reduced viral persistence, in a reduction of the overall viral load and/or a reduction of viral excretion.

The terms "immunogenic composition" or "vaccine" (both terms are used synonymously) as used herein refers to any pharmaceutical composition containing a PCV2 antigen, which 15 composition can be used to prevent or treat a PCV2 infection-associated disease or condition in a subject. A preferred immunogenic composition can induce, stimulate or enhance the immune response against PCV2. The term thus encompasses both subunit immunogenic compositions, as described below, as well as compositions containing whole killed, or attenuated and/or inactivated PCV2.

20

Thus according to one aspect, the present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more pathogens other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen, wherein 25 the immunogenic composition comprising PCV2 antigen a is subunit immunogenic

composition, a compositions containing whole killed, or attenuated and/or inactivated PCV2. Preferably, said pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2. More preferred, the number of pigs infected with said pathogens other than circovirus, is reduced with regard to one or more of
5 said pathogens for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group.

10 The term "subunit immunogenic composition" as used herein refers to a composition containing at least one immunogenic polypeptide or antigen, but not all antigens, derived from or homologous to an antigen from PCV2. Such a composition is substantially free of intact PCV2. Thus, a "subunit immunogenic composition" is prepared from at least partially purified or fractionated (preferably substantially purified) immunogenic polypeptides from
15 PCV2, or recombinant analogs thereof. A subunit immunogenic composition can comprise the subunit antigen or antigens of interest substantially free of other antigens or polypeptides from PCV2, or in fractionated from. A preferred immunogenic subunit composition comprises the PCV2 ORF-2 protein as described below. Most preferred are immunogenic subunit compositions, which comprise any of the PCV2 antigens provided in WO06/072065,
20 which are all incorporated herein by reference in their entirety.

According to further aspect, the immunogenic composition as used herein most preferably comprises the polypeptide, or a fragment thereof, expressed by ORF-2 of PCV2. PCV2 ORF-2 DNA and protein, used herein for the preparation of the compositions and within the
25 processes provided herein is a highly conserved domain within PCV2 isolates and thereby,

- 15 -

any PCV2 ORF-2 would be effective as the source of the PCV2 ORF-2 DNA and/or polypeptide as used herein. A preferred PCV2 ORF-2 protein is that of SEQ ID NO: 11 of WO06/072065. A further preferred PCV ORF-2 polypeptide is provided as SEQ ID NO: 5 of WO06/072065. However, it is understood by those of skill in the art that this sequence could vary by as much as 6-10% in sequence homology and still retain the antigenic characteristics that render it useful in immunogenic compositions. The antigenic characteristics of an immunological composition can be, for example, estimated by the challenge experiment as provided by Example 4 of WO06/072065. Moreover, the antigenic characteristic of a modified antigen is still retained, when the modified antigen confers at least 70%, preferably 80%, more preferably 90% of the protective immunity as compared to the PCV2 ORF-2 protein, encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 as provided in WO06/072065.

Thus according to one aspect, the present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by pathogens other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen, wherein the PCV2 antigen is an antigen PCV2 ORF-2 protein that has at least 70%, preferably, 80% even more preferably 90% of the protective immunity as compared to the PCV2 ORF-2 protein, encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 as provided in WO06/072065. Preferably said PCV2 ORF-2 have the sequence of SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 5 of WO06/072065. Preferably, said pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2. More preferred, the number of pigs infected with said pathogens other than circovirus, is reduced for more than 40%, preferable for more than 50%, more preferred for more than 60%, even

- 16 -

more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group.

In some forms, immunogenic portions of PCV2 ORF-2 protein are used as the antigenic
5 component in the immunogenic composition, comprising PCV2 antigen. The term
"immunogenic portion" as used herein refers to truncated and/or substituted forms, or
fragments of PCV2 ORF-2 protein and/or polynucleotide, respectively. Preferably, such
truncated and/or substituted forms, or fragments will comprise at least 6 contiguous amino
acids from the full-length ORF-2 polypeptide. More preferably, the truncated or substituted
10 forms, or fragments will have at least 10, more preferably at least 15, and still more preferably
at least 19 contiguous amino acids from the full-length PCV ORF-2 polypeptide. Two
preferred sequences in this respect are provided as SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO:10 of
WO06/072065. It is further understood that such sequences may be a part of larger fragments
or truncated forms.

15

As mentioned above, a further preferred PCV2 ORF-2 polypeptide is any one encoded by the
nucleotide sequences of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4. However, it is understood by those
of skill in the art that this sequence could vary by as much as 6-20% in sequence homology
and still retain the antigenic characteristics that render it useful in immunogenic compositions.

20

In some forms, a truncated or substituted form, or fragment of this PVC2 ORF-2 polypeptide
is used as the antigenic component in the composition. Preferably, such truncated or
substituted forms, or fragments will comprise at least 18 contiguous nucleotides from the full-
length PCV2 ORF-2 nucleotide sequence, e.g. of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4. More
preferably, the truncated or substituted forms, or fragments, will have at least 30, more

preferably at least 45, and still more preferably at least 57 contiguous nucleotides of the full-length PCV2 ORF-2 nucleotide sequence, e.g. SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4.

“Sequence Identity” as it is known in the art refers to a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, namely a reference sequence and a given sequence to be compared with the reference sequence. Sequence identity is determined by comparing the given sequence to the reference sequence after the sequences have been optimally aligned to produce the highest degree of sequence similarity, as determined by the match between strings of such sequences. Upon such alignment, sequence identity is ascertained on a position-by-position basis, e.g., the sequences are “identical” at a particular position if at that position, the nucleotides or amino acid residues are identical. The total number of such position identities is then divided by the total number of nucleotides or residues in the reference sequence to give % sequence identity. Sequence identity can be readily calculated by known methods, including but not limited to, those described in Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), the teachings of which are incorporated herein by reference. Preferred methods to determine the sequence identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine sequence identity are codified in publicly available computer programs which determine sequence identity between given sequences. Examples of such programs include, but are not limited to, the GCG program

package (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN and FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). The BLASTX program is publicly available from NCBI and other sources (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), the teachings of which are incorporated herein by reference). These programs optimally align sequences using default gap weights in order to produce the highest level of sequence identity between the given and reference sequences. As an illustration, by a polynucleotide having a nucleotide sequence having at least, for example, 85%, preferably 90%, even more preferably 95% "sequence identity" to a reference nucleotide sequence, it is intended that the nucleotide sequence of the given polynucleotide is identical to the reference sequence except that the given polynucleotide sequence may include up to 15, preferably up to 10, even more preferably up to 5 point mutations per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence. In other words, in a polynucleotide having a nucleotide sequence having at least 85%, preferably 90%, even more preferably 95% identity relative to the reference nucleotide sequence, up to 15%, preferably 10%, even more preferably 5% of the nucleotides in the reference sequence may be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to 15%, preferably 10%, even more preferably 5% of the total nucleotides in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. These mutations of the reference sequence may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. Analogously, by a polypeptide having a given amino acid sequence having at least, for example, 85%, preferably 90%, even more preferably 95% sequence identity to a reference amino acid sequence, it is intended that the given amino acid sequence of the polypeptide is identical to the reference sequence except that the given

41

polypeptide sequence may include up to 15, preferably up to 10, even more preferably up to 5 amino acid alterations per each 100 amino acids of the reference amino acid sequence. In other words, to obtain a given polypeptide sequence having at least 85%, preferably 90%, even more preferably 95% sequence identity with a reference amino acid sequence, up to 5 15%, preferably up to 10%, even more preferably up to 5% of the amino acid residues in the reference sequence may be deleted or substituted with another amino acid, or a number of amino acids up to 15%, preferably up to 10%, even more preferably up to 5% of the total number of amino acid residues in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. These alterations of the reference sequence may occur at the amino or the carboxy 10 terminal positions of the reference amino acid sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among residues in the reference sequence or in the one or more contiguous groups within the reference sequence. Preferably, residue positions which are not identical differ by conservative amino acid substitutions. However, conservative substitutions are not included as a match when determining sequence identity.

15 "Sequence homology", as used herein, refers to a method of determining the relatedness of two sequences. To determine sequence homology, two or more sequences are optimally aligned, and gaps are introduced if necessary. However, in contrast to "sequence identity", conservative amino acid substitutions are counted as a match when determining sequence 20 homology. In other words, to obtain a polypeptide or polynucleotide having 95% sequence homology with a reference sequence, 85%, preferably 90%, even more preferably 95% of the amino acid residues or nucleotides in the reference sequence must match or comprise a conservative substitution with another amino acid or nucleotide, or a number of amino acids or nucleotides up to 15%, preferably up to 10%, even more preferably up to 5% of the total 25 amino acid residues or nucleotides, not including conservative substitutions, in the reference

sequence may be inserted into the reference sequence. Preferably the homolog sequence comprises at least a stretch of 50, even more preferably at least 100, even more preferably at least 250, and even more preferably at least 500 nucleotides.

5 A "conservative substitution" refers to the substitution of an amino acid residue or nucleotide with another amino acid residue or nucleotide having similar characteristics or properties including size, hydrophobicity, etc., such that the overall functionality does not change significantly.

10 "Isolated" means altered "by the hand of man" from its natural state, i.e., if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or polypeptide naturally present in a living organism is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein.

15

Thus according to one aspect, the present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more pathogens other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen, wherein
20 said PCV2 ORF-2 protein is anyone of those, described above. Preferably, said PCV2 ORF-2 protein is

- i) a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 or SEQ ID NO: 11 of WO06/07065;
- ii) any polypeptide that is at least 80% homologous to the polypeptide of i),
- 25 iii) any immunogenic portion of the polypeptides of i) and/or ii)

- 21 -

- iv) the immunogenic portion of iii), comprising at least 10 contiguous amino acids included in the sequences of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 or SEQ ID NO: 11 of WO06/072065,
- 5 v) a polypeptide that is encoded by a DNA comprising the sequence of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4 of WO06/072065.
- vi) any polypeptide that is encoded by a polynucleotide that is at least 80% homologous to the polynucleotide of v),
- vii) any immunogenic portion of the polypeptides encoded by the polynucleotide of v) and/or vi)
- 10 viii) the immunogenic portion of vii), wherein polynucleotide coding for said immunogenic portion comprises at least 30 contiguous nucleotides included in the sequences of SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4 of WO06/072065.

Preferably any of those immunogenic portions have the immunogenic characteristics of PCV2

15 ORF-2 protein that is encoded by the sequence of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4 of WO06/07065.

Preferably, said infected pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2. More preferred, the number of pigs

20 infected with said pathogens other than circovirus, is reduced with regard to one or more of said pathogen for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group.

44

- 22 -

According to a further aspect, PCV2 ORF-2 protein is provided in the immunogenic composition at an antigen inclusion level effective for the treatment of animals sub-clinically infected with PCV2. Preferably, the PCV2 ORF-2 protein inclusion level is at least 0.2 μg antigen / ml of the final immunogenic composition ($\mu\text{g}/\text{ml}$), more preferably from about 0.2 to
5 about 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 0.3 to about 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, even more preferably from about 0.35 to about 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 0.4 to about 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 0.45 to about 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 0.6 to about 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, even more preferably from about 0.75 to about 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, even more preferably from about 1.0 to about 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 1.3 to
10 about 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, even more preferably from about 1.4 to about 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, even more preferably from about 1.5 to about 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and most preferably about 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

According to a further aspect, the PCV ORF-2 antigen inclusion level is at least 0.2 μg / PCV2 ORF-2 protein as described above per dose of the final antigenic composition ($\mu\text{g}/\text{dose}$), more
15 preferably from about 0.2 to about 400 $\mu\text{g}/\text{dose}$, still more preferably from about 0.3 to about 200 $\mu\text{g}/\text{dose}$, even more preferably from about 0.35 to about 100 $\mu\text{g}/\text{dose}$, still more preferably from about 0.4 to about 50 $\mu\text{g}/\text{dose}$, still more preferably from about 0.45 to about 30 $\mu\text{g}/\text{dose}$, still more preferably from about 0.6 to about 15 $\mu\text{g}/\text{dose}$, even more preferably from about 0.75 to about 8 $\mu\text{g}/\text{dose}$, even more preferably from about 1.0 to about 6 $\mu\text{g}/\text{dose}$,
20 still more preferably from about 1.3 to about 3.0 $\mu\text{g}/\text{dose}$, even more preferably from about 1.4 to about 2.5 $\mu\text{g}/\text{dose}$, even more preferably from about 1.5 to about 2.0 $\mu\text{g}/\text{dose}$, and most preferably about 1.6 $\mu\text{g}/\text{dose}$.

