



CSA836231

Organización y
Digitalización CSA Ltd.



PCT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

10-74488

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZAR CERDOS
CONTRA EL CIRCOVIRUS PORCINO

SOLICITANTE: WYETH LLC

DIRECCIÓN: Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ Junio de 2010

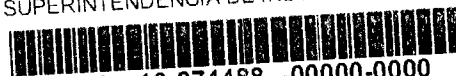
P2010/000094

Car, r. h.
21-07-2010

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-074488- -00000-0000

Fecha: 2010-06-21 17:13:39
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 226

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000094

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: WYETH LLC

Dirección: Five Giralda Farms Madison, NJ
07940 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8ª-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: Stephen Qitu WU

Dirección: 1921 Greenbrier Drive, Fort Dodge, Iowa 50501 E.U.A

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/087361

Fecha Diciembre 18, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/085912

Fecha Julio 9, 2009

6

Título (54) ~~MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZAR CERDOS CONTRA EL CIRCOVIRUS PORCINO~~ CAMBIO TÍTULO

VACUNAS Y COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS QUE CONTIENEN NUEVAS CEPAS DEL CIRCO VIRUS PORCINO TIPO 2B PAA INMUNIZAR CERDOS PMS

Clasificación Internacional (51) C12N 7/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Diciembre 21, 2007

(31) Número de Solicitud

61/015,894

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha Junio de 2010

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver Expediente No. 10-030400

☐

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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional 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 12 x 12.

☐

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.

☐

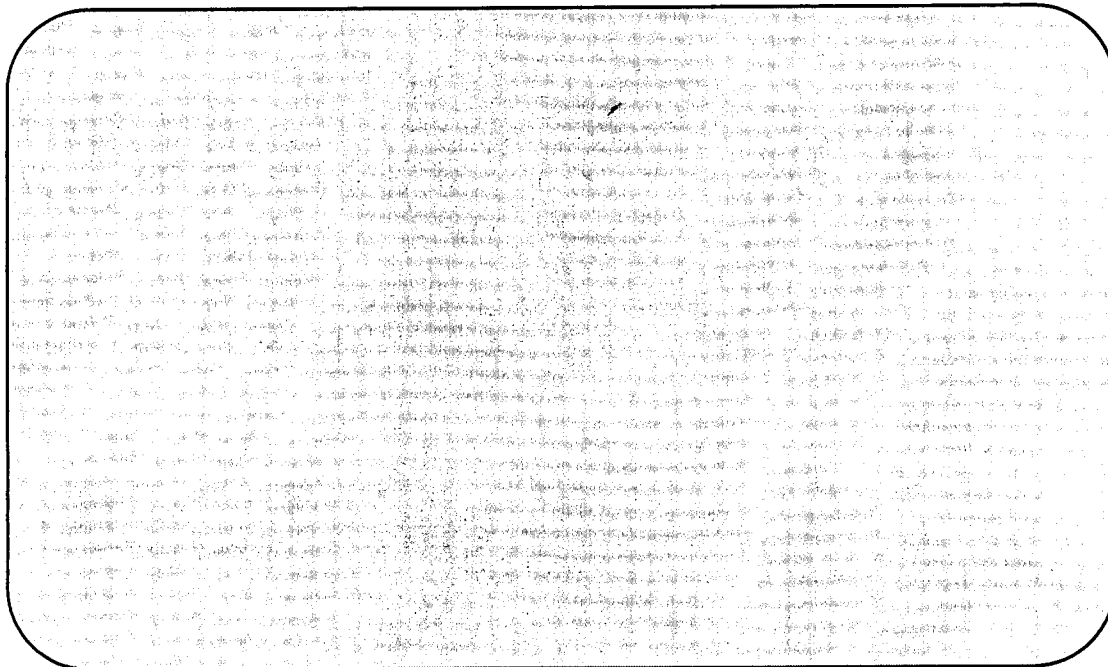
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

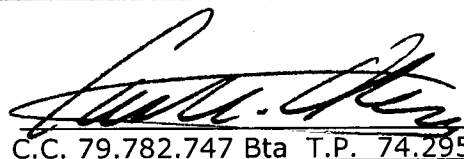
FIGURA CARACTERÍSTICA:



☐

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE


C.C. 79.782.747 Bta T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-074488- -00000-0000

Fecha: 2010-06-21 17:13:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 226

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NET : 200176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 49,661
FECHA : JUNIO 21 DE 2010

XXXX CONSIGNACION XXXX

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	VF. PAGO
CLARTE PAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	082754387	174686286	21/06/2010	7,859,000.00

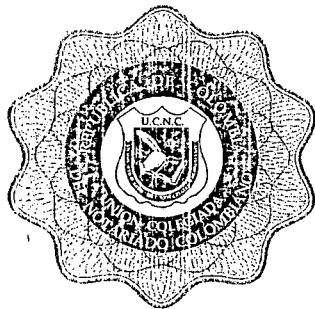
XXXX CONCEPTO XXXX

CANT. REENTISTIDO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO:

CINCO MIL CIENTO UNO (5101)-----

FECHA DE OTORGAMIENTO:

CUATRO (4) DE JUNIO DE DOS MIL DIEZ (2010)-----

NOTARIA TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.-----

CODIGO NOTARIAL 1100100038.-----

SUPERINTENDENCIA DE NOTARIADO Y REGISTRO.-----

FORMULARIO DE CALIFICACION.-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE DOCUMENTOS.-----

PERSONAS QUE INTERVIENEN: CARLOS REINALDO OLARTE, identificado con cedula de ciudadanía numero 79,782,747 expedida en Bogotá D.C.-----

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, a los **CUATRO (04)** días del mes de **JUNIO** de dos mil diez (2.010), ante mí **EDUARDO DURAN GOMEZ.**----- **NOTARIO TREINTA Y OCHO (38E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.**-----

Compareció con minuta escrita el señor **CARLOS REINALDO OLARTE**, mayor de edad, con domicilio y residencia en la ciudad de Bogotá, identificado con la cedula de ciudadanía número 79,782,747 de Bogotá D.C., de estado civil Casado, con sociedad conyugal vigente, quien manifestó su propósito de celebrar el acto que define las siguientes estipulaciones: -----

PRIMERA.- Que presenta para su Protocolización los siguientes documentos:-----

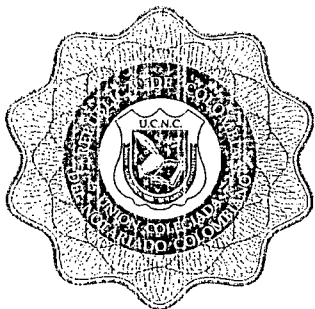
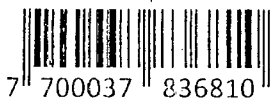
1º Traducción oficial de un documento que esta originalmente en inglés contenida en cuatro (4) folios utiles y es del siguiente tenor: -----

PODER GENERAL.- WYETH LLC.- domiciliado en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America.- nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean

administrativas, judiciales o de policia, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvencciones, formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la presentación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestro interes.- Firma: Gregg C. Benson.- Fecha: 4 MAY 2010.- Ciudad, País: GROTON, CONNECTICUT USA.-----

CERTIFICACION NOTARIAL.- En esta fecha, May 6 2010.- el Notario Público suscrito certifica: -----

1. Que GREGG C. BENSON mayor de edad y domiciliado en EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA suscribió el documento que antecede.-----
2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de ATTORNEY-IN-FACT de WYETH LLC.-----
3. Que WYETH LLC con sede principal ubicada en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.-----
4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que está es legitima.-----
5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) autenticado(s): Power of Attorney executed on November 16, 2009.- NOTARY PUBLIC (Signature): (Firmado).-



Nancy M. George.- My Commission Expires 30 June 2011.
(Sellado).-----

**TRADUCCION OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE
ESTA ORIGINALMENTE EN INGLES.-**

Sello: "El Distrito
de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mi, este día
7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario

Públic, Distrito de Columbia.- Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011.".-

(Hay otra firma ilegible).- Apostilla adjunta: Distrito de Columbia.- APOSTILLA:
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961).-----

1. País: Estados Unidos de América.- El presente documento público.-----

2. Ha sido firmado por: Lisa Renee Johnson.- Notario Público en y para el Distrito
de Columbia.-----

3. Actuando en calidad de: Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el
Distrito de Columbia.-----

4. Lleva el sello/estampilla de: Certificado.-----

5. En: Washington D.C.-----

6. El: Día 7 de mayo de 2010.-----

7. Por: El Secretario del Distrito de Columbia.-----

8. Bajo el No.: 229806.-----

9. Sello / estampilla: Distrito de Columbia.- (Firmado).-----

10. Firma: Stephanie D.Scott.- Traductor Oficial.- JORGE E. SIERRA REYES.-

Licencia 376-1993 Minjusticia.- MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

160507 JORGE SIERRA CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO

DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS.- NO ASUME RESPONSABILIDAD

DEL TEXTO 2010 MAY 27 A 10:17 (FIRMADO) JEFE DE LEGALIZACIONES

BOGOTA D.C.-----

DISTRICT OF COLUMBIA.- APOSTILLE.- (Convention de La Haye du 5 octobre
1961).-----

1. District of Columbia United States of America.-----

2. This public documentt has been sogned by LISA RENEE JOHNSON.-----

3. acting on the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF
COLUMBIA LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE.-----

4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA.- CERTIFIED.-----

5. at Washington, D.C.-----
6. the 7 day of MAY 2010.-----
7. by Secretary of the District of Columbia.-----
8. No. 229806.-----
9. Seal/Stamp.-----
10. Signature.- (Firmado) Stephanie D. Scott.-----

SEGUNDA.-Que de conformidad con lo expuesto y atendiendo a las prescripciones del artículo 47 del Decreto 960 de 1970, el documento mencionado, contenidos en cuatro (4) folios útiles, quedan legalmente protocolizados ante el Notario Treinta y Ocho (38) del Círculo Bogotá, de manera que desde ahora quedan bajo su custodia y guarda para que surtan los efectos legales a que haya lugar y los interesados puedan consultarlos y obtener las copias que de el solicite.-

----- **HASTA AQUÍ EL CONTENIDO -DE LA MINUTA** -----

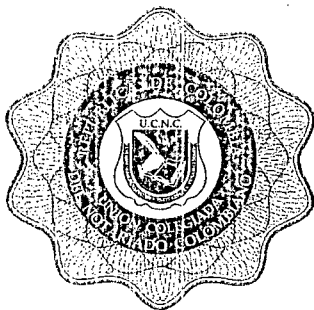
SE ADVIRTIÓ al (a los) otorgante (s) de esta Escritura de la obligación que tiene (n) de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados con el fin de aclarar, modificar o corregir lo que le(s) pareciere; la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto. -----

Se advierte igualmente la necesidad de diligenciar los espacios en blanco correspondientes a la información personal y de trabajo consignados en el espacio destinado para la firma de los suscriptores del instrumento publico, con el objeto de confrontar la información solicitada con el contenido de la escritura previo a la autorización de la misma. -----

En consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por error o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del (los) otorgante (s) y del notario. -----

En tal caso, de la existencia de estos, deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por el (los) que intervino (eron) en la inicial y sufragada por el (ellos) mismo (s). (Artículo 35 decreto ley 960 de 1.970).-----

ADVERTENCIA PARA TODOS LOS COMPARECIENTES QUE EXTIENDAN Y OTORGUEN INSTRUMENTOS, SEGÚN ART. 34 C.N., LEY 190 DE 1995,



LEY 333 DE 1996 Y LEY 365 DE 1997. Los
comparecientes bajo la gravedad del juramento
manifiestan clara y expresamente que todos los
dineros, bienes muebles e inmuebles contenidos en
este instrumento fueron adquiridos por medios y
actividades lícitas. Así como el dinero con el que se

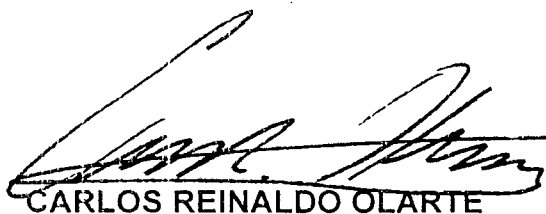
efectúa el pago de los gastos notariales. -----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. LEÍDO EL PRESENTE
INSTRUMENTO POR EL OTORGANTE Y ADVERTIDO DE SU REGISTRO
DENTRO DEL TÉRMINO DE LEY, ESTUVO DE ACUERDO CON ÉL LO
ACEPTÓ EN LA FORMA COMO ESTÁ REDACTADO Y EN TESTIMONIO
DE QUE LE DA SU ASENTIMIENTO Y APROBACIÓN LO FIRMA POR
ANTE MÍ Y CONMIGO EL NOTARIO QUE DE TODO LO EXPUESTO
DOY FE Y POR ELLO LO AUTORIZO.-----

CONSTANCIA: EL PRESENTE INSTRUMENTO SE EXTIENDE EN LAS
SIGUIENTES HOJAS DE PAPEL NOTARIAL Nos.

/ 700037/ 836805/ 836810/ 836827/ -----

DERECHOS NOTARIALES: RESOLUCIÓN No. 10301 DEL 17 DE DICIEMBRE
DE 2.009. \$ 42,860 -----


CARLOS REINALDO OLARTE



C. C. No. 79.782.747 de Bogotá

ESTADO CIVIL: CASADO

DIRECCIÓN RESIDENCIA:

DIRECCIÓN OFICINA: Diagonal 34 N° 5-28

TELÉFONO RESIDENCIA:

TELÉFONO OFICINA: 601-7700

CELULAR: 315 7901625.

EL(LA) NOTARIO (A) TREINTA Y OCHO (38)

DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

EDUARDO DURAN GOMEZ.

53



YanethG/201005163

EDUARDO DURAN GOMEZ

6

2)

Traducción oficial de un documento que está
originalmente en inglés

Sello: "El Distrito de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mí, este día 7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario Público, Distrito de Columbia. Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011."

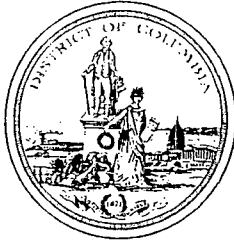
(Hay otra firma ilegible).

Apostilla adjunta:

Distrito de Columbia	
APOSTILLA:	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Lisa Renee Johnson
3. Actuando en calidad de:	Notario Público en y para el Distrito de Columbia
4. Lleva el sello/estampilla de:	Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el Distrito de Columbia
<u>Certificado</u>	
5. En:	Washington D.C.
6. El:	Día 7 de mayo de 2010
7. Por:	El Secretario del Distrito de Columbia
8. Bajo el No.:	229806
9. Sello / estampilla:	Distrito de Columbia
	(Firmado)
10. Firma:	Stephanie D. Scott.

Fin de la traducción

Handwritten signature and date: 10/10/2010



Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
United States of America

LISA RENEE JOHNSON

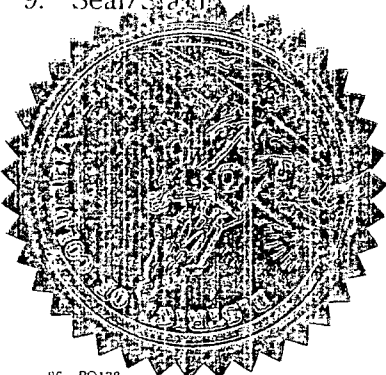
2. This public document has been signed by _____
NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA
3. acting in the capacity of _____

LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE

4. bears the seal/stamp of — DISTRICT OF COLUMBIA —

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 7 day of MAY 2010
7. by Secretary of the District of Columbia
8. No. 229806
9. Seal/Stamp



10. Signature

Handwritten signature of Stephanie D. Scott
Stephanie D. Scott

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

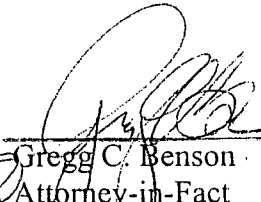
The undersigned,

General Power

domiciled in

Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

Signature/Firma:  Gregg C. Benson

Attorney-in-Fact

Date/Fecha: 4 MAY 2010

City, Country/Ciudad, País: GROTON, CONNECTICUT USA

El suscrito,

Poder General

domiciliado en

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconveniones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Alexander Agudelo
Ángela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Gina Arias

Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mariana Franco
Monica Guevara
Alvaro Sabbagh

Of Counsel
Guillermo Chahin
Cristina Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncalcano

Handwritten signature
2

The District of Columbia: SS
subscribed and sworn to before me
this 15 day of July 2010

Lisa Renee Johnson
Notary Public, DC
My commission expires 10/14/2011

Handwritten signature

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date, nmg
May 6, 2010

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

GREGG C. BENSON
EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as **ATTORNEY-IN-FACT**
of **WYETH LLC**

3. That **WYETH LLC**
having its principal place of business located in
Five Giralda Farms Madison, NJ 07940
United States of America

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the General Power is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
General Power and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Power of Attorney executed on November
16, 2009

NOTARY PUBLIC (Signature):
Nancy M. George

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

GREGG C. BENSON
mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

4. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

Nancy M. George
NANCY M. GEORGE
Notary Public
My Commission Expires 30 June 2011

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 July 2009 (09.07.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/085912 A1

- (51) International Patent Classification:
C12N 7/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2008/087361
- (22) International Filing Date:
18 December 2008 (18.12.2008)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/015,894 21 December 2007 (21.12.2007) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940
(US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): WU, Stephen Qitu
[US/US]; 1921 Greenbrier Drive, Fort Dodge, Iowa 50501
(US).
- (74) Agents: MALLON, Veronica et al.; WYETH, Patent Law
Department, Five Giralda Farms, Madison, New Jersey
07940 (US).

(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).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZING PIGS AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS

Figure 1 (SEQ ID NO: 1)

Complete Sequence of PCV2B-FD07 Genome

Comments for PCV2B-FD07 genome: 1767 bp ssDNA virus

Replication (replicase) gene: bases 51-995

Capsid gene: bases 1033-1734 C

10 20 30 40 50 60
ACGAGGCGAC TTGGGCGAGG GCAGACCTC GGCAGCACT CAGCAGCAAC ATGCCGACCA
M P S

70 80 90 100 110 120
AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCGCAACCC ATAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
K K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N

130 140 150 160 170 180
CTCCGGAAGA CGAGCGCAG AAAATACGG ATCTTCAAT ATCCCTATT GATTATTTA
P S E D E R K K I I R D L P I S L F D Y F

190 200 210 220 230 240
TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCGCAGGGG TTGCTTAAT
I V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N

250 260 270 280 290 300
TTGTGAGAA GCAGACTTT AATAAAGTGA AGTGGTATIT GGGTGCCGC TCCACATCG
F V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I

>PstI

310 320 330 340 350 360
AGAAGGCGAA AGGAACAGAT CACGAGATA AAGAATCTG CAGTAAAGAA GCGAATCTAC
E K A K G T U Q Q N K E Y C S K E G N L

>BglII

>SacI

370 380 390 400 410 420
GATTCAGTG TGGAGCTGCT AGATCTCAGG GAGTACGAG TGGCTGCTCT ACTGCTGCTA
L I E C G A P R S Q Q R E E L S T A V

430 440 450 460 470 480
GTACCTTCTT GGACAGCGG AATTTGCTA CCGTGGAGA GAGTACCTT GTACCTTCTG
S T L L E S G S L V T V A E Q Y P V T F

(57) Abstract: The present invention relates to the isolation and identification of two new strains of type 2B porcine circovirus. These two new strains of porcine circovirus may be used for the preparation of vaccine or immunogenic compositions for immunizing pigs against postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Accordingly, the invention provides methods for eliciting a protective immune response against a pathogenic porcine circovirus by administering to a pig an immunogenically effective amount of a type 2B porcine circovirus vaccine or immunogenic composition comprising at least one of the porcine circoviruses having a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NOs: 1 or 2, or at least one protein from at least one of the two new type 2B strains of porcine circovirus as described herein. The invention further relates to protection of a pig from any one or more of the symptoms or sequelae associated with PMWS.

WO 2009/085912 A1



10

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

Published:

— *with international search report*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZING PIGS AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the field of animal health and provides
5 methods and compositions for protecting pigs against pathogenic type-2B strains of
porcine circovirus. More particularly, the present invention relates to newly identified
pathogenic type 2B porcine circovirus strains, the nucleic acid sequences encoding
these type 2B strains and the proteins encoded by these nucleic acids. The invention
also relates to methods and compositions for eliciting an immune response to a
10 pathogenic porcine circovirus by administering a composition comprising an
immunogenically effective amount of at least one of these type 2B porcine
circoviruses, or a nucleic acid encoding at least one of these type 2 porcine
circoviruses or at least one of the proteins encoded by these nucleic acids.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Porcine circovirus (PCV) is a small icosahedral non-enveloped virus that
contains a single stranded circular DNA genome of about 1.76 kb. It was originally
isolated as a cell culture contaminant of a porcine kidney cell line PK-15 (I. Tischer et
al., *Nature* 295:64-66 (1982); I. Tischer et al., *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Otg. A.*
226(2):153-167 (1974)). PCV is classified in the family of Circoviridae, which consists
20 of three other animal circoviruses (chicken anemia virus (CAV), psittacine beak and
feather disease virus (PBFDV) and the recently discovered columbid circovirus
(CoCV) from pigeons) and three plant circoviruses (banana bunchy top virus,
coconut foliar decay virus and subterranean clover stunt virus) (M. R. Bassami et al.,
Virology 249:453-459 (1998); J. Mankertz et al., *Virus Genes* 16:267-276 (1998); A.
25 Mankertz et al., *Arch. Virol.* 145:2469-2479 (2000); B. M. Meehan et al., *J. Gen. Virol.*
78:221-227 (1997); B. M. Meehan et al., *J. Gen. Virol.* 79:2171-2179 (1998); D. Todd
et al., *Arch. Virol.* 117:129-135 (1991)). Members of the three previously recognized
animal circoviruses (PCV, CAV, and PBFDV) do not share nucleotide sequence
homology or antigenic determinants with each other (M. R. Bassami et al., 1998,
30 *supra*; D. Todd et al., 1991, *supra*). Experimental infection of pigs with the PK-15

12

cells-derived PCV did not produce clinical disease and thus, this virus is not considered to be pathogenic to pigs (G. M. Allan et al., *Vet. Microbiol.* 44:49-64 (1995); I. Tischer et al., *Arch. Virol.* 91:271-276 (1986)). This nonpathogenic PCV derived from the contaminated PK-15 cell line was designated as porcine circovirus type 1 or PCV1.

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), first described in 1991 (J. C. Harding and E. G. Clark, *Swine Health and Production* 5:201-203 (1997)), is a complex disease of weaning piglets that is becoming increasingly more widespread. PMWS mainly affects pigs between 5-18 weeks of age. Clinical PMWS signs include progressive weight loss, dyspnea, tachypnea, anemia, diarrhea, and jaundice. Mortality rate may vary from 1% to 2%, and up to 40% in some complicated cases in the U.K. (M. Muirhead, *Vet. Rec.* 150:456 (2002)). Microscopic lesions characteristic of PMWS include granulomatous interstitial pneumonia, lymphadenopathy, hepatitis, and nephritis (G. M. Allan and J. A. Ellis, *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:3-14 (2000); J. C. Harding and E. G. Clark, *Swine Health and Production* 5:201-203 (1997)).

While PCV1 is ubiquitous in pigs, it is not pathogenic to pigs. The primary causative agent of PMWS is usually a pathogenic strain of PCV designated as porcine circovirus type 2 or PCV2 (G. M. Allan et al., *Vet. Rec.* 142:467-468 (1998); G. M. Allan et al., *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:3-10 (1998); G. M. Allan et al., *Vet. Microbiol.* 66:115-23 (1999); G. M. Allan and J. A. Ellis, *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:3-14 (2000); J. Ellis et al., *Can. Vet. J.* 39:44-51 (1998); A. L. Hamel et al., *J. Virol.* 72:5262-5267 (1998); B. M. Meehan et al., 1998, *supra*; I. Morozov et al., *J. Clin. Microbiol.* 36:2535-2541 (1998)). The complete genomic sequence of the PMWS-associated PCV2 has been determined (M. Fenaux et al., *J. Clin. Microbiol.* 38:2494-503 (2000); A. L. Hamel et al., 1998, *supra*; J. Mankertz et al., 1998, *supra*; B. M. Meehan et al., 1997, *supra*; B. M. Meehan et al., 1998, *supra*; I. Morozov et al., 1998, *supra*).

Sequence analyses reveals that the PMWS-associated PCV2 shares only about 75% nucleotide sequence identity with the nonpathogenic PCV1. The ORF2 gene of both the nonpathogenic PCV1 and the pathogenic PCV2 encodes for the major immunogenic viral capsid protein (P. Nawagitgul et al., *Immunol. Clin. Diagn.*

B

Lab Immunol. 1:33-40 (2002); P. Nawagitgul et al., J. Gen. Virol. 81:2281-2287 (2000)).

Due to its potential impact on the pig industry, the development of a vaccine against PCV2 has become of major importance. For example, U.S. Pat. No. 6,287,856 (Poet et al.) and WO 99/45956 describe nucleic acids from psittacine beak and feather disease virus (BFDV), a circovirus that infects avian species, and from porcine circovirus (PCV). The patent proposes vaccine compositions comprising naked DNA or mRNA and discloses a nucleic acid vector for the transient expression of PCV in a eukaryotic cell comprising a cis-acting transcription or translation regulatory sequence derived from the human cytomegalovirus immediate or early gene enhancer or promoter functionally linked to a nucleic acid of the sequence.

U.S. Pat. No. 6,217,883 (Allan et al.) and French Patent No. 2,781,159B describe the isolation of five PCV strains from pulmonary or ganglionic samples taken from pigs infected with PMWS in Canada, California and France (Brittany), and their use in combination with at least one porcine parvovirus antigen in vaccine/immunogenic compositions. While the proteins encoded by PCV2 open reading frames (ORF) consisting of ORF1 to ORF13 are broadly described in the patent, there is no exemplification of any specific protein exhibiting immunogenic properties. The patent further describes vectors consisting of DNA plasmids, linear DNA molecules and recombinant viruses that contain and express *in vivo* a nucleic acid molecule encoding the PCV antigen.

Several other references, for example, U.S. Pat. No. 6,391,314 B1; U.S. Pat. No. 6,368,601 B1; French Patent No. 2,769,321; French Patent No. 2,769,322; WO 01/96377 A2; WO 00/01409; WO 99/18214; WO 00/77216 A2; WO 01/16330 A2; WO 99/29871; etc., describe the administration of PCV1 or PCV2 polypeptides or the nucleic acids encoding the polypeptides of various strains as vaccine compositions.

The citation of any reference herein should not be deemed as an admission that such reference is available as prior art to the instant invention.

30 SUMMARY OF THE INVENTION

In its broadest aspect, the present invention provides the isolation and identification of two new strains of type 2 porcine circoviruses (PCV2), each of which may be used alone, or in combination, for preparation of a vaccine or immunogenic

M

composition for use in protecting pigs against a pathogenic PCV2 infection or for ameliorating at least one symptom associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS).

Accordingly, a first aspect of the invention provides an isolated porcine type 2
5 circovirus whose genome comprises the nucleic acid molecule of either of SEQ ID NO: 1 (designated FD07) or 2 (designated FDJE), or whose genome comprises a nucleic acid molecule having at least 95% sequence homology to either of SEQ ID NO: 1 or 2.

In one embodiment, the two newly identified and isolated porcine circoviruses
10 are type 2B porcine circoviruses (PCV2B).

In one embodiment, the isolated porcine circoviruses have an ORF2 protein with at least 92 % sequence identity to either of SEQ ID NO: 3 (from FD07) or 4 (from FDJE).

In one embodiment, the isolated porcine circoviruses have an ORF2 protein
15 comprising the amino acid sequence of either of SEQ ID NO: 3 or 4.

A second aspect of the invention provides an isolated nucleic acid molecule encoding a pathogenic type 2B porcine circovirus, or encoding at least one protein from said circovirus, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least 95% sequence homology to any of SEQ ID NOs:1 or 2.

In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises the
20 nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1 or 2.

In one embodiment, an isolated nucleic acid molecule encoding the ORF 1 replicase protein of FD07 comprises residue numbers 51-995 of SEQ ID NO: 5 and an isolated nucleic acid molecule encoding the ORF 2 capsid protein of FD07
25 comprises residue numbers 1033-1734 of SEQ ID NO: 5.

In one embodiment, an isolated nucleic acid molecule encoding the ORF 1 replicase protein of FDJE comprises residue numbers 51-995 of SEQ ID NO: 6 and an isolated nucleic acid molecule encoding the ORF 2 capsid protein of FDJE comprises residue numbers 1033-1734 of SEQ ID NO: 6.

In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule encodes an ORF2
30 protein having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 3 or 4.

A third aspect of the invention provides an immunogenic or vaccine composition comprising at least one of the following: at least one of the isolated type

15

2B porcine circoviruses as described herein, or a combination thereof; at least one nucleic acid molecule encoding at least one of the type 2B porcine circoviruses described herein; at least one nucleic acid molecule encoding at least one protein from at least one of the type 2B porcine circoviruses described herein; or at least one
5 protein obtained from at least one of the type 2B porcine circoviruses described herein and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

In one embodiment, the vaccine or immunogenic composition can comprise one or more of the following:

- 10 a) a live/attenuated, or modified live PCV2B whose genome comprises the nucleic acid molecule of either of SEQ ID NOs: 1 or 2;
- b) a killed/inactivated PCV2B whose genome comprises the nucleic acid molecule of either of SEQ ID NOs: 1 or 2;
- c) a PCV2B DNA vaccine (e.g. a plasmid vector expressing the ORF2 of PCV2B whose genome comprises the nucleic acid molecule of either of SEQ ID
15 NOs: 1 or 2); or
- d) an inactivated viral vector (e.g. a baculovirus, adenovirus, or poxvirus, such as raccoonpox virus; or a bacterium, such as *E.coli*), that expresses the ORF2 of PCV2B whose genome comprises the nucleic acid molecule of either of SEQ ID NOs:1 or 2.

20 In one embodiment, a vaccine or immunogenic composition wherein the ORF 2 gene is obtained from a type 2B porcine circovirus of SEQ ID NOs: 1 or 2 may cross-protect against infections with a porcine type 2A, type 2C or type 2D strain, or any other variant. The administering of such vaccine or immunogenic composition results in protecting the pig against low virulence/low mortality type 2A strains, and
25 also results in cross-protection against high virulence/high mortality type 2B strains of pathogenic porcine circoviruses. The vaccine or immunogenic composition utilized may be administered as a single dose or as multiple doses. The administering results in protection of the pig from any one or more of the symptoms or sequelae associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Moreover,
30 the administering of the vaccine or immunogenic composition comprising any of the above-noted embodiments also results in reduction in the higher than average mortality associated with the high virulence/high mortality type 2B strains of porcine circovirus.

16

In one embodiment, the immunogenic or vaccine composition described above may be used for eliciting an immune response against a porcine circovirus, or for protecting pigs against a pathogenic PCV2 infection, or for ameliorating at least one symptom associated with the disease.

- 5 In one embodiment, the immunogenic or vaccine composition described above further comprises at least one other microorganism, or an antigen obtained from said microorganism against which an immune response is desired. In one embodiment, the immunogenic or vaccine composition described above further comprises at least one other nucleic acid molecule encoding at least one antigen
- 10 from at least one other microorganism against which an immune response is desired. The other microorganism may be selected from the group consisting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), porcine parvovirus (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*,
- 15 *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, a pathogen causative of Swine Transmissible Gastroenteritis, and a second different strain of a porcine circovirus. The second different strain of porcine circovirus may be a type 2A or a type 2B
- 20 circovirus.

In one embodiment, the immunogenic or vaccine composition is administered with or without an adjuvant.

- In one embodiment, the immunogenic or vaccine composition is administered in one dose or in multiple doses subcutaneously, intramuscularly, intranasally,
- 25 transdermally, intrahepatically, or via the intralymphoid route.

- A fourth aspect of the invention provides a method of immunizing a pig against viral infection or postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), or for preventing PMWS in a pig caused by a strain of PCV2, or for ameliorating at least one symptom associated with PMWS, comprising administering to the pig an
- 30 immunogenically effective amount of a composition comprising any one or more of the following:

- a) an immunogenically effective amount of at least one of the type 2 porcine

A

circovirus encoded by the nucleic acid molecule of either of SEQ ID NOs: 1 or 2, as described herein;

b) a nucleic acid molecule encoding at least one of the type 2 porcine circoviruses of a);

5 c) an immunogenically effective amount of at least one protein isolated from at least one of the type 2 porcine circoviruses of a); or

d) an immunogenically effective amount of at least one nucleic acid molecule encoding at least one protein of c).

10 In one embodiment, the invention provides methods for immunizing or protecting pigs against at least one pathogenic strain of porcine circovirus by administering a vaccine or immunogenic composition comprising a non-toxic, physiologically acceptable carrier and an immunogenically effective amount of a killed/inactivated type 2 porcine circovirus, or a live, attenuated type 2 porcine circovirus as described herein, whose genome comprises the nucleic acid molecule
15 of either of SEQ ID NOs: 1 or 2. In one embodiment, the methods of the invention provide for immunizing or protecting a pig against a porcine circovirus infection by administering the vaccine or immunogenic composition, as described above, which further comprises an adjuvant.

20 In one embodiment, the invention provides methods for immunizing or protecting a pig against a pathogenic type 2B strain of porcine circovirus, by administering a vaccine or immunogenic composition comprising an infectious nucleic acid encoding the type 2 porcine circovirus as shown in SEQ ID NO:1 or 2, wherein the administering results in amelioration of one or more symptoms of a porcine circovirus infection.

25 In one embodiment, the invention provides methods for immunizing or protecting a pig against a pathogenic strain of type 2B porcine circovirus, by administering an immunogenically effective amount of a vaccine or immunogenic composition, wherein the composition comprises at least one protein from the type 2 porcine circovirus as described in the present invention, or a nucleic acid encoding
30 the protein from the type 2 porcine circovirus of the present invention. In one embodiment, the protein from the type 2B porcine circovirus of the present invention is the ORF2 protein. In one embodiment, the ORF-2 gene encoding the ORF2 protein from the type 2B porcine circoviruses of the present invention, designated

18

FD07 and FDJE, comprises residue numbers 1033-1074 of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NOs: 5 and 6, respectively, and the protein encoded by the ORF-2 gene of FD07 and FDJE comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 3 or 4, respectively.