The PCV2 ORF-2 polypeptide used in the immunogenic composition in accordance with the
25 present invention can be derived in any fashion including isolation and purification of PCV2

ORF2, standard protein synthesis, and recombinant methodology. Preferred methods for obtaining PCV2 ORF-2 polypeptide are provided in WO06/072065, the teachings and content of which are hereby incorporated by reference in its entirety. Briefly, susceptible cells are infected with a recombinant viral vector containing PCV2 ORF-2 DNA coding sequences, PCV2 ORF-2 polypeptide is expressed by the recombinant virus, and the expressed PCV2 ORF-2 polypeptide is recovered from the supernatant by filtration and inactivated by any conventional method, preferably using binary ethylenimine, which is then neutralized to stop the inactivation process.

- 10 The immunogenic composition as used herein also refers to a composition that comprises i) any of the PCV2 ORF-2 protein described above, preferably in concentrations described above, and ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF-2 protein, preferably of a recombinant baculovirus. Moreover, the immunogenic composition can comprise i) any of the PCV2 ORF-2 proteins described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF-2 protein, preferably of a recombinant baculovirus, and iii) a portion of the cell culture supernatant.

Thus according to one aspect, the present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more pathogens other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen, wherein the PCV2 antigen is recombinant PCV2 ORF-2, preferably a baculovirus expressed PCV2 ORF-2. Preferably those recombinant or baculovirus expressed PCV2 ORF-2 having the sequence as described above.

- 24 -

The immunogenic composition as used herein also refers to a composition that comprises i) any of the PCV2 ORF-2 proteins described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF-2 protein, preferably of a recombinant baculovirus, and iii) a portion of the cell culture; wherein about
5 90% of the components have a size smaller than 1 μ m.

The immunogenic composition as used herein also refers to a composition that comprises i) any of the PCV2 ORF-2 proteins described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF-2 protein, iii) a
10 portion of the cell culture, iv) and inactivating agent to inactivate the recombinant viral vector preferably BEI, wherein about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 μ m. Preferably, BEI is present in concentrations effective to inactivate the baculovirus, preferably in an amount of 2 to about 8 mM BEI, preferably of about 5 mM BEI.

15 The immunogenic composition as used herein also refers to a composition that comprises i) any of the PCV2 ORF-2 proteins described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF-2 protein, iii) a portion of the cell culture, iv) an inactivating agent to inactivate the recombinant viral vector preferably BEI, and v) a neutralization agent to stop the inactivation mediated by the
20 inactivating agent, wherein about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 μ m. Preferably, if the inactivating agent is BEI, said composition comprises sodium thiosulfate in equivalent amounts to BEI.

The polypeptide is incorporated into a composition that can be administered to an animal
25 susceptible to PCV2 infection. In preferred forms, the composition may also include

additional components known to those of skill in the art (see also Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18th ed. Mack Publ., Easton). Additionally, the composition may include one or more veterinary-acceptable carriers. As used herein, "a veterinary-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, 5 diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like. In a preferred embodiment, the immunogenic composition comprises PCV2 ORF-2 protein as provided herewith, preferably in concentrations described above, which is mixed with an adjuvant, preferably Carbopol, and physiological saline.

10 Those of skill in the art will understand that the composition used herein may incorporate known injectable, physiologically acceptable sterile solutions. For preparing a ready-to-use solution for parenteral injection or infusion, aqueous isotonic solutions, such as e.g. saline or corresponding plasma protein solutions, are readily available. In addition, the immunogenic and vaccine compositions of the present invention can include diluents, isotonic agents, 15 stabilizers, or adjuvants. Diluents can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others. Stabilizers include albumin and alkali salts of ethylenediaminetetraacetic acid, among others.

20 "Adjuvants" as used herein, can include aluminium hydroxide and aluminium phosphate, saponins e.g., Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), water-in-oil emulsion, oil-in-water emulsion, water-in-oil-in-water emulsion. The emulsion can be based in particular on light liquid paraffin oil (European Pharmacopea type); isoprenoid oil such as squalane or squalene oil resulting from 25 the oligomerization of alkenes, in particular of isobutene or decene; esters of acids or of

alcohols containing a linear alkyl group, more particularly plant oils, ethyl oleate, propylene glycol di-(caprylate/caprate), glyceryl tri-(caprylate/caprate) or propylene glycol dioleate; esters of branched fatty acids or alcohols, in particular isostearic acid esters. The oil is used in combination with emulsifiers to form the emulsion. The emulsifiers are preferably

5 nonionic surfactants, in particular esters of sorbitan, of mannide (e.g. anhydromannitol oleate), of glycol, of polyglycerol, of propylene glycol and of oleic, isostearic, ricinoleic or hydroxystearic acid, which are optionally ethoxylated, and polyoxypropylene-polyoxyethylene copolymer blocks, in particular the Pluronic products, especially L121. See Hunter et al., The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.).

10 JohnWiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) and Todd et al., Vaccine 15:564-570 (1997).

For example, it is possible to use the SPT emulsion described on page 147 of "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" edited by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, and the emulsion MF59 described on page 183 of this same book.

15

A further instance of an adjuvant is a compound chosen from the polymers of acrylic or methacrylic acid and the copolymers of maleic anhydride and alkenyl derivative. Advantageous adjuvant compounds are the polymers of acrylic or methacrylic acid which are cross-linked, especially with polyalkenyl ethers of sugars or polyalcohols. These compounds

20 are known by the term carbomer (Phameuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Persons skilled in the art can also refer to U. S. Patent No. 2,909,462 which describes such acrylic polymers cross-linked with a polyhydroxylated compound having at least 3 hydroxyl groups, preferably not more than 8, the hydrogen atoms of at least three hydroxyls being replaced by unsaturated aliphatic radicals having at least 2 carbon atoms. The preferred radicals are those containing

25 from 2 to 4 carbon atoms, e.g. vinyls, allyls and other ethylenically unsaturated groups. The

49

unsaturated radicals may themselves contain other substituents, such as methyl. The products sold under the name Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, USA) are particularly appropriate. They are cross-linked with an allyl sucrose or with allyl pentaerythritol. Among them, there may be mentioned Carbopol 974P, 934P and 971P. Most preferred is the use of Carbopol, in particular the use of Carbopol 971P, preferably in amounts of about 500 µg to about 5 mg per dose, even more preferred in an amount of about 750 µg to about 2.5 mg per dose and most preferred in an amount of about 1 mg per dose.

Further suitable adjuvants include, but are not limited to, the RIBI adjuvant system (Ribi Inc.), Block co-polymer (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monophosphoryl lipid A, Avridine lipid-amine adjuvant, heat-labile enterotoxin from E. coli (recombinant or otherwise), cholera toxin, IMS 1314, or muramyl dipeptide among many others.

Preferably, the adjuvant is added in an amount of about 100 µg to about 10 mg per dose. Even more preferably, the adjuvant is added in an amount of about 100 µg to about 10 mg per dose. Even more preferably, the adjuvant is added in an amount of about 500 µg to about 5 mg per dose. Even more preferably, the adjuvant is added in an amount of about 750 µg to about 2.5 mg per dose. Most preferably, the adjuvant is added in an amount of about 1 mg per dose.

Additionally, the composition can include one or more pharmaceutical-acceptable carriers. As used herein, "a pharmaceutical-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, stabilizing agents, diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like. Most preferably,

50

- 28 -

the composition provided herewith, contains PCV2 ORF-2 protein recovered from the supernatant of in vitro cultured cells, wherein said cells were infected with a recombinant viral vector containing PCV2 ORF-2 DNA and expressing PCV2 ORF-2 protein, and wherein said cell culture was treated with about 2 to about 8 mM BEI, preferably with about 5 mM
5 BEI to inactivate the viral vector, and an equivalent concentration of a neutralization agent, preferably sodium thiosulfate solution to a final concentration of about 2 to about 8 mM, preferably of about 5 mM.

According to a further embodiment, the present invention also relates to the use of PCV2
10 antigen for the preparation of a immunogenic composition for the reduction of concomitant infections caused by one or more pathogens other than PCV-2 in pigs or a herd of pigs, wherein said immunogenic composition comprises i) any of the PCV2 ORF-2 proteins described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF-2 protein, iii) a portion of the cell culture, iv) an
15 inactivating agent to inactivate the recombinant viral vector preferably BEI, and v) an neutralization agent to stop the inactivation mediated by the inactivating agent, preferably sodium thiosulfate in equivalent amounts to BEI; and vi) a suitable adjuvant, preferably Carbopol 971 in amounts described above; wherein about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 μ m. Preferably, said pigs are co-infected with PCV2 as defined
20 above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2. More preferred, the number of pigs infected with said pathogens other than circovirus, is reduced with regard to one or more of said pathogen for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred

for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group.

According to a further aspect, this immunogenic composition further comprises a
5 pharmaceutical acceptable salt, preferably a phosphate salt in physiologically acceptable concentrations. Preferably, the pH of said immunogenic composition is adjusted to a physiological pH, meaning between about 6.5 and 7.5.

The immunogenic composition as used herein also refers to a composition that comprises per
10 one ml i) at least 1.6 µg of PCV2 ORF-2 protein described above, ii) at least a portion of baculovirus expressing said PCV2 ORF-2 protein iii) a portion of the cell culture, iv) about 2 to 8 mM BEI, v) sodium thiosulfate in equivalent amounts to BEI; and vi) about 1 mg Carbopol 971, and vii) phosphate salt in a physiologically acceptable concentration; wherein
15 about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 µm and the pH of said immunogenic composition is adjusted to about 6.5 to 7.5.

The immunogenic compositions can further include one or more other immuno-modulatory agents such as, e.g., interleukins, interferons, or other cytokines. The immunogenic compositions can also include Gentamicin and Merthiolate. While the amounts and
20 concentrations of adjuvants and additives useful in the context of the present invention can readily be determined by the skilled artisan, the present invention contemplates compositions comprising from about 50 µg to about 2000 µg of adjuvant and preferably about 250 µg/ ml dose of the vaccine composition. Thus, the immunogenic composition as used herein also refers to a composition that comprises from about 1 µg/ml to about 60 µg/ml of antibiotics,
25 and more preferably less than about 30 µg/ml of antibiotics.

52

The immunogenic composition as used herein also refers to a composition that comprises i) any of the PCV2 ORF-2 proteins described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF-2 protein, iii) a
5 portion of the cell culture, iv) an inactivating agent to inactivate the recombinant viral vector preferably BEI, and v) an neutralization agent to stop the inactivation mediated by the inactivating agent, preferably sodium thiosulfate in equivalent amounts to BEI; vi) a suitable adjuvant, preferably Carbopol 971 in amounts described above; vii) a pharmaceutical acceptable concentration of a saline buffer, preferably of a phosphate salt, and viii) an anti-
10 microbiological active agent; wherein about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 μ m.

The immunogenic composition as used herein also refers to Ingelvac® CircoFLEX™, (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, MO, USA), CircoVac® (Merial SAS, Lyon,
15 France), CircoVent (Intervet Inc., Millsboro, DE, USA), or Suvaxyn PCV-2 One Dose® (Fort Dodge Animal Health, Kansas City, KA, USA). Thus according to another aspect, the present invention relates to a method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more pathogens other than PCV2 comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic
20 composition comprising PCV2 antigen, wherein said immunogenic composition comprising a PCV2 antigen is Ingelvac® CircoFLEX™, CircoVac®, CircoVent and/or Suvaxyn PCV-2 One Dose®, preferably it is Ingelvac® CircoFLEX™. Preferably, said infected pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2. More preferred, the number of pigs infected with said pathogens other
25 than circovirus, is reduced with regard to one or more of said pathogen for more than 10%,

preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group.

5

The term "an effective amount of PCV2 antigen" as used herein means but is not limited to an amount of PCV2 antigen, that elicits or is able to elicit an immune response in an animal, to which said effective amount of PCV2 antigen is administered.

- 10 The amount that is effective depends on the ingredients of the vaccine and the schedule of administration. Typically, when an inactivated virus or a modified live virus preparation is used in the combination vaccine, an amount of the vaccine containing about $10^{2.0}$ to about $10^{9.0}$ TCID₅₀ per dose, preferably about $10^{3.0}$ to about $10^{8.0}$ TCID₅₀ per dose, more preferably, about $10^{4.0}$ to about $10^{8.0}$ TCID₅₀ per dose. In particular, when modified live PCV2 is used in
- 15 the vaccines, the recommended dose to be administered to the susceptible animal is preferably about $10^{3.0}$ TCID₅₀ (tissue culture infective dose 50% end point)/dose to about $10^{6.0}$ TCID₅₀/dose and more preferably about $10^{4.0}$ TCID₅₀/dose to about $10^{5.0}$ TCID₅₀/dose. In general, the quantity of antigen will be between 0.2 and 5000 micrograms, and between $10^{2.0}$ and $10^{9.0}$ TCID₅₀, preferably between $10^{3.0}$ and $10^{6.0}$ TCID₅₀, more preferably between $10^{4.0}$
- 20 and $10^{5.0}$ TCID₅₀, when purified antigen is used.