- 5 In one embodiment, the invention provides methods for immunizing or protecting a pig against a pathogenic type 2B strain of porcine circovirus, comprising administering a vaccine or immunogenic composition comprising a type 2 porcine circovirus, or a nucleic acid encoding a type 2 porcine circovirus, wherein the porcine circovirus is encoded by the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or 2,
10 their complementary strands, or a nucleic acid sequence having at least 95% homology to the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2.

- In one embodiment, the invention provides methods for immunizing or protecting a pig against a pathogenic type 2B strain of porcine circovirus by administering a vaccine or immunogenic composition comprising at least one of the
15 two new type 2B porcine circoviruses or a nucleic acid encoding at least one of the two new type 2B porcine circoviruses of the present invention, or at least one protein from at least one of the two type 2B strains of the present invention, or the nucleic acid encoding at least one of these two proteins, wherein the pathogenic type 2B strain of porcine circovirus is a strain of porcine circovirus that contains a capsid
20 protein encoded by an ORF 2 gene that exhibits not less than 92% sequence identity with a capsid protein encoded by the ORF 2 gene of at least one of the two strains of the type 2B porcine circoviruses described in the present invention. The amino acid sequences of the capsid proteins of the type 2B strains of porcine circovirus of the present invention are shown in SEQ ID NOs: 3 and 4.

- 25 In one embodiment, the methods of the invention provide for immunizing or protecting a pig from infection with a pathogenic strain of type 2B porcine circovirus, comprising administering to a pig a vaccine or immunogenic composition comprising a type 2B porcine circovirus, or a nucleic acid encoding a type 2B porcine circovirus, or encoding at least one protein from said porcine circovirus of the present invention,
30 wherein said administering results in amelioration of one or more of the following clinical symptoms:

reduction of microscopic lesions in one or more lymphoid or non-lymphoid tissues of pigs exposed to a virulent form of a type-2B porcine circovirus;

19

reduction of viremia associated with a porcine circovirus infection;
reduction in the level of type-2A or type-2B nucleic acid in one or more tissues.

In one embodiment, the method further comprises administering an
5 immunogenically effective amount of a second different immunogenic composition prior to, in conjunction with, or subsequent to, administering the type 2 porcine circovirus immunogenic composition as described herein.

In one embodiment, the second different immunogenic composition comprises an immunogenically effective amount of at least one other microorganism
10 that is pathogenic to pigs, or at least one antigen obtained from said microorganism or a nucleic acid molecule encoding said antigen, wherein the microorganism is selected from the group consisting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), porcine parvovirus (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*,
15 *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, a pathogen causative of Swine Transmissible Gastroenteritis and a second different strain of porcine circovirus. The second different strain of porcine
20 circovirus may be a type 2A or a 2B circovirus.

A fifth aspect of the invention provides a vector comprising at least one exogenous nucleic acid molecule encoding a type 2A or a type 2B porcine circovirus protein, wherein the porcine circovirus protein is an ORF2 protein, and wherein the exogenous nucleic acid molecule encoding said protein is set forth in residues 1033-
25 1734 of SEQ ID NO: 5 or 6.

In one embodiment, the vector is a raccoon poxvirus vector containing a nucleic acid molecule encoding at least one protein from a PCV2A, or a PCV2B porcine circovirus as described herein, or both.

In one embodiment, the vector further comprises one or more exogenous
30 nucleic acid molecules encoding an antigen from a microorganism that is pathogenic to pigs, wherein the microorganism is selected from the group consisting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), porcine parvovirus (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*,

20

- Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, a pathogen causative of Swine
- 5 Transmissible Gastroenteritis and a second different strain of porcine circovirus.

A sixth aspect of the invention provides a method of determining if a porcine mammal has, or is at risk for developing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), the method comprising:

- (I) measuring an amount of a PCV2 nucleic acid or protein encoded by said
- 10 nucleic acid in a tissue sample derived from the mammal, wherein said PCV2 nucleic acid or protein is:
- a) a nucleic acid comprising any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5 or 6, or a nucleic acid derived therefrom;
 - b) a protein comprising either of SEQ ID NOs: 3 or 4;
 - 15 c) a nucleic acid comprising a sequence hybridizable to any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5 or 6, or their complements under conditions of high stringency, or a protein comprising a sequence encoded by said hybridizable sequence;
 - d) a nucleic acid at least 95% homologous to any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5, or 6, or their complement as determined using the NBLAST algorithm; or a
 - 20 protein encoded thereby; and
- (II) comparing the amount of said nucleic acid or protein in the tissue sample from the mammal suspected of having, or at risk for developing PMWS with the amount of nucleic acid or protein present in a tissue sample from a normal mammal, or predetermined standard for a normal tissue sample, wherein an elevated amount
- 25 of said nucleic acid or protein in the tissue sample from the porcine mammal having or suspected of having PMWS compared to the amount in the normal tissue sample or pre-determined standard for a normal tissue sample indicates that the mammal has or is at risk of developing PMWS.

- In one embodiment, the method for determining if a porcine mammal has, or
- 30 is at risk for developing PMWS provides for measuring the amount of the PCV 2B nucleic acid or protein of the invention in a tissue sample selected from the group consisting of inguinal superficial lymph node, tracheobronchial lymph node,

submandibular lymph node, lung, tonsil, spleen, liver, kidney, whole blood and blood cells.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5 Figure 1. Complete genome sequence of type 2B porcine circovirus designated FD07 (SEQ ID NO: 1).

 Figure 2. Complete genome sequence of type 2B porcine circovirus designated FDJE (SEQ ID NO: 2).

 Figure 3. The amino acid sequence of the ORF2 capsid protein of
10 PCV2B designated FD07 (SEQ ID NO: 3).

 Figure 4. The amino acid sequence of the ORF2 capsid protein of PCV2B designated FDJE (SEQ ID NO: 4).

 Figure 5. The nucleic acid sequence encoding the ORF1 and ORF2 proteins of FD07 (SEQ ID NO: 5).

15 Figure 6. The nucleic acid sequence encoding the ORF1 and ORF2 proteins of FDJE (SEQ ID NO: 6).

DETAILED DESCRIPTION

 Before the present methods and treatment methodology are described, it is to
20 be understood that this invention is not limited to particular methods, and experimental conditions described, as such methods and conditions may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for purposes of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting.

 As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a",
25 "an", and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, references to "the method" includes one or more methods, and/or steps of the type described herein and/or which will become apparent to those persons skilled in the art upon reading this disclosure and so forth.

 Accordingly, in the present application, there may be employed conventional
30 molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein

"Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

Definitions

The terms used herein have the meanings recognized and known to those of skill in the art, however, for convenience and completeness, particular terms and their meanings are set forth below.

The term "adjuvant" refers to a compound or mixture that enhances the immune response to an antigen. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune response (Hood et al., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). Depending on the circumstances, a primary challenge with an antigen alone, in the absence of an adjuvant, may fail to elicit a humoral or cellular immune response. Adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, saponin, mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil or hydrocarbon emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*. Preferably, the adjuvant is pharmaceutically acceptable.

By "antigen" is meant a molecule that contains one or more epitopes capable of stimulating a host's immune system to make a cellular antigen-specific immune response or a humoral antibody response when the antigen is presented in accordance with the present invention. Normally, an epitope will include between

23

about 3-15, generally about 5-15, amino acids. Epitopes of a given protein 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, N. J. For example, linear

5 epitopes may be determined 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. Pat. No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

10 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715, all incorporated herein by reference in their entireties. Similarly, 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. Furthermore, for purposes of the present invention, an

15 "antigen" refers to a protein that includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but they may be non-conservative), to the native sequence, so long as the protein maintains the ability to elicit an immunological response. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or through particular synthetic procedures, or through a

20 genetic engineering approach, or may be accidental, such as through mutations of hosts, which produce the antigens.

The term "attenuated", as used herein to describe, for example, an "attenuated virus" and the like refers to a microorganism, for example, a virus, that is limited in its ability to grow or replicate *in vitro* or *in vivo*.

25 The term "circovirus", as used herein, unless otherwise indicated, refers to any strain of circovirus that falls within the family Circoviridae. For example, in the present invention, the circovirus is a pathogenic porcine circovirus. In particular embodiments, the pathogenic porcine circovirus is a low virulent/low mortality type 2A strain of porcine circovirus or a high virulence/high mortality type 2B strain of

30 porcine circovirus.

"Complementary" is understood in its recognized meaning as identifying a nucleotide in one sequence that hybridizes (anneals) to a nucleotide in another sequence according to the rule A→T, U and C→G (and vice versa) and thus

24

"matches" its partner for purposes of this definition. Enzymatic transcription has measurable and well known error rates (depending on the specific enzyme used), thus within the limits of transcriptional accuracy using the modes described herein, in that a skilled practitioner would understand that fidelity of enzymatic complementary strand synthesis is not absolute and that the amplicon need not be completely matched in every nucleotide to the target or template RNA. Procedures using conditions of high stringency are as follows. Prehybridization of filters containing DNA is carried out for 8 h to overnight at 65°C in buffer composed of 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, and 500 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Filters are hybridized for 48 h at 65°C in prehybridization mixture containing 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA and 5-20 X 10⁶ cpm of ³²P-labeled probe. Washing of filters is done at 37°C for 1 h in a solution containing 2X SSC, 0.01% PVP, 0.01% Ficoll, and 0.01% BSA. This is followed by a wash in 0.1X SSC at 50°C for 45 min before autoradiography. Other conditions of high stringency that may be used are well known in the art. (see, e.g., Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; see also, Ausubel et al., eds., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, 1987-1997 Current Protocols, © 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.).

It is noted that in this disclosure, terms such as "comprises", "comprised", "comprising", "contains", "containing" and the like can have the meaning attributed to them in U.S. patent law; eg., they can mean "includes", "included", "including" and the like. Terms such as "consisting essentially of" and "consists essentially of" have the meaning attributed to them in U.S. patent law, eg., they allow for the inclusion of additional ingredients or steps that do not detract from the novel or basic characteristics of the invention, ie., they exclude additional unrecited ingredients or steps that detract from novel or basic characteristics of the invention, and they exclude ingredients or steps of the prior art, such as documents in the art that are cited herein or are incorporated by reference herein, especially as it is a goal of this document to define embodiments that are patentable, eg., novel, nonobvious, inventive, over the prior art, eg., over documents cited herein or incorporated by reference herein. And, the terms "consists of" and "consisting of" have the meaning ascribed to them in U.S. patent law; namely, that these terms are closed ended.

75

"Encoded by" or "encoding" refers to a nucleic acid sequence which codes for a polypeptide sequence, wherein the polypeptide sequence contains an amino acid sequence of at least 3 to 5 amino acids, more preferably at least 8 to 10 amino acids, and even more preferably at least 15 to 20 amino acids, a polypeptide encoded by the nucleic acid sequences. Also encompassed are polypeptide sequences, which are immunologically identifiable with a polypeptide encoded by the sequence. Thus, an antigen "polypeptide," "protein," or "amino acid" sequence may have at least 70% similarity, preferably at least about 80% similarity, more preferably about 90-95% similarity, and most preferably about 99% similarity, to a polypeptide or amino acid sequence of an antigen.

A "gene" as used in the context of the present invention is a sequence of nucleotides in a nucleic acid molecule (chromosome, plasmid, etc.) with which a genetic function is associated. A gene is a hereditary unit, for example of an organism, comprising a polynucleotide sequence (e.g., a DNA sequence for mammals) that occupies a specific physical location (a "gene locus" or "genetic locus") within the genome of an organism. A gene can encode an expressed product, such as a polypeptide or a polynucleotide (e.g., tRNA). Alternatively, a gene may define a genomic location for a particular event/function, such as the binding of proteins and/or nucleic acids (e.g., phage attachment sites), wherein the gene does not encode an expressed product. Typically, a gene includes coding sequences, such as polypeptide encoding sequences, and non-coding sequences, such as promoter sequences, poly-adenylation sequences, transcriptional regulatory sequences (e.g., enhancer sequences). Many eucaryotic genes have "exons" (coding sequences) interrupted by "introns" (non-coding sequences). In certain cases, a gene may share sequences with another gene(s) (e.g., overlapping genes).

Thus, "homology" or "identity" or "similarity" refers to sequence similarity between two peptides or between two nucleic acid molecules. Homology can be determined by comparing a position in each sequence, which may be aligned for purposes of comparison. When a position in the compared sequence is occupied by the same base or amino acid, then the molecules are identical at that position. A degree of homology or similarity or identity between nucleic acid sequences is a function of the number of identical or matching nucleotides at positions shared by the nucleic acid sequences. A degree of identity of amino acid sequences is a function of

26

the number of identical amino acids at positions shared by the amino acid sequences. A degree of homology or similarity of amino acid sequences is a function of the number of amino acids, i.e. structurally related, at positions shared by the amino acid sequences. An "unrelated" or "non-homologous" sequence shares less than 40% identity, though preferably less than 25% identity, with one of the sequences of the present invention. Therefore, a "homolog" of a porcine circovirus or a fragment thereof, should share at least about 75% homology with the porcine circovirus or fragment thereof (preferably about 80% homology, more preferably about 90-95% homology and most preferably about 99% homology).

10 An "immune response" to a vaccine or immunogenic composition is the development in a subject of a humoral and/or a cell-mediated immune response to molecules present in the antigen or vaccine composition of interest. For purposes of the present invention, a "humoral immune response" is an antibody-mediated immune response and involves the generation of antibodies with affinity for the antigen/vaccine of the invention, while a "cell-mediated immune response" is one mediated by T-lymphocytes and/or other white blood cells. A "cell-mediated immune response" is elicited by the presentation of antigenic epitopes in association with Class I or Class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC). This activates antigen-specific CD4+ T helper cells or CD8+ cytotoxic T lymphocyte cells ("CTLs"). CTLs have specificity for peptide antigens that are presented in association with proteins encoded by the major histocompatibility complex (MHC) and expressed on the surfaces of cells. CTLs help induce and promote the intracellular destruction of intracellular microbes, or the lysis of cells infected with such microbes. Another aspect of cellular immunity involves an antigen-specific response by helper T-cells. Helper T-cells act to help stimulate the function, and focus the activity of, nonspecific effector cells against cells displaying peptide antigens in association with MHC molecules on their surface. A "cell-mediated immune response" also refers to the production of cytokines, chemokines and other such molecules produced by activated T-cells and/or other white blood cells, including those derived from CD4+ and CD8+ T-cells. The ability of a particular antigen or composition to stimulate a cell-mediated immunological response may be determined by a number of assays, such as by lymphoproliferation (lymphocyte activation) assays, CTL cytotoxic cell assays, by assaying for T-lymphocytes specific for the antigen in a sensitized

27

subject, or by measurement of cytokine production by T cells in response to restimulation with antigen. Such assays are well known in the art. See, e.g., Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

- 5 The term "immunogenic" refers to the ability of an antigen or a vaccine to elicit an immune response, either humoral or cell mediated, or both. An "immunogenically effective amount" as used herein refers to the amount of antigen or vaccine sufficient to elicit an immune response, either a cellular (T cell) or humoral (B cell or antibody) response, or both, as measured by standard assays known to one
- 10 skilled in the art. The effectiveness of an antigen as an immunogen, can be measured either by proliferation assays, by cytolytic assays, such as chromium release assays to measure the ability of a T cell to lyse its specific target cell, or by measuring the levels of B cell activity by measuring the levels of circulating antibodies specific for the antigen in serum. Furthermore, the level of protection of
- 15 the immune response may be measured by challenging the immunized host with the antigen that has been injected. For example, if the antigen to which an immune response is desired is a virus or a tumor cell, the level of protection induced by the "immunogenically effective amount" of the antigen is measured by detecting the percent survival or the percent mortality after virus or tumor cell challenge of the
- 20 animals. In one embodiment, an "immunogenically effective amount" of the vaccine or immunogenic composition refers to a titer of virus particles ranging from about 1 to 7 Log₁₀ virus particles/ml as measured by the FAID₅₀ method (King et al., Journal of Comparative Medicine and Vet. Science, 29:85-89 (1965)) and in U.S. patent number 4,824,785. In one embodiment, an "immunogenically effective amount" of the vaccine
- 25 or immunogenic compositions is a titer of virus particles ranging from about 2 to 5 Log₁₀ virus particles/ml as measured by the FAID₅₀ method (King et al., Journal of Comparative Medicine and Vet. Science, 29:85-89 (1965)) and in U.S. patent number 4,824,785. In one embodiment, an "immunogenically effective amount" of an infectious DNA vaccine or immunogenic composition may range from about 50 to
- 30 5000 µg. In one embodiment, an "immunogenically effective amount" of an infectious DNA vaccine or immunogenic composition may range from about 50 to 1000 µg. In certain embodiments, the term "about" means within 20%, preferably within 10%, and more preferably within 5%.

The term "immunogenic composition" relates to any pharmaceutical composition containing an antigen, eg. a microorganism, which composition can be used to elicit an immune response in a mammal. The immune response can include a T cell response, a B cell response, or both a T cell and B cell response. The composition may serve to sensitize the mammal by the presentation of antigen in association with MHC molecules at the cell surface. In addition, antigen-specific T-lymphocytes or antibodies can be generated to allow for the future protection of an immunized host. An "immunogenic composition" may contain a live, attenuated, or killed/inactivated vaccine comprising a whole microorganism or an immunogenic portion derived therefrom that induces either a cell-mediated (T cell) immune response or an antibody-mediated (B cell) immune response, or both, and may protect the animal from one or more symptoms associated with infection by the microorganism, or may protect the animal from death due to the infection with the microorganism.