Sub-unit vaccines are normally administered with an antigen inclusion level of at least 0.2 µg antigen per dose, preferably with about 0.2 to about 400 µg/dose, still more preferably with about 0.3 to about 200 µg/dose, even more preferably with about 0.35 to about 100 µg/dose,

25 still more preferably with about 0.4 to about 50 µg/dose, still more preferably with about 0.45

to about 30 µg/dose, still more preferably with about 0.6 to about 16 µg/dose, even more preferably with about 0.75 to about 8 µg/dose, even more preferably with about 1.0 to about 6 µg/dose, still more preferably with about 1.3 to about 3.0 µg/dose.

- 5 The administration of PCV2 antigen to pigs does not only result in the reduction the percentage of concomitant infections caused by pathogens other than circovirus, in particular other than PCV2, but also to a general improvement of health, particularly to the resistance against such concomitant infections. Thus, according to another aspect, the present invention also relates to a method for improving the resistance of pigs against one or more concomitant
- 10 infections with pathogens other than PCV2, comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen. Preferably, said pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2.
- 15 The term "improving the resistance of pigs against concomitant infections" as used herein refers but is not limited to a process wherein the number of pigs infected with a pathogen other than circovirus, is reduced with regard to said pathogen for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even
- 20 more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group. Thus, according to another aspect, the present invention also relates to a method for improving the resistance of pigs against concomitant infections with one or more pathogens other than PCV2, comprising the step administering to said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2
- 25 antigen, wherein the number of pigs infected with one or more of said pathogens other than

circovirus, is reduced with regard to one or more of said pathogens for more than 10%, preferably for more than 20%, more preferred for more than 30%, even more preferred for more than 40%, even more preferred for more than 50%, even more preferred for more than 60% , even more preferred for more than 80% even more preferred for more than 100% as compared to a non-vaccinated control group. Preferably, said pigs are co-infected with PCV2 as defined above, exposed to PCV2, or endangered or susceptible to get infected with PCV2.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The following examples set forth preferred materials and procedures in accordance with the present invention. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described. It is to be understood, however, that these examples are provided by way of illustration only, and nothing therein should be deemed a limitation upon the overall scope of the invention.

EXAMPLE 1

Detection of concomitant infections in PCV-2 infected animals

Study population

The study was conducted in the Southern part of Germany. Hybrid pigs of commercial cross breeds (Landrace or Edelschwein (f) x Pietrain (m)) were obtained from 15 different breeding farms being part of a "pig-producer community". The breeding farms differed in size (50 to 300 sows), management and health status. Routine preventive measures of the piglets on all breeding farms included iron injection, tooth and tail cutting and castration.

- 34 -

Following weaning at the age of approximately 4 weeks piglets of the different breeding farms were transferred to a nursery farm with an all-in-all-out production system. They were housed commingled in three barns with pens designed to hold 60 to 120 pigs per pen. Routine preventive measures at the nursery site included prophylactic treatment with tetracyclínhydrochlorid for the first ten days after arrival. Four changes of food composition were performed during nursery. The feed provided to the animals was self-prepared based on barely and minderals. At the age of approximately 12 weeks pigs were transferred to a fattening farm with an all-in-all-out production system. They were newly commingled and housed in two stables with pens designed to hold 10 to 30 pigs per pen. Three changes of food composition were performed during fattening. The feed provided was self-prepared based on barely, wheat, corn, and whey concentrate. Pigs remained at the fattening farm for 13 to 18 weeks.

Disease history

The disease pattern of PMWS had become clinically apparent approximately three years prior to study initiation in November 2002 and was serologically confirmed in December 2002. At the end of nursery / beginning of fattening animals started to show typical signs of PMWS such as wasting, respiratory signs and a marked increase in the mortality rate. The disease was complicated by co-infections with PRRSV. Mortality rate during nursery (4-12 weeks of age) usually ranged between 3.5 and 4.8 % but peak levels of up to 10 % mortality were also occasionally reported. During the middle to late phase of fattening respiratory signs and growth retardation were predominating in PCV2 infected animals. Mortality rate during fattening (12-26 week old pigs) was approximately 1.7-2.4 % and the number of culls was 1%. Average daily weight gain was only moderate (719-731 g/day). Three months before study initiation, the diagnosis of PMWS was verified on the

basis of clinical signs and PCV2 viraemia that both occurred when animals were approximately 9 to 13 weeks old. PRRSV and *Mycoplasma hyorhinis* were identified in lung lavage samples of PCV2 infected animals as coinfecting pathogens.

5 Test articles

For active vaccination against PCV2, an inactivated subunit vaccine (Ingelvac® CircoFLEX™, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH) was administered. The vaccine contained the ORF2 capsid protein of PCV2 as active component and carbomer as adjuvant. The ORF2 sequence was derived from a North American PCV2 isolate that was isolated from tonsil and liver samples of two pigs with signs of PMWS. The ORF2 sequence was subsequently inserted into a baculovirus expression system using an insect cell line derived from ovaries of the armyworm *Sodoptera frugiperda* (SF+ cells) as host. As control article served a placebo containing PCV2 capsid protein-free cell culture supernatant and carbomer as adjuvant.

15

Experimental design

The field trial was performed according to the principles of "Good Clinical Practice" (GCP) and followed a randomized, negative-controlled, double-blinded, parallel study design. A total of 1519 healthy piglets were equally distributed among two treatment groups with regard to initial body weight and litter assignment. One week before weaning, one group of piglets (n=754) was vaccinated with Ingelvac® CircoFLEX™ and the other group (n=765) received a placebo. The test articles were administered as a single 1 ml dose intramuscularly in the right neck region when piglets were 25.4 ± 3.18 days (mean $\pm$ S.D.) old. After weaning pigs of both treatment groups were kept in mixed groups until the end of finishing in order to maximise the uniform exposure to pathogens.

25

Polymerase chain reactions

Polymerase chain reaction assays were used as described in order to detect specific nucleic acids for PRRSV (Mardassi H, et al., J Clin Microbiol 1994;32(9):2197-203),
5 *Mycoplasma hyorhinis* (Caron J., et al., J Clin Microbiol 2000;38(4):1390-6), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Calsamiglia M, et al., J Vet Diagn Invest 1999 May;11(3):246-51),
Streptococcus suis (Wisselink HJ, et al., J Clin Microbiol 2002 Aug;40(8):2922-9),
Pasteurella multocida (Townsend KM, et al., J Clin Microbiol 1998 Apr;36(4):1096-100),
Actinobacillus pleuropneumoniae (Schaller A, et al., Apx toxins in Pasteurellaceae
10 species from animals. Vet Microbiol 2000 Jun 12;74(4):365-76), *Bordetella bronchiseptica* (Hozbor D, et al., Res Microbiol 1999 Jun;150(5):333-41) and
Haemophilus parasuis (Calsamiglia M, et al., J Vet Diagn Invest 1999 Mar;11(2):140-5)
in lung tissue samples.

For quantification of the PCV2 viral load in serum, PCV2 genome equivalents was/is
15 quantified according to the method described in Brunborg et al., 2004; J. Virol Methods
122: 171-178. For amplification of PCV2, primers PCV2-84-1265U21 and PCV2-84-
1319L21 were/are used. The cut-off level for a positive sample was set as 10^4 template
copies per ml serum based on validation experiments. All PCV2 DNA quantification
assays were performed by bioScreen GmbH, Münster, Germany.

Results

PCV2 viraemia

It was investigated whether the onset and severity of the observed PMWS characteristic
clinical signs and lesions were related to the onset of PCV2 viraemia in the blood of pre-
25 selected "sample animals". As illustrated in Figure 1, the onset of PCV2 viraemia started

in the placebo-treated group when animals were approximately 9-10 weeks old. Peak levels with up to 85% PCV2 positive animals were reached when animals were approximately 11 to 14 weeks old. From 14 weeks of age until the end of fattening, the proportion of PCV2 viraemic animals was decreasing without however reaching baseline levels again. In the average the individual duration of viraemia lasted for 56 days (data not shown).

Compared to the placebo-treated group the proportion of PCV2 positive animals in the vaccinated group was significantly reduced ($p < 0.0001$) with no more than 35% of positive animals at the peak of viraemia (Figure 1B). The average duration of viraemia in vaccinated animals was reduced by 31 days ($p < 0.0001$; data not shown).

Another focus was placed on the examination of the viral load in animals. In this study viral loads of clinical relevance ($> 10^6$ gE/ml of serum) were mainly observed in placebo-treated animals in the early phase of viraemia when animals were approximately 10-15 weeks old (Figure 1A). At the age of 11 weeks the proportion of animals with clinical relevant viral loads (40%) was higher than the proportion of animals with subclinical relevant viral loads (37%). This ratio was drastically changing at the late phase of viraemia (17-25 weeks of age) due to a significant reduction of infections with clinical relevance. In vaccinated animals that were positive for PCV2, subclinical infections were predominating at all analyzed time points (Figure 1B).

In summary, the PCV2 profile on the selected study sites during the time of the study were characterized as follows: a) an onset of PCV2 viraemia at study week 9-10 that coincided with the onset of clinical signs and lesions of PMWS, b) a high viral load in placebo-treated animals at the early phase of PCV2 viraemia, c) a significant reduction in the duration of viraemia and in the percentage of animals with clinical and sub-clinical relevant viral loads in vaccinated animals compared to placebo-treated animals.

Presence of concomitant infections in placebo-treated animals

The results obtained so far confirm the diagnosis of PMWS within the analyzed study population and indicate that vaccination against PCV2 can considerably protect animals from PMWS. This placebo-controlled immunization experiment therefore allowed the testing of the hypothesis that PMWS causes an underlying immunosuppression in animals. It was speculated that in the case of a PCV2 associated immunodeficiency the frequency of co-infections after the onset of PCV2 viraemia would be higher in placebo-treated animals than in the vaccinated animals. In a first step the exposure of the study animals to opportunistic organisms was therefore analyzed in more detail. Since monitoring of clinical signs had shown that animals were predominately affected from respiratory signs it was decided to select lung samples of dead animals for a respective pathogen screening by PCR. In Table 3 results are presented for placebo-treated animals only, since they are considered to reflect most closely natural field conditions.

Before onset of PCV2 viraemia (3-8 weeks of age) the only pathogen that was detected in 2 out of 5 lung samples of placebo-treated animals was *Streptococcus suis*. At onset of PCV2 viraemia (9-10 weeks of age), 1 out of 8 lung samples of placebo-treated animals was found positive for PCV2 while 4 out of 8 analyzed lung samples were tested positive for PRRSV. Other pathogens detected in low numbers either alone or in combination with these two pathogens were *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Streptococcus suis*. The highest amount of co-infecting pathogens was detected in lung samples of placebo-treated animals during the acute phase of PCV2 viraemia (11-16 weeks of age). Among the 17 lung samples tested positive for PCV2, 12 were also found to be positive for PRRSV and 13 for *Mycoplasma hyorhinis*. In addition, co-infections with *Streptococcus suis* or *Pasteurella multocida* were sporadically detected. Finally, at

the late phase of viraemia (17-26 weeks of age) co-infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* were predominating (6 out of 7 PCV2 positive lung samples) but co-infections with *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Streptococcus suis* were also found. For the entire time period after the onset of viraemia (9-26 weeks of life) only 2 out of 22 of lung samples of placebo-treated animals were tested positive for PCV2 alone. In most analyzed lung samples positive for PCV2 combinations of two or three opportunistic organisms were detected. During the course of the study PCV2 infection was thus seen in association with several respiratory concomitant-infections. The onset and peak of PCV2 viraemia coincided with the onsets and peaks of PRRSV and *Mycoplasma hyorhinis* co-infections whereas the late phase of PCV2 viraemia was accompanied by the onset of a *Mycoplasma hyopneumoniae* infection.

Reduction of co-infections by vaccination against PCV2

Comparison of the frequency of respiratory pathogens detected in lung samples revealed no major differences among both treatment groups for the time before onset of PCV2 viraemia (data not shown). After the onset of PCV2 viraemia (10-26 weeks of age) the proportion of lung samples of vaccinated animals which were tested positive for *Mycoplasma hyorhinis* and PRRSV was reduced by 71% (p=0.0293) and 46% (p=0.2847), respectively (Table 1).

Table 1: Study results of B05 BIVI 030

	Placebo		Vaccine		reduction %
	%	(N)	%	(N)	
PCV2	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

Furthermore lung samples from placebo-treated animals were sporadically found to be positive for *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Slight differences in the number of lung samples positive for *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis* or *Pasteurella multocida* were observed in a second study among both treatment groups. As indicated in Table 2 these pathogens were either present at only low frequencies (*Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*) or did appear at the very late phase of PCV2 infection (*Mycoplasma hyopneumoniae*).

In another study (study B05 BIVI 013) a similar resistance to concomitant pathogens was observed in vaccinated animals as presented in Table 2.

Table 2: Study results of B05 BIVI 013

	Placebo		Vaccine		reduction %
	%	(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.

Under the influence of vaccination against PCV-2 the frequency of PCV2 infections as well as the frequency of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyrhinis*, *Pasteurella multocida*, PRRSV, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*. co-infections was thus notably reduced.

- 41 -

In another study a similar resistance to *Mycoplasma hypopneumoniae* was observed in vaccinated animals also.

LITERATUR

- [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 Dec 15;122(2):171-8.
- 10 [3] Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: Diagnosis, Disease and Control: What do we know? 2006 Jul 16-2006 Jul 19; 2006.
- [4] Allan GM, McNeilly F, Ellis J, et al. PMWS: experimental model and co-infections. Vet Microbiol 2004 Feb 4;98(2):165-8.
- [5] Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. Vet J 2004 Jul;168(1):41-9.
- 15 [6] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Vet J 2005 May;169(3):326-36.
- [7] Segales J, Domingo M, Chianini F, et al. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. Vet Microbiol 2004 Feb 4;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 Jan;38(1):31-42.
- [9] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. J Comp Pathol 1999 Jul;121(1):1-11.
- 25 [10] Allan GM, McNeilly F, Ellis J, et al. 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, et al. 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 Sep;38(5):528-39.
- 35 [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 May;37(3):254-63.
- [13] Ostanello F, Caprioli A, Di FA, et al. Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. Vet Microbiol 2005 Jul 1;108(3-4):179-86.

- [14] Rovira A, Balasch M, Segales J, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 2002 Apr;76(7):3232-9.
- 5 [15] Darwich L, Segales J, Mateu E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 2004 May;149(5):857-74.
- [16] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, et al. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* 2002;15(4):567-82.
- 10 [17] Batista L. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrom (PMWS) in Quebec, is it an emerging disease? 2006 Mar 4-2006 Mar 7; 2006.
- [18] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 2003 Nov 7;21(31):4565-75.
- 15 [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 May;11(3):246-51.
- 20 [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 Aug;40(8):2922-9.
- [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 Apr;36(4):1096-100.
- 25 [23] Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Vet Microbiol* 2000 Jun 12;74(4):365-76.
- [24] Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1999 Jun;150(5):333-41.
- 30 [25] Calsamiglia M, Pijoan C, Solano G, Rapp-Gabrielson V. Development of an oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay for detection of *Haemophilus*

- 44 -

CLAIMS

1. Method for reducing the percentage of concomitant infections in pigs or a herd of pigs caused by one or more pathogens other than PCV2 comprising the step administering to
5 said pig(s) an effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2 antigen.
2. The method according to claim 1, characterized in that the concomitant infection is caused by a viral, bacterial and/or fungal pathogen.
10
3. The method according to claim 2, characterized in that the concomitant infection is caused by viral pathogen.
4. The method according to claim 3, characterized in that the concomitant infection is
15 caused by PRRS.
5. The method according to claim 2, characterized in that concomitant infection is caused by a bacterial pathogen.
- 20 6. The method according to claim 2, characterized in that the concomitant infection is caused by an enteric pathogen.
7. The method according to claim 2, characterized in that the concomitant infection is caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma*

- 45 -

hyrhinis, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp.,
Streptococcus suis.

8. The method according to any one of claims 1 to 7, characterized in that the pigs or the
5 herd of pigs are/is infected with PCV2.
9. The method according to any one of claims 1 to 8, characterized in that the percentage
of concomitant infection is reduced with regard to one or more of said infections for
more than 10% as compared to a non-vaccinated control group.
- 10
10. The method according to any one of claims 1 to 9, characterized in that the PCV-2
antigen is killed PCV-2, modified live PCV2 or any immunogenic part thereof.
11. The method according to any one of claims 1 to 10, characterized in that the PCV-2
15 antigen is or comprises PCV2 ORF-2.
12. A method for improving the resistance of pigs against concomitant infections with one
or more pathogens other than PCV2, comprising the step administering to said pig(s) an
effective amount of PCV2 antigen or an immunogenic composition comprising PCV2
20 antigen.
13. The method according to claim 12, characterized in that the concomitant infection is
caused by a viral, bacterial and/or fungal pathogen.

- 46 -

14. The method according to claim 13, characterized in that the concomitant infection is caused by viral pathogen.
15. The method according to claim 14, characterized in that the concomitant infection is caused by PRRS.
16. The method according to claim 13, characterized that concomitant infection is caused by a bacterial pathogen.
- 10 17. The method according to claim 13, characterized that concomitant infection is caused by an enteric pathogen.
18. The method according to claim 13, characterized in that the concomitant infection is caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyrhinis*, *Mycoplasmas hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.
- 15 19. The method according to any one of claims 11 to 16, characterized in that the pigs are infected with PCV2.
- 20 20. The method according to any one of claims 11 to 17, characterized in that the percentage of concomitant infections is reduced with regard to one or more of said infections for more than 10% as compared to a non-vaccinated control group.

69

- 47 -

21. The method according to any one of claims 11 to 18, characterized in that the PCV-2 antigen is killed PCV2, modified live PCV-2 or any immunogenic part thereof.
22. The method according to any one of claims 11 to 19, characterized in that the PCV-2 antigen is or comprises PCV-2 ORF-2.
23. Use of PCV-2 antigen for the preparation of an immunogenic composition for the reduction of concomitant infections caused by one or more pathogens other than PCV-2 in pigs or a herd of pigs.
24. The use according to claim 21, characterized in that the concomitant infection is caused by a viral, bacterial and/or fungal pathogen.
25. The use according to claim 22, characterized in that the concomitant infection is caused by a viral pathogen.
26. The use according to claim 23, characterized in that the concomitant infection is caused by PRRS.
27. The use according to claim 22, characterized that concomitant infection is caused by a bacterial pathogen.
28. The use according to claim 23, characterized in that the concomitant infection is caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyrhinis*,

- 48 -

Mycoplasma hyopneumoniae, Pasteurella multocida, Salmonella spp., Streptococcus suis.

29. The use according to any one of claims 21 to 26, characterized in that the pigs or the
5 herd of pigs are/is infected with PCV-2.
30. The use according to any one of claims 21 to 27, characterized in that the percentage of
the concomitant infection is reduced with regard to one or more of said infections for
more than 10% as compared to a non-vaccinated control group.
- 10 31. The use according to any one of claims 21 to 28, characterized in that the PCV-2 antigen
is killed PCV-2, modified live PCV-2 or any immunogenic part thereof.
32. The use according to any one of claims 21 to 29, characterized in that the PCV-2 antigen
15 is or comprises PCV-2 ORF-2.

31

- 1/1 -

Figure 1A:

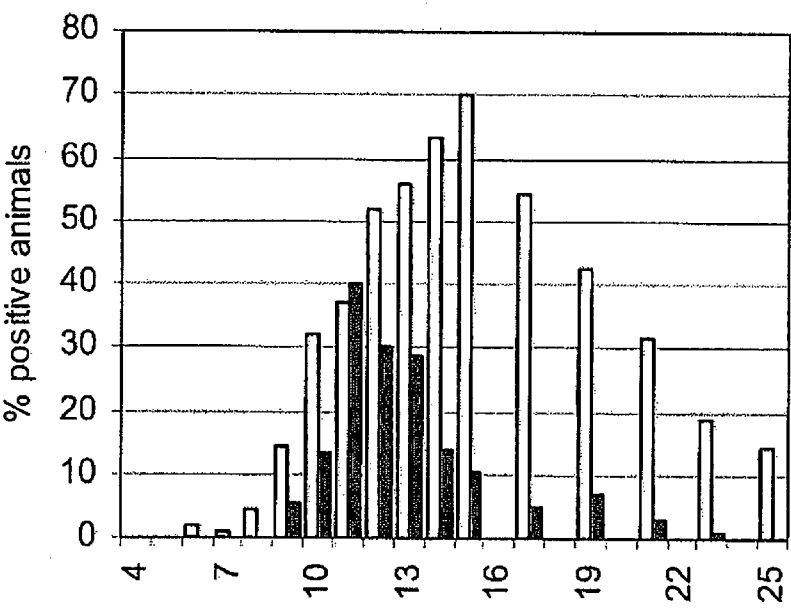
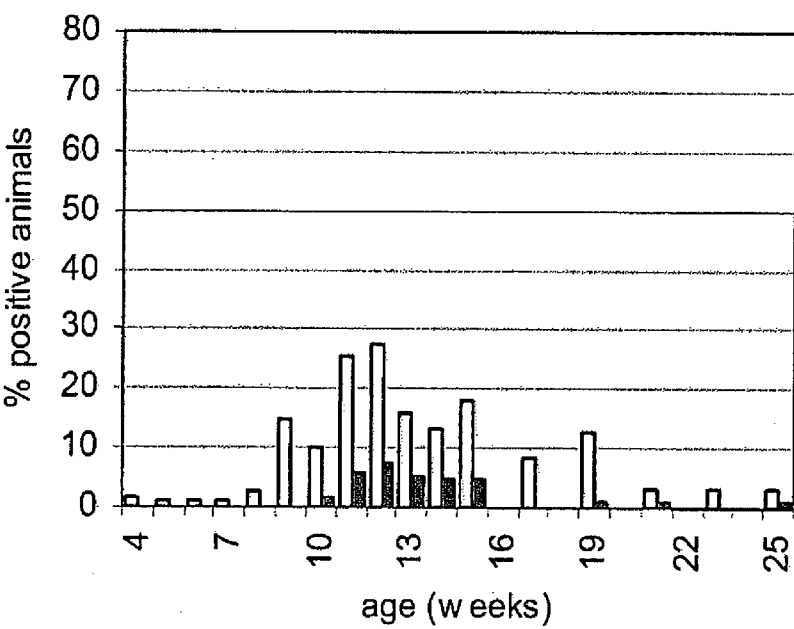


Figure 1B:



SEQUENCE LISTING

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA INC
 <120> REDUCTION OF CONCOMITANT INFECTIONS IN PIGS
 BY THE USE OF PCV2 ANTIGEN

<130> P10-0100

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

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

<220>
 <223> This is a modified Kozak's sequence.

<400> 1
 ccgccatg 8

<210> 2
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> This is a recombinant Eco R1 sequence.

<400> 2
 gaattc 6

<210> 3
 <211> 713
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 3
 cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgcccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcgc tctccgcac cttcggatat actgtggaga 180
 aggaaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccc acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaaatg aat 713

<210> 4
 <211> 713
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 4
 ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgcccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcgc tctccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
 ctaccacagt cacaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300

3

PhoenixTemp31156.tmp.txt
gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtg 360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc ccccacttga accctaagaa ttc 713

<210> 5
<211> 233
<212> PRT
<213> Porcine circovirus

<400> 5

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

<210> 6
<211> 233
<212> PRT
<213> Porcine circovirus

<400> 6

27

PhoenixTemp31156.tmp.txt
Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
65 70 75 80
Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140
Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
180 185 190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
195 200 205
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225 230

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

<220>
<223> This sequence is from porcine circovirus type 2, open reading
frame 2, together with a portion from the pGEM T-easy vector.

<400> 7
gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcgttaccg cagaagaaga 60
caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcccgc gccctggct cgtccacccc 120
cgccaccgct accgttggag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctcccgacc 180
ttcgatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgccct cctgggcggt ggacatgatg 240
agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc 300
tttgaatact acagaataag aaagggttaag gttgaattct ggccctgctc ccccatcacc 360
cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag 420
gccacagccc taacctatga cccatagtga aactactcct cccgccatac aatcccccaa 480
cccttctcct accactcccg ttacttcaca ccaaacctg ttcttgactc cactattgat 540
tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggtgta ggctacaaac ctctagaaat 600
gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat 660
atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagaccc cccacttgaa 720
ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggcgcg 756

PhoenixTemp31156.tmp.txt

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

<220>
<223> This is the porcine circovirus type 2, ORF-2construct, which includes baculovirus and pGEM T-easy coding sequences.