15 An "immunogenic ORF" or "immunogenic ORF" refers to an open reading frame that elicits an immune response, for example, ORF2 encodes an immunogenic capsid protein.

The vaccines and immunogenic compositions of the present invention can further comprise one or more additional "immunomodulators", which are agents that perturb or alter the immune system, such that either up-regulation or down-regulation of humoral and/or cell-mediated immunity is observed. In one particular embodiment, up-regulation of the humoral and/or cell-mediated arms of the immune system is preferred. Examples of certain immunomodulators include, for example, a "pharmaceutically acceptable adjuvant" or cytokine, among others. Non-limiting examples of "pharmaceutically acceptable adjuvants" that can be used in the vaccine of the present invention include the RIBI adjuvant system (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alum, mineral gels such as aluminum hydroxide gel, oil-in-water emulsions, water-in-oil emulsions such as, e.g., Freund's complete and incomplete adjuvants, Block copolymer (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN® adjuvant, saponin, Quil A or other saponin fraction, monophosphoryl lipid A, and Avridine lipid-amine adjuvant. Non-limiting examples of oil-in-water emulsions useful in the vaccine of the invention include modified SEAM62 and SEAM 1/2 formulations. Modified

24

SEAM62 is an oil-in-water emulsion containing 5% (v/v) squalene (Sigma), 1% (v/v) SPAN® 85 detergent (ICI Surfactants), 0.7% (v/v) TWEEN® 80 detergent (ICI Surfactants), 2.5% (v/v) ethanol, 200 µg/ml Quil A, 100 µg/ml cholesterol, and 0.5% (v/v) lecithin. Modified SEAM 1/2 is an oil-in-water emulsion comprising 5% (v/v) squalene, 1% (v/v) SPAN® 85 detergent, 0.7% (v/v) Tween 80 detergent, 2.5% (v/v) ethanol, 100 µg/ml Quil A, and 50 µg/ml cholesterol. Other "immunomodulators" that can be included in the vaccine include, eg., one or more interleukins, interferons, or other known cytokines. In one embodiment, the adjuvant may be a cyclodextrin derivative or a polyanionic polymer, such as those described in U.S. patent numbers 6,165,995 and 6,610,310, respectively.

The term "infectious" means that the virus replicates or is capable of replicating in pigs, regardless of whether or not the virus causes any diseases. In the present invention, an example of an "infectious" DNA is shown as the PCV2 DNA of SEQ ID NOs: 1 or 2.

The term "isolated" or "purified" means that the material is removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring). For example, an "isolated" or "purified" peptide or protein is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of a polypeptide/protein in which the polypeptide/protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. Thus, a polypeptide/protein that is substantially free of cellular material includes preparations of the polypeptide/protein having less than about 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, or 1%, (by dry weight) of contaminating protein. When the polypeptide/protein is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, 10%, or 5% of the volume of the protein preparation. When polypeptide/protein is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals, i.e., it is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein. Accordingly, such preparations of the polypeptide/protein have less than about 30%, 20%, 10%, 5% (by dry weight) of chemical precursors or compounds other than polypeptide/protein

fragment of interest. An "isolated" or "purified" nucleic acid molecule is one which is separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid molecule. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule or an RNA molecule, can be substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

The terms "killed" or "inactivated" are used interchangeably herein and refer to a significant or complete reduction in the infectivity of the virus(es) utilized for preparation of the vaccine compositions. The killing or inactivation of the viruses may be evaluated according to any procedure known to those skilled in the art, for example, by molecular biology methods (PCR), methods for titration of the viral titre, fluorescence, immunological methods (ELISA, RIA and the like), immunoenzymatic methods allowing the detection of one or more viral polypeptides (Western and the like). A number of different inactivating agents and means have been employed including formalin, azide, freeze-thaw, sonication, heat treatment, sudden pressure drop, detergent (especially non-ionic detergents), lysozyme, phenol, proteolytic enzymes and .beta.-propiolactone.

The term "lymphoid tissue" refers to any tissue that is rich in lymphocytes and accessory cells such as macrophages and reticular cells and supported by a meshwork of connective tissue. The lymphoid tissue includes the bone marrow, thymus, lymph nodes, spleen, tonsils, adenoids, Peyer's Patches and lymphocyte aggregates on mucosal surfaces. "Non-lymphoid" tissue refers to any other tissue that is not rich in lymphocytes and accessory cells as defined herein.

As used herein, the phrase "nucleic acid" or "nucleic acid molecule" refers to DNA, RNA, as well as any of the known base analogs of DNA and RNA or chimeras formed therefrom. Thus, a "nucleic acid" or a "nucleic acid molecule" refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine or cytidine; "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine; "DNA molecules") in either single stranded form, or a double-stranded helix. Double stranded DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA helices are possible. The term nucleic acid molecule, and in particular DNA or RNA molecule, refers only to the primary and secondary structure

31

of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, inter alia, in linear or circular DNA molecules (e.g., restriction fragments), plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5N to 3N direction along the nontranscribed strand of DNA (i.e., the strand having a sequence homologous to the mRNA). A "recombinant DNA molecule" is a DNA molecule that has undergone a molecular biological manipulation.

A "nucleotide" refers to a subunit of DNA or RNA consisting of nitrogenous bases (adenine, guanine, cytosine and thymine), a phosphate molecule, and a sugar molecule (deoxyribose in DNA and ribose in RNA).

The term "open reading frame" or "ORF", or "ORF", as used herein, refers to the minimal nucleotide sequence required to encode a particular circovirus protein or antigen without an intervening stop codon.

The term "parenteral" refers to a substance taken into the body or administered in a manner other than through the digestive tract, for example, as by intravenous or intramuscular injection.

The term "pathogenic" refers to the ability of any agent of infection, such as a bacterium or a virus, to cause disease. In the present invention, the term "pathogenic" refers to the ability of a porcine circovirus, in particular, a type 2 porcine circovirus, to cause a disease in pigs referred to as "post-weaning multisystemic wasting syndrome" or "PMWS". This disease is often characterized by wasting or poor performance in weaned pigs and by moderate to severe lymphoid lesions with lymphoid depletion and histiocytic replacement of follicles in lymphoid tissues. Pigs suffering from PMWS are also known to have respiratory disease, for example, interstitial pneumonia, lymphohistiocytic hepatitis and lymphohistiocytic interstitial nephritis. Other conditions associated with a "pathogenic" type 2 porcine circovirus include sporadic reproductive failure, enteritis, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS). A "non-pathogenic" microorganism refers to a microorganism that lacks the characteristics noted above for the "pathogenic" strains of porcine circovirus. The "non-pathogenic" porcine circovirus is generally referred to as a type 1 porcine circovirus. The "pathogenic" strains of porcine circovirus are

generally referred to as type 2 porcine circoviruses. The "non-pathogenic" porcine circovirus is generally referred to as a type 1 porcine circovirus. 32

Thus, the term "percent identical" or "percent sequence identity" refers to sequence identity between two amino acid sequences or between two nucleotide sequences. Various alignment algorithms and/or programs may be used, including FASTA, BLAST, or ENTREZ. FASTA and BLAST are available as a part of the GCG sequence analysis package (University of Wisconsin, Madison, Wis.), and can be used with, e.g., default settings. ENTREZ is available through the National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. In one embodiment, the percent identity of two sequences can be determined by the GCG program with a gap weight of 1, e.g., each amino acid gap is weighted as if it were a single amino acid or nucleotide mismatch between the two sequences.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" means a carrier approved by a regulatory agency of a Federal, a state government, or other regulatory agency, or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans as well as non-human mammals. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the pharmaceutical composition is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium

33

saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. The formulation should suit the mode of administration.

5 A "polynucleotide" is a nucleic acid polymer, which typically encodes a biologically active (e.g., immunogenic) protein or polypeptide. Depending on the nature of the polypeptide encoded by the polynucleotide, a polynucleotide can include as little as 10 nucleotides, e.g., where the polynucleotide encodes an antigen. Furthermore, a "polynucleotide" can include both double- and single-stranded sequences and refers to, but is not limited to, cDNA from viral, prokaryotic or
10 eukaryotic mRNA, genomic RNA and DNA sequences from viral (e.g. RNA and DNA viruses and retroviruses) or prokaryotic DNA, and also synthetic DNA sequences. The term also captures sequences that include any of the known base analogs of DNA and RNA. The term further includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (eg. methylations or capping), to a native sequence, preferably
15 such that the nucleic acid molecule encodes, for example, an antigenic protein. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or through particular synthetic procedures, or through a genetic engineering approach, or may be accidental, such as through mutations of hosts, which produce the antigens. The terms "oligonucleotide" or "oligo" are used interchangeably herein.

20 The terms "porcine" and "swine" are used interchangeably and refer to any animal that is a member of the family Suidae such as, for example, a pig.

The term "protecting" refers to shielding eg. a mammal, in particular, a pig, from infection or a disease, by inducing an immune response to a particular pathogen, eg. circovirus. Such protection is generally achieved following treating a
25 mammal with the vaccine compositions described herein.

The terms "protein", "polypeptide" and "peptide" refer to a polymer of amino acid residues and are not limited to a minimum length of the product. Thus, peptides, oligopeptides, dimers, multimers, and the like, are included within the definition. Both full-length proteins and fragments thereof are encompassed by the definition. The
30 terms also include modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but which may be non-conservative), to a native sequence, preferably such that the protein maintains the ability to elicit an immunological response within an animal to which the protein is administered. Also

34

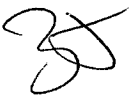
included are post-expression modifications, eg. glycosylation, acetylation, phosphorylation and the like.

As used herein, the term "sequence homology" in all its grammatical forms refers to the relationship between proteins that possess a common evolutionary origin, including homologous proteins from different species (Reeck et al., 1987, Cell 50:667).

Two DNA sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when at least about 75% (preferably at least about 80%, and more preferably at least about 90 or 95%, and most preferably about 99%) of the nucleotides match over the defined length of the DNA sequences. Sequences that are substantially homologous can be identified by comparing the sequences using standard software available in sequence data banks, or in a Southern hybridization experiment under, for example, stringent conditions as defined for that particular system. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of the art. See, e.g., Maniatis et al., *supra*; DNA Cloning, Vols. I & II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

Similarly, two amino acid sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when greater than 70% of the amino acids are identical, or functionally identical. Preferably, the similar or homologous sequences are identified by alignment using, for example, the GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) pileup program.

As used herein, "treatment" (including variations thereof, for example, "treat" or "treated") refers to any one or more of the following: (i) the prevention of infection or reinfection, as in a traditional vaccine, (ii) the reduction in the severity of, or, in the elimination of symptoms, and (iii) the substantial or complete elimination of the pathogen or disorder in question. Hence, treatment may be effected prophylactically (prior to infection) or therapeutically (following infection). In the present invention, prophylactic treatment is the preferred mode. According to a particular embodiment of the present invention, compositions and methods are provided which treat, including prophylactically and/or therapeutically immunize, a host animal against a viral infection. The methods of the present invention are useful for conferring prophylactic and/or therapeutic immunity to a mammal, preferably a pig. The methods of the present invention can also be practiced on mammals for biomedical research applications.



The terms "vaccine" or "vaccine composition", which are used interchangeably, refer to pharmaceutical compositions comprising at least one immunogenic composition that induces an immune response in an animal. A vaccine or vaccine composition may protect the animal from disease or possible death due to an infection, and may or may not include one or more additional components that enhance the immunological activity of the active component. A vaccine or vaccine composition may additionally comprise further components typical to pharmaceutical compositions. A vaccine or vaccine composition may additionally comprise further components typical to vaccines or vaccine compositions, including, for example, an adjuvant or an immunomodulator. The immunogenically active component of a vaccine may comprise complete live organisms in either their original form, or as attenuated organisms in a modified live vaccine, or organisms inactivated by appropriate methods in a killed or inactivated vaccine, or subunit vaccines comprising one or more immunogenic components of the virus, or genetically engineered, mutated or cloned vaccines prepared by methods known to those skilled in the art. A vaccine may comprise one or simultaneously more than one of the elements described above. In the present invention, the vaccine compositions include, but are not limited to, live, attenuated or killed/inactivated forms of whole chimeric porcine circoviruses, infectious nucleic acids encoding the chimeric porcine circoviruses, or other infectious DNA vaccines including plasmids, vectors, or other carriers to directly inject DNA into pigs.

General Description

Due to its potential impact on the pig industry, the development of a vaccine against pathogenic forms of porcine circovirus type 2 (PCV2) is of major importance. It is believed that the nonpathogenic PCV1 will be of limited use against PCV2 infections.

Moreover, new virulent strains of PCV2 have arisen, which are characterized in part by a higher than average mortality rate. These high virulence/high mortality pathogenic strains of PCV2 are designated PCV2B, whereas the low virulence, low mortality pathogenic strains are designated PCV2A. Recently proposed alternate nomenclature for these two strains refers to the PCV2A strain as "Genotype II", or "RFLP 422", while the PCV2B strain is referred to as "Genotype I", or "RFLP 321".

36

While certain of the previously described vaccine compositions may prove to be effective against the lower mortality, less virulent pathogenic strains of PCV2A, none have been shown to be effective against the high virulence pathogenic PCV2B strains, characterized in part by their higher than average mortality rates.

5 Given the severity of the infections and the higher than average mortality rate associated with these highly virulent pathogenic PCV2B strains of porcine circovirus, it would be advantageous to identify, isolate and utilize one or more of these strains for the preparation of an immunogenic or vaccine composition for immunization and protection of pigs against postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).

10 It is towards the identification and isolation of such strains of PCV2B that the present invention is directed.

 In one embodiment, the newly identified and isolated porcine circovirus is a type 2B strain having a nucleic acid sequence as set forth in either of SEQ ID NOs: 1 or 2. In one embodiment, the isolated porcine circovirus is a type 2B strain having a
15 nucleic acid sequence that has at least about 95% sequence homology to that of either SEQ ID NO: 1 or 2. In one embodiment, the ORF2 protein of the newly identified and isolated type 2B porcine circoviruses has at least 92% sequence identity to either of SEQ ID NOs: 3 or 4.

 In one embodiment of the present invention, the methods provide for
20 immunizing a pig against a type 2A or 2B pathogenic porcine circovirus (PCV2) comprising administering an immunogenically effective amount of an immunogenic composition comprising a porcine circovirus encoded by the nucleic acids of the present invention.

 In particular, the methods of the present invention provide for the use of a
25 vaccine or immunogenic composition comprising one or more of the following:

- a) an immunogenically effective amount of at least one of the type 2 porcine circoviruses as described herein, in either attenuated or inactivated/killed form;
- b) a nucleic acid molecule encoding at least one of the type 2 porcine
30 circoviruses of a);
- c) an immunogenically effective amount of at least one protein isolated from at least one of the type 2 porcine circoviruses of a); or

37

d) an immunogenically effective amount of at least one nucleic acid molecule encoding at least one protein of c).

In one embodiment, the vaccine or immunogenic composition may comprise a PCV2B DNA vaccine (e.g. a plasmid vector expressing PCV2B ORF2. In one embodiment, the vaccine or immunogenic composition may comprise an inactivated viral vector (e.g. a baculovirus, adenovirus, or poxvirus, such as raccoonpox virus; or a bacterium, such as *E.coli*), that expresses PCV2B ORF2.

It is also contemplated that the vaccine or immunogenic compositions as described herein are effective for preventing one or more of the symptoms associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). These symptoms may include, for example, one or more of the following: respiratory disease, microscopic lesions in one or more tissues or organs, histiocytic inflammation, or lymphoid depletion.

Moreover, the vaccines or immunogenic compositions described herein may be used with a second or third vaccine or immunogenic composition that protects pigs against one or more pathogenic porcine viruses or bacteria including: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), porcine parvovirus (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, and a pathogen causative of Swine Transmissible Gastroenteritis. For example, in one embodiment, the PCV vaccine or immunogenic composition may be combined with a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) vaccine or immunogenic composition. In one embodiment, the PCV vaccine or immunogenic composition may be combined with a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine or immunogenic composition. In one embodiment, the PCV vaccine or immunogenic composition may be combined with a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine or immunogenic composition and a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) vaccine or immunogenic composition.

Use of the PCV1-2 Vaccines and Immunogenic Compositions

The present invention provides for the identification and isolation of two new pathogenic PCV2B porcine circoviruses. Given the need for a vaccine or immunogenic composition to be administered to pigs to prevent PMWS caused by a pathogenic strain of porcine circovirus, or to ameliorate at least one symptom associated with this disease in pigs, it is envisioned that at least one of these two new strains, or at least one of the nucleic acid encoding these two new strains, or at least one of the proteins obtained from at least one of these strains, may be formulated in a vaccine or immunogenic composition for delivery to a pig in order to immunize the pig against this disease, thus providing protection of pigs against viral infection and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).

The vaccine or immunogenic composition comprising at least one of the newly identified and isolated PCV2B porcine circoviruses proposed for use as an immunogenic or vaccine composition in the present studies is prepared using the methods described herein.