<400> 8
aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catattttagt tgcgtttatg agataagatt 60
gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt 120
ataaaagatt ctaatctgat atgtttttaa acacctttgc ggcccgagtt gtttgcgtac 180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt 240
ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca ttttttgcgg 300
gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata 360
gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccgg catgtttggtg 420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgcag atattttaatg 480
cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac 540
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc 600
tttaacaaat actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaacta 660
tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttccaa tcgacggtag 720
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttacgt ttatgctttt 780
ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgcgg tcgcgcgtca 840
cgcacaacac cggatgtttg cgcttgtccg cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat 900
ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttctgtctt 960
tcttttgcct ggtttcctgg aagccggtgt acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg 1020
tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgtccttgat ggcaacgatg cgttcaataa 1080
actcttggtt ttaacaagt tcctcggttt ttgcccac caccgcttgc agcgcgtttg 1140
tgtgctcggt gaatgtcgca atcagcttag taccacactg tttgctctcc tcctcccggt 1200
gtttgatcgc gggatcgtag ttgcccgtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa 1260
gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc 1320
cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaaatacag cgggtcgcgg cttttcacga 1380
cgctgttaga ggtagggccc ccattttgga tggctgtctc aaataacgat ttgtatttat 1440
tgtctacatg aaacgataa gctttatcac aaactgtata ttttaactg ttagcgacgt 1500
ccttggccac aaccgggacc tgttggctgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat 1560
cttctccaaa tttaaattct ccaattttta cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat 1620
tttgcaacaa ctattgtttt ttaacgcaaa ctaaacttat tgtggtaaag aataattaaa 1680
tatgggggaa catgcgccgc tacaacactc gtcgttatga acgcagacgg cgccgggtctc 1740
ggcgcaagcg gctaaaacgt gttgcgcggt caacgcggca aacatcgcaa agccaatag 1800
tcaggttttg atttgcata taacggcgat tttttaaatt atcttattta ataaatagtt 1860
atgacgccta caactccccg cccgcgttga ctcgctgcac ctcgagcagt tcgttgacgc 1920
cttctccggt gtggccgaac acgtcgagcg ggtggctgat gaccagcggc gtgccgcacg 1980
cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcga aggcacgctg gcctccaagt 2040
ggcaatattg gcaaattcga aaatatatac agttgggttg tttgcgcata tctatcgttg 2100
cgttgggcat gtacgtccga acgttgattt gcatgcaagc cgaaattaaa tcattgcgat 2160
tagtgcgatt aaaacgttgt acatcctcgc ttttaatcat gccgtcgatt aaatcgcgca 2220
atcgagtcaa gtgatcaaag tgtggaataa tgttttcttt gtattcccga gtcaagcgca 2280
gcgcgtatth taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc 2340
aataatatat tatgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gcccgttgtc gcattctaac 2400
acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag ctgacgacg aacgtgcacg 2460
atctgtgcac gcgttccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca 2520
tgaccccggt agtgacaacg atcacgcccc aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt 2580
atgtcgggtg cgttaaaact attagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc 2640
tgggtcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgata acgtgtggag tccgctcatt 2700
agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atcccgatga ttttattgat 2760
aaattgaccc taactccata cacggtattc tacaatggcg gggtttttgt caaaatttcc 2820
ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccgcccacta ttaatgaaat taaaaattcc 2880
aattttaaaa aacgcagcaa gagaaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa 2940
aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg 3000
aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggatatg acaggaagag gtttatacta 3060
aactgtttca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaaagtgt aaaaccgatg tttaatcaag 3120
gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcattcttta 3180
atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaac aaatgaaaac tgtcgacaag 3240
ctctgtccgt ttgttgcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata 3300
aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa 3360
cattttagat attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgctgagg taatatttaa 3420

36

PhoenixTemp31156.tmp.txt

aatcattttc	aaatgattca	cagttaat	gcgacaatat	aattttattt	tcacataaac	3480
tagacgcctt	gtcgtcttct	tcttcgtatt	ccttctcttt	ttcatttttc	tcctcataaa	3540
aattaacata	gttattatcg	tatccatata	tgtatctatc	gtatagagta	aatTTTTTgt	3600
tgtcataaat	atatatgtct	tttttaattg	gggtgtatagt	accgctgcgc	atagtttttc	3660
tgtaattttac	aacagtgcta	ttttctggta	gttcttcgga	gtgtgttgct	tttaattatta	3720
aatTTtatata	atcaatgaat	ttgggatcgt	cggTTTTgt	caatatgttg	ccggcatagt	3780
acgcagcttc	ttctagttca	attacaccat	tttttagcag	caccggatta	acataacttt	3840
ccaaaatggt	gtacgaaccg	ttaaacaaaa	acagttcacc	tcccttttct	atactattgt	3900
ctgcgagcag	ttgtttgttg	ttaaaaataa	cagccattgt	aatgagacgc	acaaactaat	3960
atcacaaact	ggaaatgtct	atcaatatat	agttgctgat	atcatggaga	taattaaaaa	4020
gataaaccatc	tcgcaaataa	ataagtattt	tactgttttc	gtaacagttt	tgtaataaaa	4080
aaacctataa	atattccgga	ttattcatac	cgtcccacca	tcgggCGCGG	atcagatctg	4140
cagCGGCGCG	gggaattcga	tccgccatga	cgtatccaag	gaggCGttac	cgCagaagaa	4200
gacaccgccc	ccgcagccat	cttggccaga	tcctccgCCG	ccgcccctgg	ctcgtccacc	4260
cccGCCaccg	ctaccgttgg	agaaggaaaa	atggcatctt	caacacccgc	ctctcccGca	4320
ccttcggata	tactgtcaag	gctaccacag	tcacaacgcc	ctcctgggCG	gtggacatga	4380
tgagatttaa	tattgacgac	tttgttcccc	cgggaggggg	gaccaacaaa	atctctatac	4440
cctttgaata	ctacagaata	agaaaggTTa	aggTTgaatt	ctggccctgc	tcctcccatca	4500
cccagggTga	taggggagtg	ggctccactg	ctgttattct	agatgataac	tttGtaacaa	4560
aggccacagc	cctaacctat	gacccatatg	taaactactc	ctcccgccat	acaatcccc	4620
aacccttctc	ctaccactcc	cgttacttca	cacccaaacc	tgTtcttgag	tccactattg	4680
attacttcca	accaaataac	aaaagggaatc	agctttggct	gaggctacaa	acctctagaa	4740
atgtggacca	cgtaggcctc	ggcactgcgt	tcgaaaacag	taaatacgac	caggactaca	4800
atatccgtgt	aacctatgat	gtacaattca	gagaatttaa	tcttaaagac	ccccacttg	4860
aaccctaaga	attctatcac	tagtgaattc	gCGGCGCGCG	gccgctccag	aattctagaa	4920
ggtaccCGgg	atccttttct	gggacccgCG	aagaaccaa	aactcactct	cttcaaggaa	4980
atccgtaatg	ttaaacCCga	cacgatgaag	cttgtcgttg	gatggaaagg	aaaagagttc	5040
tacagggaaa	cttggacCCg	cttcatggaa	gacagcttcc	ccattgttaa	cgaccaagaa	5100
gtgatggatg	ttttccttgt	tgtcaacatg	cgtccacta	gaccaaccg	ttgttacaaa	5160
ttcctggccc	aacacgctct	gcgttgcgac	cccgactatg	tacctcatga	cgTgattagg	5220
atcgctgagc	cttcatgggt	gggcagcaac	aacgagtacc	gcatcagcct	ggctaagaag	5280
ggCGGCGGct	gccaataaat	gaaccttcac	tctgagtaca	ccaactcggt	cgaacagttc	5340
atcgatcgTg	tcatctggga	gaacttctac	aagcccatcg	tttacatcgg	taccgactct	5400
gctgaagagg	aggaaattct	ccttgaagtt	tccttggtgt	tcaaagtaaa	ggagtttgca	5460
ccagacgcac	ctctgttcac	tgggtccggCG	tattaaaaca	cgatacattg	ttattagtag	5520
atTTatattaag	cgtagatttc	tgtgcgttgt	tgatttacag	acaattgttg	tacgtatttt	5580
aataattcat	taaatttata	atcTTtaggg	tggtatgtta	gagcgaaaaa	caaatgattt	5640
tcagcgTctt	tatatctgaa	tttaaataat	aaatcctcaa	tagatttgta	aaataggttt	5700
cgattagttt	caaacaaggG	ttgtttttcc	gaaccgatgg	ctggactatc	taatggattt	5760
tcgctcaacg	ccacaaaact	tgccaaatct	tgtagcagca	atctagcttt	gtcgatattc	5820
gTTTgtgttt	tgTTTTgtaa	taaaggTTcg	acgtcgttca	aaatattatg	cgcttttgta	5880
tttctttcat	cactgtcggt	agtgtacaat	tgactcgacg	taaacacggt	aaataaagg	5940
tggacatatt	taacatcggg	cgtgTTtagct	ttattaggcc	gattatcgtc	gtcgtcccaa	6000
ccctcgTcgt	tagaagttgc	ttccgaagac	gattttgcca	tagccacacg	acgcctatta	6060
attgtgtcgg	ctaacacgTc	cgcgatcaaa	tttgtagttg	agctttttgg	aattatttct	6120
gattgCGggc	gtttttgggc	gggtttcaat	ctaactgtgc	ccgattttaa	ttcagacaac	6180
acgttagaaa	gcgatggTgc	aggcggtggt	aacatttcag	acggcaaate	tactaatggc	6240
ggCGgtggtg	gagctgatga	taaattctacc	atcgttggag	gcgcaggCGg	ggctggcggc	6300
ggaggCGgag	gcggaggtgg	tggcggtgat	gcagacggcg	gtttaggctc	aaatgtctct	6360
ttaggcaaca	cagtcggcac	ctcaactatt	gtactggTtt	cggcgccgct	ttttggtttg	6420
accggtctga	gacgagTgcg	atTTTTttcg	tttctaatag	cttccaacaa	ttgttgTctg	6480
tcgtctaaaag	gtgcagcggg	ttgaggttcc	gtcggcattg	gtggagcggg	cggcaattca	6540
gacatcgatg	gtggtggtgg	tggTggaggc	gctggaatgt	taggcacggg	agaaggTggt	6600
ggcggCGgtg	ccgCCggtat	aatttgttct	ggtttagttt	gttcgCGcac	gattgtgggc	6660
accggCGcag	gcgCCgctgg	ctgcacaacg	gaaggTcgtc	tgcttcgagg	cagcgcttgg	6720
ggtggtggca	attcaatatt	ataattggaa	tacaaatcgt	aaaaatctgc	tataagcatt	6780
gtaatttcgc	tatcgTttac	cgtgCCgata	tttaacaacc	gctcaatgta	agcaattgta	6840
ttgtaaagag	attgtctcaa	gctCGCCgca	cgccgataac	aagccttttc	atTTTTtacta	6900
cagcattgta	gtggcgagac	acttcgctgt	cgtcgacgta	catgtatgct	ttgttgTcaa	6960
aaacgtcgTt	ggcaagcttt	aaaatatTTa	aaagaacatc	tctgttcagc	accactgtgt	7020
tgtcgTaaat	gttgtttttg	ataatttgcg	cttccgcagt	atcgacacgt	tcaaaaaatt	7080
gatgcgcac	aattttgttg	ttcctattat	tgaataaaat	agattgtaca	gattcatatc	7140
tacgattcgt	catggccacc	acaaatgcta	cgctgcaaac	gctggTacaa	ttttacgaaa	7200
actgcaaaaa	cgtcaaaaact	cggTataaaa	taatcaacg	gcgctttggc	aaaatatcta	7260
ttttatcgca	caagcccaact	agcaaattgt	atTTgcagaa	aacaatttcg	gcgcacaatt	7320
ttaacgctga	cgaaataaaa	gttcaccagt	taatgagcga	ccacccaaat	tttataaaaa	7380
tctatttttaa	tcacggttcc	atcaacaacc	aagtgatcgt	gatggactac	attgactgtc	7440
ccgattttatt	tgaaactacta	caaattaaag	gcgagcttcc	gtaccaactt	gttagcaata	7500
ttattagaca	gctgtgtgaa	gcgctcaacg	atTTgcacaa	gcacaatttc	atacacacg	7560

77

PhoenixTemp31156.tmp.txt

acataaaact	cgaaaatgtc	ttatatatttcg	aagcacttga	tcgctgtgat	gtttgctgatt	7620
acggattgtg	caaacacgaa	aactcactta	gcgtgcacga	cggcacgttg	gagtatttta	7680
gtccggaaaa	aattcgacac	acaactatgc	acgtttcgtt	tgactggtac	gcggcgtggt	7740
aacatacaag	ttgctaacgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	7800
gtcacaaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	ggggtgccta	7860
atgagtgaac	taactcacat	taattgcgtt	gcgctcactg	cccgttttcc	agtcgggaaa	7920
cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgctgat	7980
tgggcgtctt	tccgcttcct	cgctcactga	ctcgtctgcg	tcggctcgtt	ggctgcggcg	8040
agcggatatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	8100
aggaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcggt	8160
gttggcgttt	ttccataggc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaaat	gacgctcaag	8220
tcagagggtg	cgaaacccga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	8280
cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttacccga	tacctgtccg	cctttctccc	8340
ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cgggtgtagg	8400
cgttcgtccc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggt	cagcccgcac	gctgcgcctt	8460
atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	8520
agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	gtagttaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	8580
gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	8640
gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	8700
tagcgggtgt	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	8760
agatcctttg	atccttttcta	cggggtctga	cgctcagttg	aacgaaaact	cacgttaagg	8820
gattttggtc	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	8880
aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	8940
aatcagtga	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	9000
ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	9060
gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	9120
aagggccgag	cgagagaagt	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	9180
ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	9240
tgctacaggc	atcgtgggtg	cacgctcgtc	gtttggtagt	gcttcattca	gctccgggtc	9300
ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgttgtgc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	9360
cggtcctccg	atcgttgtca	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	9420
agcacttgat	aatttcttta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgcttttctg	tgactgggtga	9480
gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagt	tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	9540
gtcaatacgg	gataataccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgtctc	tcattggaaa	9600
acgttcttcg	gggcgaaaaa	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	9660
accactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	9720
agcaaaaaa	ggaaggcaaa	atgcgcgaaa	aaagggaata	agggcgacac	ggaaatgttg	9780
aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	9840
gagcggatac	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaacia	ataggggttc	cgcgcacatt	9900
tccccgaaaa	gtgccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	9960
aaataggcgt	atcacgaggc	cctttcgtct	cgcgcggttc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	10020
ctgacacatg	cagctcccgg	agacggtcac	agcttgctg	taagcggatg	ccgggagcag	10080
acaaggccgt	cagggcgcg	cagcgggtgt	tggcgggtgt	cggggctggc	ttactatg	10140
ggcatcagag	cagattgtac	tgagagtga	ccatatgcgg	tgtgaaatac	cgcacagatg	10200
cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggcgcca	ttcgccattc	aggctgcgca	actgttggga	10260
agggcgatcg	gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	gatgtgtctg	10320
aaggcgatta	agttgggtaa	cgccagggtt	ttcccagtc	cgacgttgta	aaacgacggc	10380
cagtgc						10387

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Porcine circovirus

<400> 9

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

His Leu Gly Gln
20

<210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> Porcine circovirus

78

PhoenixTemp31156.tmp.txt

<400> 10

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

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

<220>
 <223> This is an amino acid sequence for porcine circovirus type 2,
 open reading frame 2.

<400> 11

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

REDUCCIÓN DE INFECCIONES CONCOMITANTES EN CERDOS MEDIANTE EL
USO DE ANTÍGENO PCV2

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.
- 10 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
- 15 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
- 20 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
- 25 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).
- Los efectos de PCV2 en el sistema inmune del cerdo no se conocen completamente.
- 30 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
- 35 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;
- 5 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).
- 10 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
- 15 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.
- 20 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*,
- 25 *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.

30 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).
- 35

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.

5

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. 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 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 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 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 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.

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 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).

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 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 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 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%, 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 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 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.

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

5 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.

10 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 un patógeno entérico, respiratorio, reproductivo, del sistema nervioso central o del sistema locomotor diferente de circovirus, se reduce para dicho patógeno entérico,

15 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

20 control no vacunado.

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

25 *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 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*

35 *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; *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*; *Mannheimia haemolytica*; virus Menangle; *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp.,
 10 *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; virus Nipah; *Oesophagostum* spp., *Oesophagostum dentatum*, *Oesophagostum 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;
 15 *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 transmisible; *Trichuris* spp. *Taenia* spp., *Trichinella spiralis*; virus de la estomatitis vesicular; virus de
 20 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 reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de
 25 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: *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus*
 30 *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*;
 35 *Chlamydia* spp., *Cryptosporidium* spp.; virus de 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; *Hyostrogylus 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*; *Mannheimia haemolytica*; virus Menangle; *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp., *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; virus Nipah; *Oesophagostum* spp., *Oesophagostum dentatum*, *Oesophagostum quadrospinulatum*; *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 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 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 epítomos y, así, provoca la respuesta inmunológica en un huésped. Dichos fragmentos pueden identificarse utilizando cualquier técnica de representación en mapas de epítomos, 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 epítomos 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 epítomos 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*.

29

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
5 inmunogénica de subunidades, una composición que contiene PCV2 enteros muertos, o atenuados y/o desactivados. 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
35 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

5 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

10 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

15 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.

20 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

25 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

30 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

35 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
35 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.

5

"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

10

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

15

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.

20

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.

25

"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.

30

35

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 WO06/07065.

Preferiblemente, 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 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.

5

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 μ m.

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 μ m. 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 μ m. Preferiblemente, si el agente desactivante es la BEI, dicha composición comprende tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a la BEI.

35

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 alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen

un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di-
(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de
propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o alcoholes ramificados, en particular ésteres
de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para
5 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
hidroxiesteárico, que están opcionalmente etoxilados, y copolímeros de bloques de
polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, especialmente
10 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
15 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
20 alquenilo. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o
metacrílico que están reticulados, especialmente con polialquenil-éteres de azúcares o
polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el término de carbómero
(*Phameuropa*, 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
25 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
30 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,
35 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.

- 5 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.
- 10 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
- 15 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.
- 20 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
- 25 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
- 30 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.
- 35

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

5 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

10 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 μ m. Preferiblemente, dichos cerdos están coinfectados con PVC2 tal como se ha

15 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

20 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,

25 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.

30 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 μ g 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

35 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 μ m, y el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta aproximadamente entre 6,5 y 7,5.

- 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
- 10 determinadas por los expertos en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden de aproximadamente 50 μ g a aproximadamente 2.000 μ g de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 250 μ 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
- 15 aproximadamente 1 μ g/mL a aproximadamente 60 μ g/mL de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 μ g/mL de antibióticos.

- 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
- 20 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 recombinante, preferiblemente BEI, v) un agente de neutralización para detener la desactivación mediada por el agente desactivante,
- 25 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 agente anti-microbiológico activo; en la que aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tiene un tamaño menor que
- 30 1 μ m.

- La composición inmunogénica, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere también a Ingelvac®, CircoFLEX™, (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, MO, EEUU), CircoVac® (Merial SAS, Lyon, Francia), CircoVent (Intervet Inc.,
- 35 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 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, 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 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.

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.

Las vacunas de subunidades se administran normalmente con un nivel de inclusión del
5 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
10 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
15 µg/dosis, y incluso más preferiblemente con aproximadamente 1,3 hasta
aproximadamente 3,0 µg/dosis.

La administración de antígeno de PCV2 a cerdos no sólo produce la reducción del
porcentaje de infecciones concomitantes provocadas por patógenos diferentes de
20 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 concomitantes con patógenos diferentes de PCV2, que comprende la
25 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.

30 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
35 un 20%, más preferiblemente en más de un 30%, incluso más preferiblemente en más

108

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-2

Población 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.

20

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

35

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 10⁴ 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 que reflejan más estrechamente las condiciones de campo naturales.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

5 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., *Streptococcus suis*.

10 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.

- [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.
- 5 [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.
- 10 [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.
- 15 [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.
- 20 [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.
- 25 [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.
- 30 [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.

117

[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.

5 [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.

10 [24] Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1999 Junio; 150 (5): 333-41.

[25] Calsamiglia M, Pijoan C, Solano G, Rapp-Gabrielson V. Development of an oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay for detection of *Haemophilus*

15

REIVINDICACIONES

1. Método para reducir el porcentaje de infecciones concomitantes en cerdos o en una piara de cerdos provocadas por uno o más patógenos diferentes al PCV2,
5 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.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque la
10 infección concomitante está provocada por un patógeno vírico, bacteriano y/o fúngico.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que se caracteriza porque la
15 infección concomitante está provocada por un patógeno vírico.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que se caracteriza porque la
infección concomitante está provocada por PRRS.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que se caracteriza porque la
20 infección concomitante está provocada por un patógeno bacteriano.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que se caracteriza porque la
infección concomitante está provocada por un patógeno entérico.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que se caracteriza porque la
infección concomitante está provocada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*,
Haemophilus parasuis, *Mycoplasma hyrhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*,
Pasteurella multocida, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.
- 30 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se
caracteriza porque los cerdos o la piara de cerdos están/está infectados(a) con
PCV2.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se
caracteriza porque el porcentaje de infección concomitante se reduce con

respecto a una o más de dichas infecciones en un más de un 10% en comparación con un grupo de control no vacunado.

- 5 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se caracteriza porque el antígeno de PCV-2 es PCV-2 muerto, PCV2 vivo modificado o cualquier parte inmunogénica del mismo.
- 10 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que se caracteriza porque el antígeno de PCV-2 es o comprende un ORF-2 de PCV2.
- 15 12. Un método para mejorar la resistencia de los cerdos frente a infecciones concomitantes con 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.
- 20 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por un patógeno vírico, bacteriano y/o fúngico.
- 25 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por un patógeno vírico.
- 30 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por PRRS.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por un patógeno bacteriano.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por un patógeno entérico.
- 35 18. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyrhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.

19. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, que se caracteriza porque los cerdos están infectados con PCV2.
- 5 20. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, que se caracteriza porque el porcentaje de infecciones concomitantes se reduce con respecto a una o más de dichas infecciones en un más de un 10% en comparación con un grupo de control no vacunado.
- 10 21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, que se caracteriza porque el antígeno de PCV-2 es PCV2 muerto, PCV2 vivo modificado o cualquier parte inmunogénica del mismo.
- 15 22. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, que se caracteriza porque el antígeno de PCV-2 es o comprende un ORF-2 de PCV2.
23. El uso de antígeno de PCV-2 para la preparación de una composición inmunogénica para la reducción de infecciones concomitantes provocadas por uno o más patógenos diferentes de PCV-2 en cerdos o en una piara de cerdos.
- 20 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por un patógeno vírico, bacteriano y/o fúngico.
- 25 25. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por un patógeno vírico.
26. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por PRRS.
- 30 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por un patógeno bacteriano.
28. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, que se caracteriza porque la infección concomitante está provocada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus*

parasuis, *Mycoplasma hyrhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.

- 5 29. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, que se caracteriza porque los cerdos o la piara de cerdos están/está infectados(a) con PCV2.

- 10 30. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, que se caracteriza porque el porcentaje de la infección concomitante se reduce con respecto a una o más de dichas infecciones en un más de un 10% en comparación con un grupo de control no vacunado.

- 15 31. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 28, que se caracteriza porque el antígeno de PCV-2 es PCV2 muerto, PCV2 vivo modificado o cualquier parte inmunogénica del mismo.

- 32. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 29, que se caracteriza porque el antígeno de PCV-2 es o comprende un ORF-2 de PCV2.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

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 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. También se refiere a un método para mejorar la resistencia de los cerdos frente a infecciones concomitantes con 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.