Nucleic Acids of the Invention

The purified and isolated nucleic acid molecules that encode the full-length type 2B pathogenic porcine circovirus, as described herein, are set forth in SEQ ID NOs: 1 and 2. Conventional methods that are well known in the art can be used to make the complementary strands or the nucleotide sequences possessing high homology, for instance, by the art-recognized standard or high stringency hybridization techniques. The purified and isolated nucleic acid molecule comprising the DNA sequence of the immunogenic capsid gene of the PCV2 DNA is set forth in residues 1033-1734 of SEQ ID NOs 5 and 6.

Accordingly, any suitable animal cell containing the PCV2B nucleic acid molecule described herein can produce live, infectious porcine circoviruses. The live, infectious virus is derived from the DNA clone by transfecting, for example, PK-15 cells via *in vitro* or *in vivo*. As noted above, one example of the PCV2 DNA is the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOs: 1 and 2. The invention further envisions that the virus may be derived from the complementary strand or a nucleotide sequence having high homology, at least 80%, and more preferably, 95-99% homology, to the nucleotide sequence.

Also included within the scope of the present invention are biologically functional plasmids, viral vectors and the like that contain the nucleic acid molecules described herein, suitable host cells transfected by the vectors comprising the DNA clones and the immunogenic polypeptide expression products. In one embodiment, the immunogenic protein is the capsid protein encoded by ORF2 from a pathogenic type 2B strain of porcine circovirus, as described herein. The amino acid sequence of this capsid protein in the porcine circovirus is set forth in SEQ ID NOs:3 and 4. Biologically active variants thereof are further encompassed by the invention. One of ordinary skill in the art would know how to modify, substitute, delete, etc., amino acid(s) from the polypeptide sequence and produce biologically active variants that retain the same, or substantially the same, activity as the parent sequence without undue effort.

To produce the immunogenic polypeptide products of this invention, the process may include the following steps: growing, under suitable nutrient conditions, prokaryotic or eucaryotic host cells transfected with the nucleic acid molecules described herein in a manner that allows for expression of the polypeptide products, and isolating the desired polypeptide products by standard methods known in the art. It is contemplated that the immunogenic proteins may be prepared by other techniques such as, for example, biochemical synthesis and the like.

20

Vaccines and Immunogenic Compositions

The preparation of vaccines or immunogenic compositions comprising the pathogenic PCV2B viruses, as described herein, and methods of using them for protection of pigs against infection with pathogenic strains of porcine circovirus and PMWS, are also included within the scope of the present invention. It is envisioned that the new isolates of PCV2B may be used as a killed/inactivated preparation, or may be attenuated or genetically modified for use to immunize pigs against viral infection and PMWS. Accordingly, the present invention proposes methods to immunize pigs against infection with a pathogenic circovirus or against PMWS using an immunogenically effective amount of a vaccine or immunogenic composition comprising at least one of the two new pathogenic porcine circoviruses described herein, or at least one nucleic acid molecule encoding at least one of these two circoviruses, or at least one protein obtained from at least one of these two

30

46

circoviruses. The method may protect pigs in need of protection against viral infection or PMWS by administering to the pig an immunogenically effective amount of a vaccine according to the invention, such as, for example, a vaccine comprising an immunogenic amount of the PCV2B DNA, the cloned virus, a plasmid or viral vector containing the DNA of PCV2B, the polypeptide expression products, etc. The vaccine as described herein may be administered with a second or third vaccine or immunogenic composition against other porcine pathogens, including for example, PRRSV, PPV, and other infectious swine agents selected from the following: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, porcine parvovirus, *Escherichia coli*, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, and a pathogen causative of Swine Transmissible Gastroenteritis antigen. Particular combinations may include a PCV vaccine or immunogenic composition in combination with a PRRSV vaccine or immunogenic composition; a PCV vaccine or immunogenic composition in combination with a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine or immunogenic composition; or a PSV vaccine or immunogenic in combination with both of the foregoing vaccines or immunogenic compositions. Immune stimulants may be given concurrently to the pig to provide a broad spectrum of protection against other viral or bacterial infections.

The vaccines or immunogenic compositions used in the methods of the invention are not restricted to any particular type or method of preparation. The vaccines or immunogenic compositions may include, for example, a nucleic acid encoding one or more of the porcine circovirus proteins, infectious DNA vaccines (ie. using plasmids, vectors, or other conventional carriers to directly inject DNA into pigs), live vaccines, modified live vaccines, inactivated vaccines, subunit vaccines, attenuated vaccines, genetically engineered vaccines, etc. In certain embodiments, the vaccine may include the infectious PCV2B DNA, the cloned PCV DNA genome in suitable plasmids or vectors such as, for example, a pSK vector, an avirulent, live virus, an inactivated virus, etc., or a viral vector may be used, such as, but not limited to, a baculovirus vector, an adenovirus vector, or a poxvirus vector, such as raccoonpox virus, or a bacterial vector, such as *E. coli*. Any of the above may be

41

used in combination with a nontoxic, physiologically acceptable carrier and, optionally, one or more adjuvants.

Inactivated virus vaccines or immunogenic compositions may be prepared by treating the virus derived from the cloned PCV DNA with inactivating agents such as formalin or hydrophobic solvents, acids, etc., by irradiation with ultraviolet light or X-rays, by heating, etc. Inactivation is conducted in a manner understood in the art. For example, in chemical inactivation, a suitable virus sample or serum sample containing the virus is treated for a sufficient length of time with a sufficient amount or concentration of inactivating agent at a sufficiently high (or low, depending on the inactivating agent) temperature or pH to inactivate the virus. Inactivation by heating is conducted at a temperature and for a length of time sufficient to inactivate the virus. Inactivation by irradiation is conducted using a wavelength of light or other energy source for a length of time sufficient to inactivate the virus. The virus is considered inactivated if it is unable to infect a cell susceptible to infection.

The preparation of subunit vaccines typically differs from the preparation of a modified live vaccine or an inactivated vaccine. Prior to preparation of a subunit vaccine, the protective or antigenic components of the vaccine must be identified. Such protective or antigenic components include certain amino acid segments or fragments of the viral capsid proteins which raise a particularly strong protective or immunological response in pigs; single or multiple viral capsid proteins themselves, oligomers thereof, and higher-order associations of the viral capsid proteins which form virus substructures or identifiable parts or units of such substructures; oligoglycosides, glycolipids or glycoproteins present on or near the surface of the virus or in viral substructures such as the lipoproteins or lipid groups associated with the virus, etc. Preferably, a capsid protein, such as the protein encoded by the ORF2 gene, is employed as the antigenic component of the subunit vaccine. Other proteins encoded by the infectious DNA clone may also be used. These immunogenic components are readily identified by methods known in the art. Once identified, the protective or antigenic portions of the virus (i.e., the "subunit") are subsequently purified and/or cloned by procedures known in the art. The subunit vaccine provides an advantage over other vaccines based on the live virus since the subunit, such as highly purified subunits of the virus, is less toxic than the whole virus.

42

If the subunit vaccine is produced through recombinant genetic techniques, expression of the cloned subunit such as the ORF2 (capsid) gene, for example, may be optimized by methods known to those in the art (see, for example, Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Mass., 1989). If the subunit being employed represents an intact structural feature of the virus, such as an entire capsid protein, the procedure for its isolation from the virus must then be optimized. In either case, after optimization of the inactivation protocol, the subunit purification protocol may be optimized prior to manufacture.

10 To prepare attenuated vaccines from pathogenic clones, the tissue culture adapted, live, pathogenic PCV2 is first attenuated (rendered nonpathogenic or harmless) by methods known in the art, typically made by serial passage through cell cultures. Attenuation of pathogenic clones may also be made by gene deletions or viral-producing gene mutations. Then, the attenuated PCV2 viruses may be used to
15 construct additional PCV2 viruses that retain the nonpathogenic phenotype of PCV1 but can vary in the strength of the immunogenicity traits selected from the PCV2 genome through recombinant technology.

Additional genetically engineered vaccines, which are desirable in the present invention, are produced by techniques known in the art. Such techniques involve, but
20 are not limited to, further manipulation of recombinant DNA, modification of or substitutions to the amino acid sequences of the recombinant proteins and the like.

Genetically engineered vaccines based on recombinant DNA technology are made, for instance, by identifying alternative portions of the viral gene encoding proteins responsible for inducing a stronger immune or protective response in pigs
25 (e.g., proteins derived from ORF3, ORF4, etc.). Such identified genes or immunodominant fragments can be cloned into standard protein expression vectors, such as the baculovirus vector, and used to infect appropriate host cells (see, for example, O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman & Co., 1992). The host cells are cultured, thus expressing the desired vaccine proteins,
30 which can be purified to the desired extent and formulated into a suitable vaccine product.

If the clones retain any undesirable natural abilities of causing disease, it is also possible to pinpoint the nucleotide sequences in the viral genome responsible

43

for the virulence, and genetically engineer the virus avirulent through, for example, site-directed mutagenesis. Site-directed mutagenesis is able to add, delete or change one or more nucleotides (see, for instance, Zoller et al., DNA 3:479-488, 1984). An oligonucleotide is synthesized containing the desired mutation and annealed to a portion of single stranded viral DNA. The hybrid molecule, which results from that procedure, is employed to transform bacteria. Then double-stranded DNA, which is isolated containing the appropriate mutation, is used to produce full-length DNA by ligation to a restriction fragment of the latter that is subsequently transfected into a suitable cell culture. Ligation of the genome into the suitable vector for transfer may be accomplished through any standard technique known to those of ordinary skill in the art. Transfection of the vector into host cells for the production of viral progeny may be done using any of the conventional methods such as calcium-phosphate or DEAE-dextran mediated transfection, electroporation, protoplast fusion and other well-known techniques (e.g., Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). The cloned virus then exhibits the desired mutation. Alternatively, two oligonucleotides can be synthesized which contain the appropriate mutation. These may be annealed to form double-stranded DNA that can be inserted in the viral DNA to produce full-length DNA.

Genetically engineered proteins, useful in vaccines, for instance, may be expressed in insect cells, yeast cells or mammalian cells. The genetically engineered proteins, which may be purified or isolated by conventional methods, can be directly inoculated into pigs to confer protection against viral infection or postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) caused by PCV2.

An insect cell line (like HI-FIVE) can be transformed with a transfer vector containing nucleic acid molecules obtained from the virus or copied from the viral genome which encodes one or more of the immuno-dominant proteins of the virus. The transfer vector includes, for example, linearized baculovirus DNA and a plasmid containing the desired polynucleotides. The host cell line may be co-transfected with the linearized baculovirus DNA and a plasmid in order to make a recombinant baculovirus.

Alternatively, DNA from a pig suffering from PMWS, which encode one or more capsid proteins, the infectious PCV2 molecular DNA clone or the cloned PCV

44

DNA genome can be inserted into live vectors, such as a poxvirus or an adenovirus and used as a vaccine.

An immunogenically effective amount of the compositions of the present invention is administered to a pig in need of protection against viral infection or PMWS. The immunogenically effective amount or the immunogenic amount that inoculates the pig can be easily determined or readily titrated by routine testing. An effective amount is one in which a sufficient immunological response to the vaccine is attained to protect the pig exposed to the virus which causes PMWS. Preferably, the pig is protected to an extent in which one to all of the adverse physiological symptoms or effects of the viral disease are significantly reduced, ameliorated or totally prevented.

The vaccine or immunogenic composition can be administered in a single dose or in repeated doses. Dosages may range, for example, from 50 to 5,000 micrograms of the plasmid DNA containing the infectious DNA genome (dependent upon the concentration of the immuno-active component of the vaccine), but should not contain an amount of virus-based antigen sufficient to result in an adverse reaction or physiological symptoms of viral infection. Methods are known in the art for determining or titrating suitable dosages of active antigenic agent based on the weight of the pig, concentration of the antigen and other typical factors. Preferably, the infectious viral DNA clone is used as a vaccine, or a live infectious virus can be generated *in vitro* and then the live virus may be attenuated and then used as a vaccine. In that case, 100 to 200 micrograms of cloned PCV DNA or about 10,000 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) of live attenuated virus can be given to a pig.

Desirably, the vaccine or immunogenic composition is administered to a pig not yet exposed to the PCV virus. The vaccine containing the PCV2 infectious DNA clone or other antigenic forms thereof can conveniently be administered intranasally, transdermally (i.e., applied on or at the skin surface for systemic absorption), parenterally, etc. The parenteral route of administration includes, but is not limited to, intramuscular, intravenous, intraperitoneal, intradermal (i.e., injected or otherwise placed under the skin) routes and the like. Since the intramuscular and intradermal routes of inoculation have been successful in other studies using viral infectious DNA clones (E. E. Sparger et al., "Infection of cats by injection with DNA of feline

45

immunodeficiency virus molecular clone," Virology 238:157-160 (1997); L. Willems et al., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," Virology 189:775-777 (1992)), these routes are most preferred, in addition to the practical intranasal route of administration. Although less convenient, it is also contemplated that the vaccine is given to the pig through the intralymphoid route of inoculation. A unique, highly preferred method of administration involves directly injecting the plasmid DNA containing PCV2 or the PCV2 virus (attenuated or inactivated) into the pig intramuscularly, intradermally, intralymphoidly, etc.

When administered as a liquid, the present vaccine may be prepared in the form of an aqueous solution, syrup, an elixir, a tincture and the like. Such formulations are known in the art and are typically prepared by dissolution of the antigen and other typical additives in the appropriate carrier or solvent systems. Suitable "physiologically acceptable" carriers or solvents include, but are not limited to, water, saline, ethanol, ethylene glycol, glycerol, etc. Typical additives are, for example, certified dyes, flavors, sweeteners and antimicrobial preservatives such as thimerosal (sodium ethylmercurithiosalicylate). Such solutions may be stabilized, for example, by addition of partially hydrolyzed gelatin, sorbitol or cell culture medium, and may be buffered by conventional methods using reagents known in the art, such as sodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, a mixture thereof, and the like.

Liquid formulations also may include suspensions and emulsions that contain suspending or emulsifying agents in combination with other standard co-formulants. These types of liquid formulations may be prepared by conventional methods. Suspensions, for example, may be prepared using a colloid mill. Emulsions, for example, may be prepared using a homogenizer.

Parenteral formulations, designed for injection into body fluid systems, require proper isotonicity and pH buffering to the corresponding levels of porcine body fluids. Isotonicity can be appropriately adjusted with sodium chloride and other salts as needed. Suitable solvents, such as ethanol or propylene glycol, can be used to increase the solubility of the ingredients in the formulation and the stability of the liquid preparation. Further additives that can be employed in the present vaccine include, but are not limited to, dextrose, conventional antioxidants and conventional

MB

chelating agents such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). Parenteral dosage forms must also be sterilized prior to use.

In one embodiment, the immunogenic ORF2 capsid gene derived from at least one of the type 2B circoviruses described herein may be used in the vaccine or
5 immunogenic composition.

Adjuvants

The present invention provides for the isolation and identification of two new type 2B porcine circoviruses (PCV2B) encoded by the nucleic acid sequences of
10 SEQ ID NOs: 1 and 2. These new strains of PCV2B were isolated from pigs who were environmentally exposed and as such, may be ideal candidates for use in preparation of vaccine and immunogenic compositions. It is an object of the invention to utilize these strains in killed/inactivated forms, or to prepare attenuated forms of these two strains for preparation of vaccine or immunogenic compositions.
15 It is also an object of the invention to deliver them with or without an adjuvant to a population of pigs to prevent PMWS or to ameliorate at least one symptom associated with this disease.

Accordingly, a live, attenuated type 2B porcine circovirus, or a killed/inactivated porcine circoviruses, as described herein, or the nucleic acid
20 encoding these porcine circoviruses, or at least one protein obtained from these circoviruses may be delivered with or without an adjuvant. In one embodiment, the vaccine is a killed/inactivated PCV2B circovirus, which is administered with an adjuvant. An adjuvant is a substance that increases the immunological response of the pig to the vaccine. The adjuvant may be administered at the same time and at the same site as the vaccine, or at a different time, for example, as a booster. Adjuvants
25 also may advantageously be administered to the pig in a manner or at a site different from the manner or site in which the vaccine is administered. Suitable adjuvants include, but are not limited to, aluminum hydroxide (alum), immunostimulating complexes (ISCOMS), non-ionic block polymers or copolymers, cytokines (like IL-1, IL-2, IL-7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.), saponins, monophosphoryl lipid A (MLA),
30 IL-2, IL-7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.), saponins, monophosphoryl lipid A (MLA), muramyl dipeptides (MDP) and the like. Other suitable adjuvants include, for example, aluminum potassium sulfate, heat-labile or heat-stable enterotoxin isolated from Escherichia coli, cholera toxin or the B subunit thereof, diphtheria toxin, tetanus

47

toxin, pertussis toxin, Freund's incomplete or complete adjuvant, etc. Toxin-based adjuvants, such as diphtheria toxin, tetanus toxin and pertussis toxin may be inactivated prior to use, for example, by treatment with formaldehyde.

5 Assays for Measuring Immune Responses

The functional outcome of vaccinating a pig against porcine circovirus can be assessed by suitable assays that monitor induction of cellular or humoral immunity or T cell activity. These assays are known to one skilled in the art, but may include measurement of cytolytic T cell activity using for example, a chromium release assay.

10 Alternatively, T cell proliferative assays may be used as an indication of immune reactivity or lack thereof. In addition, *in vivo* studies can be done to assess the level of protection in a mammal vaccinated against a pathogen using the methods of the present invention. Typical *in vivo* assays may involve vaccinating an animal with an antigen, such as the chimeric porcine circovirus described herein. After waiting for a

15 time sufficient for induction of an antibody or T cell response to occur, generally from about one to two weeks after injection, the animals will be challenged with the antigen, such as either a virus, and amelioration of one or more symptoms associated with the viral infection, or survival of the animals is monitored. A successful vaccination regimen against porcine circovirus will result in significant

20 decrease in one or more symptoms associated with the viral infection, or a decrease in viremia, or a decrease in the number or severity of lesions associated with a viral infection, or survival when compared to the non-vaccinated controls. Serum may also be collected to monitor levels of antibodies generated in response to the vaccine injections, as measured by methods known to those skilled in the art.

25

Methods for Comparing Porcine Circovirus Type 2A and Type 2B Isolates

It may be possible that the newly identified type 2B porcine circoviruses may be effective as vaccine or immunogenic compositions to protect against infection with either a type 2A or a type 2B circovirus, both of which are pathogenic in pigs. Type

30 2A and type 2B strains may be differentiated through use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. RFLP uses enzyme digestion of viral nucleic acid (partial or whole), which results in a specific cutting pattern that is visualized on a gel. If there are differences between viruses at the site of enzyme cutting, different

48

patterns can be observed. This fingerprinting technique has been commonly used for DNA viruses. Meng *et al.* (U.S. patent publication 2005/0147966) describe the use of a PCR-RFLP assay using the *NcoI* restriction enzyme to distinguish between non-pathogenic type 1 porcine circoviruses and pathogenic type 2 porcine circoviruses.

- 5 An ORF2 based PCR-RFLP assay described in 2000 using *Hinfl*, *HinP1I*, *KpnI*, *MseI*, and *RsaI* enzymes is able to distinguish among PCV2 isolates (PCV2A, B, C, D, and E) (Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP: PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.* 64:44-52, 2000).

- 10 An ORF2 based PCR-RFLP assay using *Sau3AI*, *BanII*, *NspI*, *XbaI*, and *CfrI* enzymes has been described recently and is able to distinguish 9 different PCV2 genotypes (Wen L, Guo X, Yang H: Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet Microbiol.* 110:141-146, 2005). PCV2 RFLP analysis showed that there was a significant change from RFLP type 422 to type 321 in 2005 in Ontario, Canada (Delay J, McEwen B, Carman S, van Dreuel T, Fairles J:
15 Porcine circovirus type 2-associated disease is increasing. *AHL Newsletter.* 9:22, 2005).

In addition to using RFLP analysis to differentiate between type 2A and type 2B porcine circoviruses, it is believed that these two strains may be differentiated on the basis of sequences analysis.

- 20 For example, with sequence analysis it is possible to characterize the genetic information and compare isolates to each other (Choi J, Stevenson GW, Kiupel M, Harrach B, Anothayanontha L, Kanitz CL, Mittal SK: Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 66:217-224, 2002 ; De Boissésou C, Béven V, Bigarré L, Thiéry R, Rose N, Eveno E, Madec F, Jestin A: Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol.* 85:293-304, 2004 ; Fenaux M, Halbur PG, Gill M, Toth TE, Meng XJ: Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs
25 with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol.* 38:2494-2503, 2000; Grierson SS, King DP, Sandvik T,
30

49

Hicks D, Spencer Y, Drew TW, Banks M: Detection and genetic typing of type 2 porcine circovirus in archived pig tissues from the UK. Arch Virol. 149:1171-1183, 2004; Kim JH, Lyoo YS: Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. J Vet Sci. 3:31-39, 2002 ; Mankertz A, Domingo M, Folch JM, LeCann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Plana-Durán J, Soike D: Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. Virus Res. 66:65-77, 2000). To further investigate possible differences among PCV2 isolates it is possible to sequence the entire PCV2 genome or to sequence only ORF2.

The two strains also differ with respect to the pathology, clinical symptoms and mortality associated with the disease itself, with type 2A demonstrating less severe lesions in bodily tissues and a lower mortality rate, as compared to the more severe lesions and higher mortality rate associated with type 2B strains. These clinical parameters may be measured using standard procedures known in the art and as demonstrated in the present invention.

EXAMPLES

The following examples demonstrate certain aspects of the present invention. However, it is to be understood that these examples are for illustration only and do not purport to be wholly definitive as to conditions and scope of this invention. It should be appreciated that when typical reaction conditions (e.g., temperature, reaction times, etc.) have been given, the conditions both above and below the specified ranges can also be used, though generally less conveniently. All parts and percents referred to herein are on a weight basis and all temperatures are expressed in degrees centigrade unless otherwise specified.

EXAMPLE 1

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO NEW TYPE 2B STRAINS OF PORCINE CIRCOVIRUS

A study was planned to test a new vaccine formulation in pigs to assess its efficacy against porcine circovirus and *M. hyopneumoniae*. During the course of the study, it was observed that several of the pigs in the control and vaccinated groups exhibited symptoms of PMWS. It was then confirmed that these pigs were exposed to environmental PCV2 prior to challenge. Molecular analysis on blood and tissue

samples from these pigs revealed that they harbored a type 2B strain that was different than the strain used for challenge. Moreover, sequence analysis established that the PCV2B strain designated FD07 and another new PCV2B strain isolated from a pig on the farm (designated FDJE) were different than other type 2B strains identified in other field studies and from those previously identified by others. The materials and methods for the isolation and characterization of these two new strains of PCV2B are described below.

Materials and Methods

10 Test Animals

Mixed breed male and female conventional pigs were used for this study. There were 24 vaccinates and 24 controls. The pigs were 3 weeks of age at the time of the vaccination.

15 The pigs for the study were purchased from commercial farm and identified using an ear tag. Pigs were obtained from a single source herd. At the time of the first vaccination pigs were seronegative to PCV2 as determined by ELISA (S/P ratio ≤ 0.5). The target population for the study was healthy feeder pigs. With respect to their immune function, the animals selected for this study were deemed as representative of feeder pigs in the United States.

20 The pigs were housed in isolation facilities at FDAH, Fort Dodge, IA. Vaccinates and controls were intermingled throughout the whole study in similar environments. The piglets were blocked into rooms by litter. Housing space was in compliance with applicable regulations of animal welfare. The pigs were fed a standard commercial diet with water and food available *ad libitum*.

25 Pigs requiring medical attention were treated as deemed necessary by the plant veterinarian after consultation with the study investigator.

30 PCV2-PCR testing results of serum samples indicated accidental/environmental PCV2 exposure to piglets in one of the rooms prior to the experimental challenge. The PCV2 was first detected in the serum of one control piglet at 28 days post vaccination, and identified as a porcine circovirus type 2B strain (PCV2B) by DNA sequencing. This PCV2B infected an additional 6 piglets. Two of the unvaccinated control pigs developed PCV2-associated clinical signs and were euthanized at 18 days post challenge due to poor health conditions. The

51

clinical signs included, but were not limited to, inappetence, lethargy, depression, sneezing, coughing, nasal discharge, ocular discharge and dyspnea. Prior to being euthanized, tissue and blood samples were collected for circovirus analysis and sequencing.

5

Sample Collection and Testing

Sample Collection

Nasal Swabs

Nasal swabs were collected on 0 days post vaccination (DPV) for PCV2 isolation to ensure there was no PCV2 infection in the tested animals prior to vaccination. The nasal swab samples were placed into individual sterile tubes containing 3 mL of MEM with lactalbumin hydrolysate (LAH) and gentamicin (60 µg/mL), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL), and stored at or below –50°C until tested.

15

Serum Samples

Pigs were bled for serum samples (no more than ten mL) at 0, 13, 28 DPV, and -1, 7, 14, 20 DPC for ELISA testing, and at 0, 13, 28 DPV, -1, 3, 7, 10, 14, 17, 20 DPC for PCR testing.

20

Tissue Samples

All animals were necropsied at 20/21 DPC. Sections from three lymph nodes (tracheobronchial, iliac and inguinal), tonsil, and spleen were collected and fixed in formalin for histopathology examination and PCV2 immunohistochemistry (IHC) testing.

25

Sample Testing

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Indirect ELISA was used to detect anti-PCV2 antibodies in serum samples using recombinant PCV2 capsid protein (expressed in baculovirus) as capture antigen. Briefly, a 96-well polystyrene plate was coated with positive capture antigen (SF9 cells infected with recombinant baculovirus expressing PCV2 capsid protein). Six wells on each plate were coated with negative capture antigen (SF9 insect cells)

30

5 as a control. After treating the plate with blocking reagent the plate was incubated with test and control serum samples. Each sample of test serum was added into the wells of an immunoplate coated with Positive Capture Antigen (3 wells per each test sample). Positive control serum sample was added into the six wells of immunoplate coated with Positive Capture Antigen (positive control) and six wells of immunoplate coated with Negative Capture Antigen (negative control). Then the HRP conjugated goat anti-swine secondary antibody was added to the plate. Finally, TMB (peroxidase substrate) was added and incubated for an appropriate and consistent time. The color developed was quantified with an ELISA plate reader. Each reagent in the ELISA plate was incubated in a well-defined manner and was washed to remove excess reagent prior to each successive step. The OD of test samples and positive control was calculated by subtracting average OD of negative control from average OD of test samples and positive control. Serum titer was expressed as S/P (sample/positive control) ratio, that is, OD of the test sample divided by that of the positive control sample.

PCR Testing

20 PCV2-specific PCR testing was used to detect the presence of PCV2 viral genomic DNA in serum samples. Viral genomic DNA was purified from serum using QIAGEN MatAttract Virus Mini Kit and QIAGEN BioRobot M48 Workstation. To detect PCV2 specific sequences, a 592-bp fragment was amplified by using ABI AmpliTaq Gold DNA polymerase and gene-specific primers: F1PCV2, 5'-ATGCCCAAGCAAGAA GAATGG-3' (SEQ ID NO:7) and RPCV2, 5'-TGTTTCCAGTATGT GGTTC-3' (SEQ ID NO: 8). The purified viral DNA was used as template and denatured at 95 °C for 10 min. The PCR program of reactions consisted of 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 sec, annealing at 59 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min. Ten µL of PCR product were used to detect 592 bp PCV2 DNA fragment by agarose gel electrophoresis.

30 Histopathology

Tissue samples of spleen, tonsil, and three (tracheobronchial, iliac and inguinal) lymph nodes, were collected from each animal during necropsy, fixed in 10% neutral buffered formalin for 2 to 4 days and embedded in paraffin. Four-

53

micrometer sections were stained with hematoxylin and eosin and examined under the light microscope for histopathologic evaluation.

The samples were evaluated for degree of lymphocyte depletion/histiocytic replacement. Briefly, all tissues were examined in a blinded fashion and given
5 subjective scores for the level of lymphocyte depletion and histiocytic replacement. Ranked score of lymphoid depletion from 0 to 3 was assigned as follows: 0 – normal, 1 – mild lymphoid depletion with loss of overall cellularity, 2 – moderate lymphoid depletion, 3 – severe lymphoid depletion with loss of lymphoid follicle structure. Ranked score of histiocytic replacement from 0 to 3 was assigned in a similar way as
10 follows: 0 – normal, 1 – mild histiocytic-to-granulomatous inflammation, 2 – moderate histiocytic-to-granulomatous inflammation, 3 – severe histiocytic-to-granulomatous inflammation with replacement of follicles.

Histopathological evaluations were conducted by a certified pathologist at the Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State
15 University (Ames, IA).

Immunohistochemistry (IHC) Testing

PCV2-specific antigen in lymph nodes, tonsil and spleen tissues was detected by immunohistochemistry testing. Briefly, four-micrometer sections of
20 tissues were placed on glass slides and treated with xylene to remove paraffin. Deparaffinized sections were quenched for endogenous peroxidase with 3% H₂O₂ in PBS for 20 min. After rinsing with distilled water the sections were incubated at room temperature overnight with rabbit anti PCV2 polyclonal serum diluted 1:1,000 in PBS. After washing with PBS the sections then were incubated with biotinylated goat anti-
25 rabbit IgG for 30 min at room temperature. Then sections were incubated with streptavidin peroxidase conjugate and “visualized” with diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate. The amount of PCV2 antigen was assessed in a blinded fashion based on the level of PCV2 antigen staining. The ranked score was assigned as follows: 0 – no staining, 1 – low level of staining, 2 – medium level of
30 staining, and 3 – high level of staining. The IHC on tissues was conducted at the Veterinary Diagnostic Laboratory in the Iowa State University College of Veterinary Medicine (Ames, IA).

54

RESULTS

Virus Isolation

Nasal swabs were collected on 0 days post vaccination (DPV) for PCV2 isolation to ensure there was no PCV2 infection in the test animals prior to vaccination. No virus was isolated from the nasal swabs of each test animal, indicating the lack of exposure of these pigs to environmental PCV2 infection at the time of the vaccination.

PCV2 Challenge Material Titration

The titration results of the virulent PCV2 challenge material (strain 40895) are shown in Table 1. The average titer of challenge virus from triplicate titrations was 4.6 Log₁₀ FAID₅₀/mL.

Serology

The results of PCV2-specific antibody ELISA are shown in Table 2.

On 0 DPV1, ELISA S/P ratios in controls (Group C) varied from -0.009 to 0.366 with an average S/P ratio of 0.135. Following vaccination, the ELISA antibody titers in the controls declined to background levels by 13 DPV and all piglets remained seronegative until the day of challenge. The average S/P ratios were 0.049 on 13 DPV, 0.023 on 28 DPV, and 0.004 on 35 DPV (-1 DPC), respectively. Following PCV2 challenge the average S/P ratios significantly increased from 0.125 on 7 DPC, 0.612 on 14 DPC, to 0.922 on 20 DPC.

On 0 DPV1, ELISA S/P ratios in vaccinates (Group V) varied from -0.028 to 0.364 with average S/P ratio of 0.126. Following vaccination the average S/P ratios were 0.041 on 13 DPV, 0.097 on 28 DPV, and 0.167 on 35 DPV (-1 DPC). Following PCV2 challenge, a significant boost in ELISA titers in piglets of this group was observed as early as by 7 DPC, with average S/P ratios of 1.069 on 7 DPC, 1.373 on 14 DPC, and 1.356 on 20 DPC.

PCV2 Viremia

The detection of PCV2 viremia by PCV2-specific PCR in sera of vaccinates and controls is summarized in Table 3A. This PCV2-specific PCR is at least 1,000 times more sensitive than the conventional cell culture method.

SS

On -1 days post challenge (DPC), unexpectedly, it was found that 3 out of 24 vaccinates (Pigs #P102, P103, and P104) and 6 out of 24 controls (Pigs # G197, G205, O162, P107, P108 and P110) were detected as positive for PCV2 DNA in the serum samples while all others remained negative. All 9 PCV2 positive pigs were housed in the same room (#12). Unfortunately six PCV2-infected pigs (Pig #P102, P103, P104, P107, P108 and P110) and two non-infected pigs were relocated into Room #13 and commingled with 8 non-infected pigs from Room #11 at -1 DPC due to space requirements. Therefore, all animals in Rooms #12 and 13 were potentially exposed to environmental PCV2.

To investigate the source of PCV2 environmental exposure, the serum samples collected on 0, 13, and 28 DPV, were tested by PCV2-specific PCR. All pigs were PCV2 negative except the Pig #P108 (Control, Room #12) with an extremely strong positive PCR band on 13 DPV. This result suggested that accidental environmental PCV2 exposure originated from Pig #P108, and then spread to the other pigs in Room #12 and #13. The exact origin of this PCV2 is not known, however, most likely from the environment or the farm in which Pig #P108 was infected at undetectable level prior to enrolling in the study.

To determine the genotype of the PCV2 from the environmental exposure, the PCR products from Pig #P108 were cloned for sequencing. DNA sequence analysis indicated that PCV2 from Pig #P108 was a type 2B strain, different from strain-#40895 (2A). The genomes of these two PCV2 strains shared 95.98% DNA sequence identity. To further differentiate experimental PCV2 (strain #40895) challenge from environmental contact challenge (2B from Pig #P108), PCR products from all PCV2 viremic pigs were cloned for DNA sequencing. The results of the genotyping are shown in the Column "PCV2 Challenge": "A" represents that no PCV2B was detected in the serum samples and the challenge took place only by experimental PCV2-#40895 strain; "A + B" represents that in addition to experimental challenge, PCV2B was also detected and all PCV2B were from Pig #P108 due to identical sequence; and "A + (B)" represents that in addition to experimental challenge, pigs were potentially infected with PCV2B because these pigs were commingled with Pig #P108 in Room #12/13. However, all of these pigs were protected from PCV2 challenge.

56

In order to evaluate the impact of the experimental and environmental contact challenges, the PCR results for PCV2 viremia are discussed in three categories: overall comparison (Table 3A), experimental challenge (Table 3B), and experimental and environmental contact challenges (Table 3C).

5 Overall comparison between groups showed that 10/24 (41.7%) vaccinates were positive for the presence of PCV2 DNA in sera, for at least a single positive and inconclusive occurrences. If a single inconclusive occurrence is not accountable, 5/24 (20.8%) vaccinates were PCV2 DNA positive. In contrast, 24/24 (100%) controls were positive for the presence of PCV2 DNA in sera for multiple
10 occurrences. The frequency and density of the PCV2 positive band in the controls were significantly higher and stronger than in the vaccinates (see Table 3A).