Figura 1A:

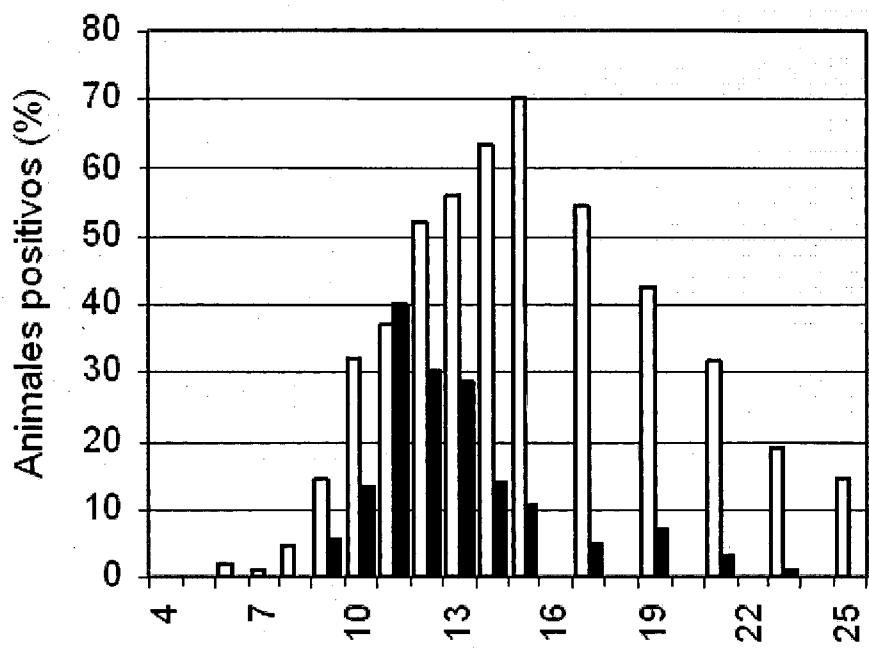
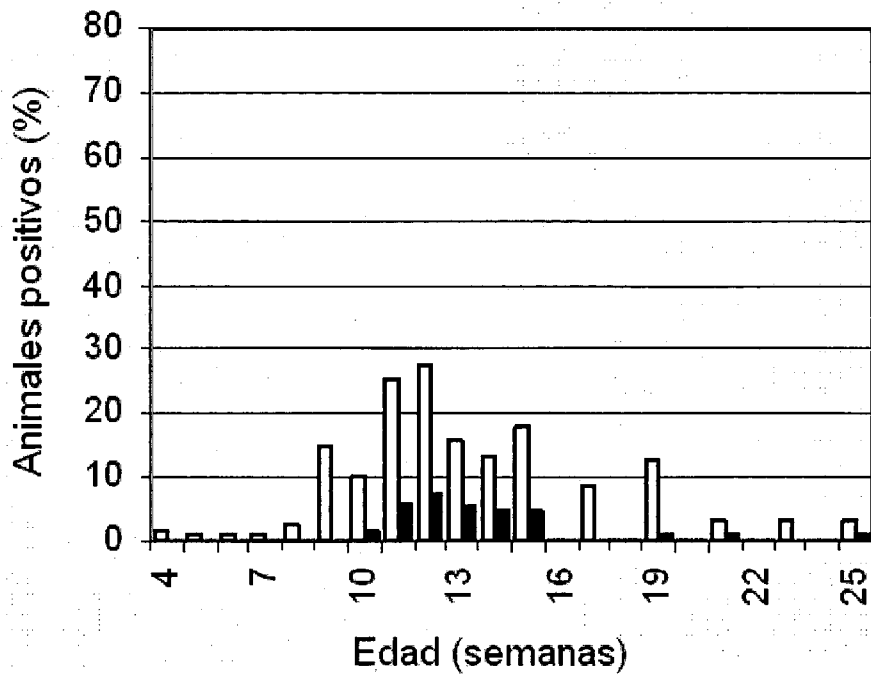


Figura 1B:



- 1/12 -

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA Inc

<120> REDUCCIÓN DE INFECCIONES CONCOMINANTES EN CERDOS MEDIANTE
EL USO DE ANTÍGENO PCV2

<130> 10-0100

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta es una secuencia de Kozak modificada.

<400> 1

ccgccatg

8

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta es una secuencia Eco R1 recombinante.

<400> 2

gaattc

6

<210> 3

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

125

- 2/12 -

<400> 3

```
cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgcgcg cgcacctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccggttga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctccgcac cttcggatat actgtggaga 180
aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240
ttgttccccg gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaagggtta ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gtccactgcg tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
acctatgtgt aaactactcc tccgcgcata caatcccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggtacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaatg aat 713
```

<210> 4

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 4

```
ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgcgcg cgcacctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccggttga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctccgcac cttcggatat actgtcaagg 180
ctaccacagt cacaacgccc tcttggggcg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
ttgttccccg gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
gaaagggtta ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
gtccactgcg tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
acctatgtgt aaactactcc tccgcgcata caatcccca acccttctcc taccactccc 480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
aaaggaatca gctttggctg aggtacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc 713
```

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 5

126

- 3/12 -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe

- 4/12 -

210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro

225 230

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 6

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr

50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val

65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr

85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr

100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn

115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr

130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr

- 5/12 -

145 150 155 160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
 195 200 205
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225 230

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

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

<400> 7
gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcgttaccg cagaagaaga 60
caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcgcgc gcccttggt cgtccacccc 120
cgccaccgct accgttgag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctccgcacc 180
ttcgatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgcct cctgggcggt ggacatgatg 240
agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc 300
tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct gccctgctc ccccatcacc 360
cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag 420
gccacagccc taacctatga cccatattga aactactcct ccgccatac aatcccccaa 480
cccttctcct accactcccc ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat 540
tacttccaac caaataacaa aaggaaatcag ctttggtgta ggctacaaac ctctagaaat 600
gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat 660
atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagacct ccacttgaa 720
ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggcgcg 756

- 6/12 -

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

<220>

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

<400> 8

aagctttact	cgtaaagcga	gttgaaggat	catatttagt	tcggtttatg	agataagatt	60
gaaagcacgt	gtaaaatgtt	tcccgcgctg	tggcacaact	atttacaatg	cggccaagtt	120
ataaaagatt	ctaattctgat	atgtttttaa	acacctttgc	ggcccgagtt	gtttgcgtac	180
gtgactagcg	aagaagatgt	gtggaccgca	gaacagatag	taaaacaaaa	ccctagtatt	240
ggagcaataa	tcgatttaac	caacacgtct	aaatattatg	atgggtgtgca	ttttttgcgg	300
gcgggcctgt	tatacaaaaa	aattcaagta	cctggccaga	ctttgcgcgc	tgaagcata	360
gttcaagaat	ttattgacac	ggtaaaagaa	ttacagaaa	agtgtcccg	catgttggtg	420
ggcgtgcact	gcacacacgg	tattaatcgc	accggttaca	tgggtgtgcag	atatttaatg	480
cacaccctgg	gtattgcgc	gcaggaagcc	atagatagat	tcgaaaaagc	cagaggtcac	540
aaaattgaaa	gacaaaatta	cgttcaagat	ttattaattt	aattaatatt	atttgcattc	600
tttaacaaat	actttatcct	attttcaaat	tgttgcgctt	cttcacagca	accaaaacta	660
tgttgcgctt	gctccgttta	gcttgtagcc	gatcagtggc	gttgttccaa	tcgacggtag	720
gattaggccg	gatattctcc	accacaatgt	tggcaacggt	gatgttacgt	ttatgctttt	780
ggttttccac	gtacgtcttt	tggccggtaa	tagccgtaaa	cgtagtgcgc	tcgcgcgtca	840
cgcacaacac	cggatgtttg	cgttgtccg	cggggtattg	aaccgcgcga	tccgacaaat	900
ccaccacttt	ggcaactaaa	tcggtgacct	gcgcgtcttt	tttctgcatt	atttcgtctt	960
tcttttgcac	ggtttcctgg	aagccggtgt	acatgcggtt	tagatcagtc	atgacgcgcg	1020
tgacctgcaa	atctttggcc	tcgatctgct	tgtccttgat	ggcaacgatg	cgttcaataa	1080
actcttgttt	tttaacaagt	tcttcggttt	tttgcgccac	caccgcttgc	agcgcgtttg	1140
tgtgctcggg	gaatgtcgca	atcagcttag	tcaccaactg	tttgcctccc	tctcccgtt	1200
gtttgatcgc	gggatcgtac	ttgccggtgc	agagcacttg	aggaattact	tcttctaaaa	1260
gccattcttg	taattctatg	gcgtaaggca	atttggactt	cataatcagc	tgaatcacgc	1320
cggatttagt	aatgagcact	gtatgcggct	gcaaatacag	cgggtcgcgc	cttttcacga	1380
cgcgtgttaga	ggtagggccc	ccattttgga	tggctctgctc	aaataacgat	ttgtatttat	1440
tgtctacatg	aacacgtata	gctttatcac	aaactgtata	ttttaaactg	ttagcgacgt	1500
ccttggccac	gaaccggacc	tgttggtcgc	gctctagcac	gtaccgcagg	ttgaacgtat	1560
cttctccaaa	tttaattctt	ccaattttaa	cgcgagccat	tttgatacac	gtgtgtcgat	1620
tttgcaacaa	ctattgtttt	ttaacgcaaa	ctaaacttat	tgtggtaagc	aataattaaa	1680
tatgggggaa	catgcgcgcg	tacaacactc	gtcgttatga	acgcagacgg	cgcgggtctc	1740

- 7/12 -

ggcgcaagcg gctaaaaacgt gttgcgcgtt caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag 1800
tacagttttg atttgcatat taacggcgat tttttaaatt atcttattta ataaatagtt 1860
atgacgccta caactccccg cccgcgttga ctgcgtgcac ctgcagcagt tcggtgacgc 1920
cttcctccgt gtggccgaac acgtcgagcg ggtggtcgat gaccagcggc gtgccgcacg 1980
cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcga aggcacgtcg gcctccaagt 2040
ggcaatattg gcaaattcga aaatatatac agttgggttg tttgcgcata tctatcgtgg 2100
cgttgggcat gtacgtccga acgttgattt gcatgcaagc cgaaattaaa tcattgcgat 2160
tagtgcgatt aaaacgttgt acatcctcgc ttttaatcat gccgtcgatt aaatcgcgca 2220
atcgagtcaa gtgatcaaag tgtggaataa tgttttcttt gtattcccgga gtcaagcgca 2280
gcggtatatt taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc 2340
aataatatat tatgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gccggttgtc gcatctcaac 2400
acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag cttgcgacgc aacgtgcacg 2460
atctgtgcac gcgttccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca 2520
tgacccccgt agtgacaacg atcacgccc aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt 2580
atgtcgggta cgttaaaact attaaagcat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc 2640
tggtgcgaga agcgcggaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt 2700
agagcgatcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atcccgatga ttttattgat 2760
aaattgaccc taactccata cacggtattc tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc 2820
ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct cgcgccacta ttaatgaaat taaaaattcc 2880
aattttaaaa aacgcagcaa gagaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa 2940
aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg 3000
aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggtatgt acaggaagag gtttatacta 3060
aactgttaca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaaagtgt aaaaccgatg tttaatcaag 3120
gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcatctttta 3180
atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aatgaaaac tgtcgacaag 3240
ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggc ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata 3300
aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa 3360
catttgtagt attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgtcgagg taatatttaa 3420
aatcattttc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac 3480
tagacgcctt gtogtcttct tcttcgtatt ccttctcttt ttcatttttc tcttcataaa 3540
aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt 3600
tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtttttc 3660
tgtaatttac aacagtgcta tttctggga gttcttcgga gtgtgttgct ttaattatta 3720
aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt 3780
acgcagcttc ttctagttca attacaccat tttttagcag caccggatta acataacttt 3840
ccaaaatggt gtacgaacgc ttaaaacaaa acagttcacc tcccttttct atactattgt 3900
ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaaactaat 3960
atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaaat 4020
gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa 4080
aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtccacca tcgggcgcgg atcagatctg 4140
cagcggccgc gggaattcga tccgccatga cgtatccaag gaggcgttac cgcagaagaa 4200

- 8/12 -

gacacgcgcc	cgcagccat	cttgccaga	tcctccgcg	cgcgcctgg	ctcgtccacc	4260
ccgcgcaccg	ctaccgttg	agaaggaaaa	atggcatctt	caacaccgc	ctctcccgca	4320
ccttcggata	tactgtcaag	gctaccacag	tcacaacgcc	ctcctggcg	gtggacatga	4380
tgagatttaa	tattgacgac	ttgttcctcc	cgggaggggg	gaccaacaaa	atctctatac	4440
cctttgaata	ctacagaata	agaaagggtta	agggtgaatt	ctggcctgc	tcctccatca	4500
cccagggtga	taggggagtg	ggctccactg	ctgttattct	agatgataac	tttgaacaa	4560
aggccacagc	cctaacctat	gacccatatg	taaactactc	ctcccgccat	acaatcccc	4620
aacccttctc	ctaccactcc	cgttacttca	cacccaaacc	tggtcttgac	tcactatttg	4680
attacttcca	accaaataac	aaaagggaatc	agctttggct	gaggctacaa	acctctagaa	4740
atgtggacca	cgtaggcctc	ggcactgcgt	tcgaaaacag	taaatacgac	caggactaca	4800
atatccgtgt	aacctatgat	gtacaattca	gagaatttaa	tcctaaagac	ccccacttg	4860
aaccctaaga	attctatcac	tagtgaattc	gcgccgcgcg	gcgcctccag	aattctagaa	4920
ggtaccgcgg	atcctttcct	gggacccggc	aagaacaaaa	aactcactct	cttcaaggaa	4980
atccgtaatg	ttaaaccoga	cacgatgaag	cttgtcggtg	gatggaaagg	aaaagagttc	5040
tacagggaaa	cttggaaccg	cttcattgaa	gacagcttcc	ccattgttaa	cgaccaagaa	5100
gtgatggatg	ttttccttgt	tgtcaacatg	cgtccacta	gaccaaccg	ttgttacaaa	5160
ttcctggccc	aacacgctct	gcgttgcgac	cccactatg	tacctcatga	cgtgattagg	5220
atcgtcgagc	cttcattggg	gggcagcaac	aacgagtacc	gcctcagcct	ggctaagaag	5280
ggcggcgggt	gccaataat	gaaccttcac	tctgagtaca	ccaactcgtt	cgaacagttc	5340
atcgatcgtg	tcattctgga	gaacttctac	aagcccatcg	tttacatcgg	taccgactct	5400
gctgaagagg	aggaaattct	ccttgaagtt	tccttggtgt	tcaaagtaaa	ggagtttgca	5460
ccagacgcac	ctctgttcac	tggtccggcg	tattaaaaca	cgatacattg	ttattagtac	5520
atttattaag	cgctagattc	tgtgcgttgt	tgatttacag	acaattgttg	tacgtatttt	5580
aataattcat	taaatttata	atctttaggg	tggtatgtta	gagcgaaaat	caaatgattt	5640
tcagcgtcct	tatatctgaa	tttaaatatt	aaatcctcaa	tagatttgta	aaataggttt	5700
cgattagttt	caaacaaggg	ttgtttttcc	gaaccgatgg	ctggactatc	taatggattt	5760
tcgctcaacg	ccacaaaact	tgccaaatct	tgtagcagca	atctagcttt	gtcgatattc	5820
gtttgtgttt	tgttttgtaa	taaaggttcg	acgtcgttca	aaatattatg	cgtttttgta	5880
tttctttcat	cactgtcgtt	agtgtacaat	tgactcgacg	taaacacggt	aaataaagct	5940
tggacatatt	taacatcggg	cgtgttagct	ttattaggcc	gattatcgtc	gtcgtcccaa	6000
ccctcgtcgt	tagaagttgc	ttccgaagac	gattttgcc	tagccacacg	acgcctatta	6060
atttgtcctg	ctaacacgtc	cgcgatcaaa	tttgtagttg	agcttttttg	aattatttct	6120
gattgcgggc	gtttttgggc	gggtttcaat	ctaactgtgc	ccgattttaa	ttcagacaac	6180
acgttagaaa	gcgatggtgc	aggcgggtgt	aacatttcag	acggcaaatc	tactaatggc	6240
ggcgggtggt	gagctgatga	taaatctacc	atcggtgag	gcgcaggcgg	ggctggcggc	6300
ggaggcggag	gcggaggtgg	tggcgggtgat	gcagacggcg	gtttaggctc	aaatgtctct	6360
ttaggcaaca	cagtcggcac	ctcaactatt	gtactggttt	cggcgccgt	ttttggtttg	6420
accggtctga	gacgagtgcg	atttttttcg	tttctaatag	cttccaacaa	ttgttgtctg	6480
tcgtctaaag	gtgcagcggg	ttgaggttcc	gtcggcattg	gtggagcggg	cggcaattca	6540
gacatcgatg	gtgggtggtg	tgggtggaggc	gctggaatgt	taggcacggg	agaaggtggt	6600
ggcggcgggt	cgcgcggtat	aatttgttct	ggttttagttt	gttcgcgcac	gattgtgggc	6660

- 9/12 -

accggcgag ggcgcgctgg ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcttcgagg cagcgcttgg 6720
ggtggtggca attcaatatt ataattggaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt 6780
gtaatttcgc tatcggttac cgtgccgata tttacaacc gctcaatgta agcaattgta 6840
ttgtaaagag attgtctcaa gctcgccgca cgccgataac aagccttttc atttttacta 6900
cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgacgta catgtatgct ttgttgtcaa 6960
aaacgctggt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt 7020
tgtcgtaaatt gttgtttttg ataatttgct cttccgcagt atcgacacgt tcaaaaaatt 7080
gatgcgcac aattttgttg ttctatttat tgaataaata agattgtaca gattcatatc 7140
tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgctgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa 7200
actgcaaaaa cgtcaaaact cggataaaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta 7260
ttttatcgca caagcccact agcaaattgt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt 7320
ttaacgctga cgaaataaaa gttcaccagt taatgagcga ccacccaaat tttataaaaa 7380
tctattttta tcacgggtcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc 7440
ccgatttatt tgaaacacta caaattaaag gcgagctttc gtaccaactt gttagcaata 7500
ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg 7560
acataaaact cgaaaatgtc ttatatcttg aagcacttga tcgctgtgat gtttgcgatt 7620
acggattgtg caaacacgaa aactcactta gcgtgcacga cggcacgttg gattatttta 7680
gtccggaaaa aattcgacac acaactatgc acgtttcgtt tgactggtac gcggcggtgt 7740
aacatacaag ttgctaacgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 7800
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 7860
atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgtcactg cccgctttcc agtcgggaaa 7920
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 7980
tgggcgctct tccgcttcct cgtcactga ctgcgtgcgc tcggtcgttc ggtgcgggcg 8040
agcggtatca gctcactcaa agcgggtaat acgggtatcc acagaatcag gggataacgc 8100
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt 8160
gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag 8220
tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 8280
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc 8340
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 8400
cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccagcc gctgcgcctt 8460
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 8520
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 8580
gtggtggcct aactacggtt acactagaag gacagtatct ggtatctgcg ctctgctgaa 8640
gccagttacc ttcggaaaaa gagtggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 8700
tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 8760
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 8820
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 8880
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt 8940
aatcagttag gcaoctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgctgact 9000
ccccgctg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 9060
gataccgga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 9120

- 10/12 -

aagggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 9180
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 9240
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccgggtc 9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt 9360
cggtccctccg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga 9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 9540
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtctca tcattggaaa 9600
acgttcttgc gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 9660
acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 9720
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg 9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat 9840
gagcggatag atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9960
aaataggcgt atcacgagcg cctttcgtct cgcgcgttgc ggtgatgacg gtgaaaacct 10020
ctgacacatg cagctcccg agacgggtcac agcttgctctg taagcggatg ccgggagcag 10080
acaagcccg cagggcgcg cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtga ccatacgcg tgtgaaatac cgcacagatg 10200
cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccatc aggctgcgca actgttggga 10260
agggcgatcg gtgcgggcct ctctgctatt acgccagctg gcgaaaggg gatgtgctgc 10320
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt tccccagtc cgacgttgta aaacgacggc 10380
cagtgcc 10387

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

<400> 9

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

His Leu Gly Gln
20

- <210> 10
- <211> 19

- 11/12 -

<212> PRT
 <213> Porcine circovirus
 <400> 10

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

Thr Leu Ser

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

<220>
 <223> Esta es una secuencia de aminoácidos para el circovirus porcino tip
 marco de lectura abierto 2.

<400> 11

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

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

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

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

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

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

- 12/12 -

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/061566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/12 A61P31/06 A61P31/10 A61P31/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/113372 A (MERIAL LTD [US]; ELLIS JOHN [CA]; CHARREYRE CATHERINE [FR]; MARTINON O) 26 October 2006 (2006-10-26) claim 1	1,2,5,6, 8-13,16, 17, 19-24, 27,29-32
Y	G. CHARBONNEAU, "Canadian experiences with porcine circovirus-associated disease". Presentation at the IOWA PORK CONGRESS, Des Moines IA, 24.01.2007. XP002463802 * slides 30, 33 *	1-32
Y	WO 2006/072065 A (BOEHRINGER INGELHEIM VETMED [US]; EICHMEYER MARK [US]; NITZEL GREG [US]) 6 July 2006 (2006-07-06) the whole document	1-32
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 June 2009

Date of mailing of the international search report

18/06/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, Ivo

13b

137

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/061566

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A. PONSICH: "Étude préliminaire de l'impact du circovac sur l'infection par le PCV2 en maternité" 2006, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES, FRANCE, XP002463804 the whole document	1-32
A	ALLAN, G & MCNEILLY F.: "PMWS/PCVD: diagnosis, disease, and control: What do we know?" PROCEEDINGS OF THE 19TH IPVS CONGRESS, vol. 1, 2006, pages 1-9, XP002463800 Copenhagen, DK the whole document	1-32
A	CHIOU M.T. ET AL.: "The effect of porcine circovirus infection on the immune response of pigs after vaccination against classical swine fever and pseudorabies" PROCEEDINGS OF THE 19TH IPVS CONGRESS, vol. 2, 2006, page 79, XP002463801 Copenhagen, DK abstract	1-32
A	J. SEGALÉS, "Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs: praradigm of a multifactorial disease. Presentation at GENETICS AND GENOMICS FOR ANIMAL HEALTH, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, UK, 20-21.10.2005. XP002463803 * slide 7 *	1-32
P,X	FACHINGER ET AL: "The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 26, no. 11, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 1488-1499, XP022505432 ISSN: 0264-410X the whole document	1-32
P,X	KIXMOLLER M ET AL: "Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 26, no. 27-28, 25 June 2008 (2008-06-25), pages 3443-3451, XP022710551 ISSN: 0264-410X [retrieved on 2008-05-05] the whole document	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/061566

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006113372 A	26-10-2006	AR 053711 A1	16-05-2007
		CA 2604705 A1	26-10-2006
		CN 101198699 A	11-06-2008
		EP 1871884 A2	02-01-2008
WO 2006072065 A	06-07-2006	AR 051885 A1	14-02-2007
		AU 2005321798 A1	06-07-2006
		BR PI0519783 A2	17-03-2009
		CA 2592735 A1	06-07-2006
		CN 101180406 A	14-05-2008
		EP 1833992 A2	19-09-2007
		JP 2008526212 T	24-07-2008
		KR 20080005911 A	15-01-2008
		US 2009042245 A1	12-02-2009
		US 2009022749 A1	22-01-2009
		US 2009022750 A1	22-01-2009
		US 2009022751 A1	22-01-2009
		US 2009016992 A1	15-01-2009
		US 2009022752 A1	22-01-2009

140

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

VIT : 000176029 2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 160
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-025161- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 16:52:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142

***** C O N S I D E R A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vlr. PAGO
CANALIZ. ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE COLOMBIA	062784367	305865	05/01/2010	57,686,000.00

***** D E B I T O R I O *****

CONCEPTO	TOTAL DEBITO
1 50005 01 01 SOLICITUDOS *** B.DISTINTIVO INSCRIPCION ATESTADI	280,000.00
TOTAL :	280,000.00

OTRO: DICCIONARIO CEMENTA MIL PESOS

RECORRIBLE

RECIBO DE CAJA UNICADO AL EXPEDIENTE No. _____

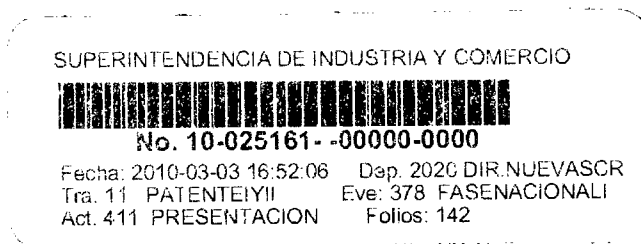
COLO: 15149.-841-013-4.

149

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 14,394
FECHA : FEBRERO 22 DE 2010



***** CONSIGNACION *****

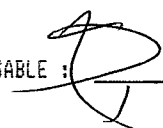
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175552554	22/02/2010	57,025,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL A#DS 4 a 8 PARA MANTEN	292,000.00

TOTAL :			\$ 292,000.00

SON: DOSCIENTOS NOVENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO : 15149 - 841 - 013-4.

142

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 16,062

FECHA : MARZO 1 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-025161- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 16:52:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175544272	01/03/2010	23,349,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	534,000.00
		TOTAL :	\$ 534,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 15149.-841-013-4.



No. 10-025161- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 16:52:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 142

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decision 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



2020

Bogotá D.C.,

Folio 144

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 25161
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/0611566
	Fecha inicio fase nacional	04/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	10313
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

16 ABR. 2010

ALIX CARMENZA CESPÍDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

adpall