Comparison between groups exposed to PCV2 experimental challenge (Table 3B) showed that 1/9 (11.1%) vaccinates were PCV2 DNA positive for only a single positive occurrence. In contrast, 14/14 (100%) controls were positive for the
15 presence of PCV2 DNA in sera for multiple occurrences.

Comparison between groups exposed to PCV2 experimental and environmental contact challenges (Table 3C) showed that 4/15 (26.7%) vaccinates were PCV2 DNA positive, for at least a single positive occurrence. In contrast, 10/10 (100%) controls were positive for the presence of PCV2 DNA in sera for multiple
20 occurrences.

Microscopic Lesions-Lymphoid Depletion

Tissues of lymph nodes, spleen and tonsil were examined microscopically for lymphoid depletion. The total results of microscopic lesions-lymphoid depletion are
25 summarized in Table 4A (number of animals with score 0-3).

Overall comparison between groups showed that an abnormal lymphoid depletion score in at least one tissue was observed in 15/24 (62.5%) of vaccinated pigs, compared to 23/24 (95.8%) of control pigs. Moderate to severe lymphoid depletion lesions were observed in 4/24 (16.7%) vaccinates, compared to 14/24
30 (58.3%) controls.

Comparison between groups exposed to PCV2 experimental challenge (Table 4B) showed that an abnormal lymphoid depletion score in at least one tissue

57

was observed in 6/9 (66.7%) of vaccinated pigs, compared to 13/14 (92.9%) of control pigs.

Comparison between groups exposed to PCV2 experimental and environmental contact challenges (Table 4C) showed that an abnormal lymphoid depletion score in at least one tissue was observed in 9/15 (60%) of vaccinated pigs, compared to 10/10 (100%) of control pigs.

Microscopic Lesions-Histiocytic Replacement

Tissues of lymph nodes, spleen and tonsil were examined microscopically for histiocytic-to-granulomatous inflammation with replacement of follicles. The total results of microscopic lesions-histiocytic replacement are summarized in Table 5.

Overall comparison showed that compared to 22/24 (91.7%) of controls, 15/24 (62.5%) vaccinates were observed with abnormal histiocytic replacement score in at least one lymph tissue.

Immunohistochemistry

The results of detection of amount of PCV2 antigen by IHC staining in lymph nodes, spleen and tonsil are summarized in Table 6 (number of animals with score 0-3).

Overall comparison showed that compared to 23/24 (95.8%) of controls, 7/24 (29.2%) vaccinates were the PCV2 specific IHC staining in at least one lymph tissue.

Post-Challenge Clinical Observations

The results of the daily observations for post-challenge clinical signs in individual pigs are presented in Table 7. No clinical signs were observed in any pig except 2 control pigs (#P108 and O162).

Pig #P108 was observed with coughing on 1 DPC, diarrhea on 10 DPC, thin, diarrhea and inactive on 17 DPC. This pig developed obvious clinical signs of wasting. Due to the poor condition the piglet was euthanized on 18 DPC. Necropsy revealed very little subcutaneous fat, moderate cranioventral consolidation in lungs, empty stomach and intestines. This pig developed PCV-associated disease, supported by the findings in PCV2 viremia (extremely strong PCR positive), severe

58

lymphoid depletion, and high load of PCV2 antigen (by IHC staining) in lymph tissues.

Piglet #O162 was observed to be thin and lame in the left hind leg on 14 DPC. On 17 DPC this pig was observed again to be thin, unable to move, and with
5 swollen tarsal joints in the hind legs. Due to the poor condition the piglet was euthanized on 18 DPC. Necropsy revealed moderate to severe lung consolidation with fibrinous adhesions. Microscopic evaluation of lung tissues showed severe acute bronchopneumonia and chronic focal interstitial fibrosis. This pig developed PCV-associated disease, supported by the findings in PCV2 viremia (extremely
10 strong PCR positive), severe lymphoid depletion, and high load of PCV2 antigen (by IHC staining) in lymph tissues.

Table 1. PCV2 (#40895) Challenge Material Titration

Replicate	*Titer
1	4.6
2	4.8
3	4.4
4	4.6
5	4.6
Ave ± SD	4.6 ± 0.14

*Log₁₀ FAID₅₀ per mL

15 Ave ± SD = Average titer ± Standard Deviation

Sg

Table 2. Seroconversion to PCV2 in Sera of Vaccinated and Control Pigs Measured by PCV2 Antibody ELISA*

PIG ID	GROUP	0 DPV	13 DPV	28 DPV	- 1 DPC	7 DPC	14 DPC	20 DPC
G199	V	0.029	0.022	0.425	0.883	1.298	1.367	1.358
G203	V	0.010	-0.015	-0.007	0.004	0.591	1.373	1.458
G204	V	0.038	-0.002	0.057	0.034	1.399	1.524	1.524
G289	V	0.121	0.055	0.021	0.034	0.938	1.530	1.536
G290	V	0.162	0.035	0.041	0.027	1.007	1.438	1.451
O112	V	0.222	0.062	0.059	0.017	0.520	1.145	1.127
O113	V	0.050	0.007	0.057	0.112	1.164	1.460	1.395
O117	V	-0.028	-0.010	0.381	0.608	1.264	1.334	1.282
O119	V	0.030	-0.007	0.001	-0.013	0.935	1.209	1.196
O156	V	0.058	0.008	0.158	0.272	1.434	1.438	1.416
O158	V	0.099	0.039	0.023	0.128	1.451	1.462	1.447
O159	V	0.082	0.034	0.184	0.234	1.194	1.433	1.415
P102	V	0.108	0.028	0.026	0.017	1.199	1.307	1.321
P103	V	0.206	0.096	0.177	0.238	1.322	1.457	1.371
P104	V	0.139	0.046	0.023	0.034	1.351	1.438	1.394
P109	V	0.179	0.048	0.041	0.630	1.396	1.492	1.409
P113	V	0.113	0.026	0.039	0.011	0.980	1.251	1.368
P115	V	0.141	0.077	0.055	0.077	1.266	1.436	1.353
P145	V	0.069	-0.003	0.120	0.219	1.215	1.521	1.500
P146	V	0.158	0.065	0.030	0.037	0.213	1.372	1.273
P150	V	0.124	0.049	0.009	0.108	0.619	1.265	1.306
P192	V	0.288	0.113	0.173	0.072	0.697	1.399	1.314
P213	V	0.364	0.121	0.116	0.085	0.909	0.847	0.967
P214	V	0.264	0.097	0.110	0.135	1.299	1.444	1.373
Ave (S/P Ratio)		0.126	0.041	0.097	0.167	1.069	1.373	1.356
		0.094	0.039	0.111	0.228	0.334	0.150	0.127

60

G197	C	0.072	0.005	0.017	-0.005	1.011	1.135	1.240
G205	C	0.028	-0.010	-0.003	-0.016	0.389	1.072	1.042
G293	C	0.202	0.033	0.019	-0.011	-0.017	0.376	0.949
G296	C	0.266	0.052	0.032	-0.001	0.016	0.932	1.073
O109	C	0.014	-0.007	-0.012	-0.013	0.009	0.701	1.254
O110	C	0.001	-0.015	-0.017	-0.003	-0.032	0.355	0.704
O111	C	-0.002	-0.019	-0.021	-0.033	-0.034	0.448	0.858
O114	C	-0.009	-0.014	-0.019	-0.028	-0.041	0.159	0.216
O162	C	0.219	0.040	0.039	0.032	0.216	0.536	NA
O164	C	0.057	0.018	-0.005	-0.007	0.019	0.227	0.675
O166	C	0.072	0.003	-0.003	-0.009	0.041	0.914	1.146
P105	C	0.228	0.234	0.035	0.022	0.134	1.376	1.428
P107	C	0.142	0.043	0.037	0.001	0.549	1.102	1.195
P108	C	0.266	0.080	0.039	-0.029	-0.036	-0.029	NA
P110	C	0.204	0.047	0.027	0.024	0.574	0.704	0.772
P112	C	0.069	0.132	0.036	0.019	0.023	0.783	1.170
P116	C	0.080	0.023	0.006	0.012	-0.005	0.338	0.841
P147	C	0.149	0.024	0.029	-0.006	-0.005	0.199	0.597
P148	C	0.033	0.008	0.016	-0.016	0.006	0.642	0.966
P194	C	0.343	0.136	0.106	0.042	0.070	0.208	0.633
P195	C	0.169	0.100	0.046	0.021	0.028	0.816	1.093
P215	C	0.110	0.037	0.032	0.013	0.029	0.433	0.826
P216	C	0.171	0.071	0.044	0.035	0.036	0.600	0.906
P218	C	0.366	0.147	0.082	0.043	0.027	0.664	0.701
Ave (S/P Ratio)		0.135	0.049	0.023	0.004	0.125	0.612	0.922
		0.109	0.063	0.031	0.022	0.256	0.358	0.277

*Results expressed as sample/positive control (S/P) ratios; Ave (S/P Ratio) ± SD = Average S/P Ratio ± Standard Deviation

NA = not determined; V = Vaccinate Group; C = Control Group

62

P146	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P150	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P192	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P213	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P*
P214	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			# of positive	0/24	0/24	0/24	0/24	0%	12.5%	16.7%	20.8%	16.7%	4/24	5/24	4/24	3/24	3/24	4/24	10/24 (5*/24)
			% positive	0%	0%	0%	0%	0%	12.5%	16.7%	20.8%	16.7%	4/24	5/24	4/24	3/24	3/24	4/24	41.7 16.7% (20.8*)%
G197	C	12	A + B	-	-	-	-	-	++	+++	+++	++++	+	+++	+	++	++	±	P
G205	C	12	A + B	-	-	-	-	-	++	+++	+++	++++	-	+++	+	+	+	+	P
G293	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	++	±	±	±	-	P
G296	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	++	++++	-	++++	+	+	+	+	P
O109	C	11-13	A	-	-	-	-	-	-	-	++	++++	-	++++	+	+++	+++	+++	P
O110	C	11-13	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	-	+++	+	+	+	+	P
O111	C	11-13	A	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	+	+	+	+	P
O114	C	11-13	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	P
O162	C	12	A + B	-	-	-	-	-	+	+++	++	++++	-	++	++	++	++	NA	P
O184	C	12	A	-	-	-	-	-	-	±	+	+++	-	+	+++	+	+	±	P
O166	C	12	A + B	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	-	++	++	++	++	+	P
P105	C	12-13	A + B	-	-	-	-	-	-	++++	++	++++	-	++	++++	++	++	+	P
P107	C	12-13	A + B	-	-	-	-	-	+	++++	++	++++	-	++	+++	++	+	+	P
P108	C	12-13	A + B	-	-	-	-	++++	++++	++++	+++	++++	-	+++	+++	+++	+++	NA	P
P110	C	12-13	A + B	-	-	-	-	-	++	+++	++	+++	-	++	+++	+	+	+++	P
P112	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	++	+	+	+	P

P116	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+	P
P147	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	P*
P148	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+++	+	P
P194	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	±	+	P
P195	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+	+	+++	P
P215	C	12	A + B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	+	+	+	P
P216	C	12	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	±	++	+	P
P218	C	12	A + B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	±	-	P
																		24/24
			# of positive	0/24	0/24	1/24	6/24	11/24	23/24	22/24	24/24	24/24	21/24	18/22	24/24	23*/24)		
			% positive	0%	0%	4.2%	25.0%	45.8%	95.8%	91.7%	100%	87.5%	81.8%	81.8%	100	95.8**)		

V = Vaccinate Group; C = Control Group; NA = not determined; Rooms 11 or 12: piglets were housed during whole study (vaccination and challenge phases); Rooms 11-13 and 12-13: piglets were housed in Room 11 or 12 during vaccination phase and relocated into Room 13 on ODPC (challenge phase).

PCV2 Challenge Strain: A = experimental challenge-PCV2 #40895; A + (B) = In addition to experimental challenge-PCV2 #40895, potential environmental contact challenge due to intermingling with Pig #108 during either vaccination or challenge phase. However, these pigs were protected from PCV2 challenge, and no PCR product can be sequenced for PCV2B; A + B = experimental challenge-PCV2 #40895, environmental contact challenge due to Pig #108, and PCR product was sequenced and identified as PCV2B from the same source (Pig #108)

Score of PCR band intensity: - Negative; ± Very faint marginally visible PCR band; + Positive; ++ Strong positive; +++ Very strong positive; +++++ Extremely strong positive; PCV2 viremia: - = Negative; P = positive; P* = inconclusive (a single occurrence or two of inconclusive PCR band)

63

64

Table 3B. Detection of PCV2 Viremia by PCV2-Specific PCR in Sera of Vaccinated and Control Pigs: Experimental PCV2 (#40895) Challenge

PIG ID	GROUP	ROOM	PCV2 CHALLENGE	0	13	28	-1	3	7	10	14	17	20	PCV2 Viremia
G289	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
G290	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
O119	V	11-13	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	P
P113	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P115	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P145	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P146	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	P*
P150	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P192	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			# of positive	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	2/9	1/9	0/9	0/9	1/9	4/9 (1*9)
			% positive	0%	0%	0%	0%	0%	22.2%	11.1%	0%	0%	11.1%	44.4 (11.1*)%
G293	C	11	A	-	-	-	-	-	++	+	±	±	-	P
G296	C	11	A	-	-	-	-	-	++	++++	+	+	+	P
O109	C	11-13	A	-	-	-	-	-	++	++++	+++	++	+++	P
O110	C	11-13	A	-	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	P
O111	C	11-13	A	-	-	-	-	-	++	++	++	+	+	P
O114	C	11-13	A	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	P

65

O164	C	12	A	-	-	-	-	-	-	±	+	+++	++	+	±	P
P112	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	+	P
P116	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+	P
P147	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	P*
P148	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+++	+	P
P194	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	±	+	P
P195	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+++	P
P216	C	12	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±	++	+	P
			# of positive	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	1/14	13/14	12/14	14/14	11/14	11/14	11/14	14/14 (13*/14)
			% positive	0%	0%	0%	0%	0%	7.1%	92.9%	85.7%	100%	78.6%	78.6%	78.6%	100 (92.9*)%

V = Vaccinate Group; C = Control Group; NA = not determined
Rooms 11 and 12: piglets were housed during whole study (vaccination and challenge phases); Rooms 11-13 and 12-13: piglets were housed in Room 11 or 12 during vaccination phase and relocated into Room 13 on ODPC (challenge phase).
PCV2 Challenge Strain: A = experimental challenge-PCV2 #40895
Score of PCR band intensity: - Negative; ± Very faint marginally visible PCR band; + Positive; ++ Strong positive; +++ Very strong positive; ++++ Extremely strong positive
PCV2 viremia: - = Negative; P = positive; P* = inconclusive (a single occurrence or two of inconclusive PCR band)

66

Table 3C. Detection of PCV2 Viremia by PCV2-Specific PCR in Sera of Vaccinated and Control Pigs: Experimental PCV2 (#40895) and Environmental Contact Challenges

FIG ID	GROUP ROOM	PCV2 CHALLENGE	0	13	28	-1	3	7	10	14	17	20	PCV2 Viremia
G199	V	12 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G203	V	12 A + B	-	-	-	-	+	++	++++	+++	++	++	P
G204	V	12 A + B	-	-	-	-	++	++	++	++	+	+	P
O112	V	11-13 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O113	V	11-13 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O117	V	11-13 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O156	V	12 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O158	V	12 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O159	V	12 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P102	V	12-13 A + B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	P
P103	V	12-13 A + B	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	P*
P104	V	12-13 A + B	-	-	-	++	++++	++	+++	+++	+	±	P
P109	V	12-13 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P213	V	12 A + (B)	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	P*
P214	V	12 A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		# of positive	0/15	0/15	0/15	3/15	4/15	3/15	3/15	3/15	3/15	3/15	6/15 (4*/15)
		% positive	0%	0%	0%	20%	26.7%	20%	20%	20%	20%	20%	40 (26.7*)%
G197	C	12 A + B	-	-	-	++	+++	+++	++++	+++	++	++	P
G205	C	12 A + B	-	-	-	++	+++	+++	++++	+++	+	+	P

67

O162	C	12	A + B	-	-	-	-	+	+++	++	++++	+++	++	NA	P
O166	C	12	A + B	-	-	-	-	-	++	++	+++	++	++	+	P
P105	C	12-13	A + B	-	-	-	-	-	++++	++	++++	++	++	+	P
P107	C	12-13	A + B	-	-	-	-	+	++++	++	++++	++	++	+	P
P108	C	12-13	A + B	-	-	-	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	NA	P
P110	C	12-13	A + B	-	-	-	-	++	+++	++	+++	+	+	+++	P
P215	C	12	A + B	-	-	-	-	-	+	+	++	+	+	+	P
P218	C	12	A + B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	±	-	P
			# of positive	0/10	0/10	1/10	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/8	10/10
			% positive	0%	0%	10%	60%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	87.5%	100 %

V = Vaccinate Group; C = Control Group; NA = not determined

Rooms 11 and 12: piglets were housed during whole study (vaccination and challenge phases); Rooms 11-13 and 12-13: piglets were housed in Room 11 or 12 during vaccination phase and relocated into Room 13 on ODPC (challenge phase).

PCV2 Challenge Strain: A + (B) = In addition to experimental challenge-PCV2 #40895, potential environmental contact challenge due to intermingling with Pig #108 during either vaccination or challenge phase. However, these pigs were protected from PCV2 challenge, and no PCR product can be sequenced for PCV2B; A + B = experimental challenge-PCV2 #40895, environmental contact challenge due to Pig #108, and PCR product was sequenced and identified as PCV2B from the same source (Pig #108)

Score of PCR band intensity: - Negative; ± Very faint marginally visible PCR band; + Positive; ++ Strong positive; +++ Very strong positive; ++++ Extremely strong positive

PCV2 viremia: - = Negative; P = positive; P* = inconclusive (a single occurrence or two of inconclusive PCR band)

69

Table 4A. Lymphoid Depletion in Lymph Nodes, Spleen and Tonsil: Overall Comparison*

Group	Number of Animals with Score*			
	0	1	2	3
Iliac Lymph Node (IL LN)				
Vaccinate	13	7	2	2
Control	4	9	3	8
Inguinal Lymph Node (IG LN)				
Vaccinate	15	7	1	1
Control	5	10	6	3
Tracheobronchial Lymph Node (TB LN)				
Vaccinate	12	11	0	1
Control	2	9	9	4
Spleen				
Vaccinate	15	9	0	0
Control	7	6	8	3
Tonsil				
Vaccinate	19	4	1	0
Control	10	4	7	3

*Lymphoid depletion score: 0 = Normal, 1 = Mild, 2 = Moderate, and 3 = Severe

69

Table 4B. Lymphoid Depletion in Lymph Nodes, Spleen and Tonsil: Experimental PCV2 (#40895) Challenge

Group	Number of Animals with Score*			
	0	1	2	3
Iliac Lymph Node (IL LN)				
Vaccinate	4	4	0	1
Control	3	7	2	2
Inguinal Lymph Node (IG LN)				
Vaccinate	6	3	0	0
Control	5	7	2	0
Tracheobronchial Lymph Node (TB LN)				
Vaccinate	4	5	0	0
Control	2	8	3	1
Spleen				
Vaccinate	6	3	0	0
Control	7	5	2	0
Tonsil				
Vaccinate	9	0	0	0
Control	10	2	2	0

*Lymphoid depletion score: 0 = Normal, 1 = Mild, 2 = Moderate, and 3 = Severe

Table 4C. Lymphoid Depletion in Lymph Nodes, Spleen and Tonsil: Experimental PCV2A (#40895) and Environmental Contact Challenges

Group	Number of Animals with Score*			
	0	1	2	3
Iliac Lymph Node (IL LN)				
Vaccinate	9	3	2	1
Control	1	2	1	6
Inguinal Lymph Node (IG LN)				
Vaccinate	9	4	1	1
Control	0	3	4	3
Tracheobronchial Lymph Node (TB LN)				
Vaccinate	8	6	0	1
Control	0	1	6	3
Spleen				
Vaccinate	9	6	0	0
Control	0	1	6	3

Handwritten mark resembling a stylized 'Z' or '7'.

Tonsil				
Vaccinate	10	4	1	0
Control	0	2	5	3

*Lymphoid depletion score: 0 = Normal, 1 = Mild, 2 = Moderate, and 3 = Severe

Table 5. Histiocytic-to-Granulomatous Inflammation with Replacement of Follicles in Lymph Nodes, Spleen and Tonsil: Overall Comparison

Group	Number of Animals with Score*			
	0	1	2	3
Iliac Lymph Node (IL LN)				
Vaccinate	14	2	7	1
Control	4	8	7	5
Inguinal Lymph Node (IG LN)				
Vaccinate	18	3	3	0
Control	8	9	4	3
Tracheobronchial Lymph Node (TB LN)				
Vaccinate	14	7	3	0
Control	4	9	9	2

72

Spleen				
Vaccinate	18	2	4	0
Control	9	4	8	3
Tonsil				
Vaccinate	19	4	1	0
Control	11	5	4	4

* Histiocytic replacement score: 0 = Normal, 1 = Mild, 2 = Moderate, and 3 = Severe

Table 6. Amount of PCV2-Specific Antigen Demonstrated by Immunohistochemistry (IHC) in Lymph Nodes, Spleen and Tonsil: Overall Comparison*

Group	Number of Animals with Score*		
	0	1	2
Iliac Lymph Node (IL LN)			
Vaccinate	17	2	5
Control	4	6	7
Inguinal Lymph Node (IG LN)			
Vaccinate	21	1	2
Control	10	9	4
Tracheobronchial Lymph Node (TB LN)			
			1

73

Vaccinate	20	2	1	1
Control	7	12	3	2
Spleen				
Vaccinate	20	2	2	0
Control	9	9	4	2
Tonsil				
Vaccinate	21	1	2	0
Control	5	10	6	3

IHC staining score: 0 = No, 1 = Low Level, 2 = Medium Level, and 3 = High Level



What is claimed is:

1. An isolated porcine circovirus whose genome comprises the nucleic acid molecule of either of SEQ ID NOs: 1 or 2, or whose genome comprises a nucleic acid molecule having at least 95% sequence homology to either of SEQ ID NOs: 1 or 2.
2. The isolated porcine circovirus of claim 1, whose genome comprises the nucleic acid molecule of either of SEQ ID NOs: 1 or 2.
3. The isolated porcine circovirus of either of claims 1 or 2, which is a type 2B porcine circovirus.
4. The isolated porcine circovirus of claim 3, having an ORF2 protein with at least 92 % sequence identity to either of SEQ ID NOs: 3 or 4.
5. The isolated porcine circovirus of claim 2, wherein the nucleic acid encoding the ORF2 protein comprises residues 1033-1734 of SEQ ID NOs: 5 or 6.
6. An isolated nucleic acid molecule encoding a pathogenic type 2B porcine circovirus, or encoding at least one protein from said circovirus, wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5 or 6 or a nucleotide sequence having at least 95% sequence homology to any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5 or 6.
7. The isolated nucleic acid molecule of claim 6, comprising the nucleotide sequence of any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5 or 6.
8. The isolated nucleic acid molecule of either of claims 6 or 7, wherein the nucleic acid encoding an ORF2 protein is found at residues 1033-1734 of SEQ ID NOs: 5 or

9. The isolated nucleic acid molecule of claim 8, which encodes an ORF2 protein having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 3 or 4.

10. An immunogenic composition comprising the isolated porcine circovirus of any of claims 1- 5, and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

11. The immunogenic composition of claim 10, wherein the isolated porcine circovirus is attenuated or inactivated.

12. The immunogenic composition of claim 11, further comprising at least one other microorganism, or an antigen obtained from said microorganism against which an immune response is desired.

13. The immunogenic composition of claim 12, wherein the other microorganism is selected from the group consisting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), porcine parvovirus (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, a pathogen causative of Swine Transmissible Gastroenteritis, and a second different strain of porcine circovirus.

14. The immunogenic composition of claim 13, wherein the second different strain of porcine circovirus is a type 2A or a type 2B circovirus.

15. An immunogenic composition comprising at least one isolated nucleic acid molecule of any of claims 6- 9, and a pharmaceutically acceptable adjuvant.

16. The immunogenic composition of claim 15, further comprising a nucleic acid molecule encoding at least one antigen from at least one other microorganism against which an immune response is desired.

17. The immunogenic composition of claim 16, wherein the other microorganism is selected from the group consisting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), porcine parvovirus (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, a pathogen causative of Swine Transmissible Gastroenteritis and a second different strain of porcine circovirus.

18. The immunogenic composition of claim 17, wherein the second different strain of porcine circovirus is a type 2A or a type 2B circovirus.

19. The composition of either of claims 10 or 15, wherein the composition is administered in one dose or in multiple doses subcutaneously, intramuscularly, intranasally, transdermally, intrahepatically, or via the intralymphoid route.

20. A method of immunizing a pig against viral infection or postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), or for preventing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in a pig caused by a strain of PCV2, comprising administering to the pig an immunogenically effective amount of a composition comprising any one or more of the following:

a) an immunogenically effective amount of the type 2 porcine circovirus of any of claims 1-5;

b) a nucleic acid molecule encoding the type 2 porcine circovirus of a);

c) an immunogenically effective amount of at least one protein isolated from the type 2 porcine circovirus of any of claims 1-5; or

d) a nucleic acid molecule encoding at least one protein of c).

21. The method of claim 20, wherein the method further comprises administering an immunogenically effective amount of a second different immunogenic composition

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



prior to, in conjunction with, or subsequent to, administering the type 2 porcine circovirus immunogenic composition.

22. The method of claim 21, wherein the second different immunogenic composition comprises an immunogenically effective amount of at least one other microorganism that is pathogenic to pigs, or at least one antigen obtained from said microorganism or a nucleic acid molecule encoding said antigen, wherein the microorganism is selected from the group consisting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), porcine parvovirus (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, a pathogen causative of Swine Transmissible Gastroenteritis and a second different strain of porcine circovirus.

23. The method of claim 22, wherein the second different strain of porcine circovirus is a type 2A or a 2B circovirus.

24. A vector comprising at least one exogenous nucleic acid molecule encoding a type 2A or type 2B porcine circovirus protein, wherein the porcine circovirus protein is an ORF2 protein, and wherein the exogenous nucleic acid molecule encoding said protein is set forth in residues 1033-1734 of SEQ ID NOs: 5 or 6.

25. The vector of claim 24, wherein the vector is a raccoon poxvirus vector.

26. The vector of either of claims 24 or 25, further comprising one or more exogenous nucleic acid molecules encoding an antigen from a microorganism that is pathogenic to pigs, wherein the microorganism is selected from the group consisting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), porcine parvovirus (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*,



Salmonella choleraesuis, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, a pathogen causative of Swine Transmissible Gastroenteritis and a second different strain of porcine circovirus.

27. A method of determining if a porcine mammal has, or is at risk for developing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), the method comprising:

(I) measuring an amount of a PCV2 nucleic acid or protein encoded by said nucleic acid in a tissue sample derived from the mammal, wherein said PCV2 nucleic acid or protein is:

- a) a nucleic acid corresponding to any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5 or 6, or a nucleic acid derived therefrom;
- b) a protein comprising either of SEQ ID NOs: 3 or 4;
- c) a nucleic acid comprising a sequence hybridizable to any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5 or 6, or their complements under conditions of high stringency, or a protein comprising a sequence encoded by said hybridizable sequence;
- d) a nucleic acid at least 95% homologous to any of SEQ ID NOs: 1, 2, 5, or 6, or their complement as determined using the NBLAST algorithm; or a protein encoded thereby; and

(II) comparing the amount of said nucleic acid or protein in the tissue sample from the mammal suspected of having, or at risk for developing PMWS with the amount of nucleic acid or protein present in a tissue sample from a normal mammal, or predetermined standard for a normal tissue sample, wherein an elevated amount of said nucleic acid or protein in the tissue sample from the porcine mammal having or suspected of having PMWS compared to the amount in the normal tissue sample or pre-determined standard for a normal tissue sample indicates that the mammal has or is at risk of developing PMWS.

28. The method of claim 27, wherein the tissue sample is selected from the group consisting of inguinal superficial lymph node, tracheobronchial lymph node, submandibular lymph node, lung, tonsil, spleen, liver, kidney, whole blood and blood cells.

Figure 1 (SEQ ID NO: 1)

81

Complete Sequence of PCV2B-FD07 Genome

Comments for PCV2B-FD07 genome: 1767 bp ssDNA virus

Replication (replicase) gene: bases 51-995
 Capsid gene: bases 1033-1734 C

```

        10          20          30          40          50          60
AGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
                                     M P S

        70          80          90          100         110         120
AGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N

       130          140          150          160          170          180
CCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
S E D E R K K I R D L P I S L F D Y F

       190          200          210          220          230          240
TTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N

       250          260          270          280          290          300
TGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I

                                     >PstI
                                     |
       310          320          330          340          350          360
AAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L

                                     >BglIII
                                     |
                                     >SacI
                                     |
       370          380          390          400          410          420
TTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
I E C G A P R S Q G Q R S D L S T A V

       430          440          450          460          470          480
CCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
T L L E S G S L V T V A E Q Y P V T F
    
```

Figure 1 (SEQ ID NO: 1) continued

82

490 500 510 520 530 540
TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
V R N F R G L A E L L K V S G K M Q K R

550 560 570 580 590 600
ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
D W K T N V H V I V G P P G C G K S K W

610 620 630 640 650 660
CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
A A N F A D P E T T Y W K P P R N K W W

>NcoI
|
670 680 690 700 710 720
ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
D G Y H G E E V V V I D D F Y G W L P W

>EcoRV
|
>ClaI
|
730 740 750 760 770 780
ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGT
D D L L R L C D R Y P L T V E T K G G T

790 800 810 820 830 840
TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
V P F L A R S I L I T S N Q T P L E W Y

850 860 870 880 890 900
CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
S S T A V P A V E A L Y R R I T S L V F

910 920 930 940 950 960
GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCC
W K N A T E Q S T E E G G Q F V T L S P

>NdeI
|
970 980 990 1000 1010 1020
CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
P C P E F P Y E I N Y

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
<* P N L P P D K L N F E R F Q V

1090 1100 1110 1120 1130 1140
ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTTCGA ACGCAGTGCC
<Y M T V R I N Y E Q D Y I S N E F A T G

83

Figure 1 (SEQ ID NO: 1) continued

```

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTCCTTTT
<L G V H D V N G A T Q L R L W L Q N R K

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTTGTTTGGT TGGAAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
<N N P Q F Y D I T S D L V P K P T F Y R

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
<S H Y S F P Q T I T H R S S Y N V Y P D

                                     >XbaI
                                     |
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
<Y T L A T A K T V F N D D L I V A S S G

                                     >EcoRI
                                     |
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
<V G R D G Q T I P S C P W F E V K V K R

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
<I R Y Y E F P V S R P N S G G G P P L F

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCGTTCTGA CTGTGGTTCT
<D N I N F R M M D V A W S P T R V T T R

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
<K I T Y G F T R S L R T N F I G N K R R

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
<W R Y R H R P H V L W P R R R L I Q G L

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATAGCTGA
<H S R P R H R R R R Y R R R P Y T M

      1750      1760
AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATT
```

84

Figure 2 (SEQ ID NO: 2)

Complete Sequence of PCV2B-FDJE Genome

Comments for PCV2B-FDJE genome: 1767 bp ssDNA virus

Replication (replicase) gene: bases 51-995
Capsid gene: bases 1033-1734c

10	20	30	40	50	60
ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCACCT	CAGCAGCAAC	ATGCCCAGCA
					M P S
70	80	90	100	110	120
AGAAGAATGG	AAGAAGCGGA	CCCCAACCCC	ATAAAAGGTG	GGTGTTCCT	CTGAATAATC
K K N G	R S G	P Q P	H K R W	V F T	L N N
130	140	150	160	170	180
CTTCCGAAGA	CGAGCGCAAG	AAAATACGGG	ATCTTCCAAT	ATCCCTATTT	GATTATTTTA
P S E D	E R K	K I R	D L P I	S L F	D Y F
190	200	210	220	230	240
TTGTTGGCGA	GGAGGGTAAT	GAGGAAGGAC	GAACACCTCA	CCTCCAGGGG	TTCGCTAATT
I V G E	E G N	E E G	R T P H	L Q G	F A N
250	260	270	280	290	300
TTGTGAAGAA	GCAGACTTTT	AATAAAGTGA	AGTGGTATTT	GGGTGCCCCG	TGCCACATCG
F V K K	Q T F	N K V	K W Y L	G A R	C H I
>PstI					
310	320	330	340	350	360
AGAAAGCCAA	AGGAACAGAT	CAGCAGAATA	AAGAATACTG	CAGTAAAGAA	GGTAACTTAC
E K A K	G T D	Q Q N	K E Y C	S K E	G N L
>BglIII					
>SacI					
370	380	390	400	410	420
TGATTGAGTG	TGGAGCTCCT	AGATCTCAGG	GACAACGGAG	TGACCTGTCT	ACTGCTGTGA
L I E C	G A P	R S Q	G Q R S	D L S	T A V
430	440	450	460	470	480
GTACCTTGTT	GGAGAGCGGG	AGTCTGGTGA	CCGTTGCAGA	GCAGTACCCT	GTAACGTTTG
S T L L	E S G	S L V	T V A E	Q Y P	V T F

Figure 2 (SEQ ID NO: 2) continued

490 500 510 520 530 540
TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
V R N F R G L A E L L K V S G K M Q K R

550 560 570 580 590 600
ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
D W K T N V H V I V G P P G C G K S K W

610 620 630 640 650 660
CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
A A N F A D P E T T Y W K P P R N K W W

>NcoI
|
670 680 690 700 710 720
ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
D G Y H G E E V V V I D D F Y G W L P W

>EcoRV
|
>ClaI
|
730 740 750 760 770 780
ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG
D D L L R L C D R Y P L T V E T K G G T

790 800 810 820 830 840
TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
V P F L A R S I L I T S N Q T P L E W Y

850 860 870 880 890 900
CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
S S T A V P A V E A L Y R R I T S L V F

910 920 930 940 950 960
GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCC
W K N A T E Q S T E E G G Q F V T L S P

>NdeI
|
970 980 990 1000 1010 1020
CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
P C P E F P Y E I N Y *>

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
<* P N L P P D K L N F E R F Q V

86

Figure 2 (SEQ ID NO: 2) continued

```

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC
  Y  M  T  V  R  I  N  Y  E  Q  D  Y  I  S  N  E  F  A  T  G

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTCCTTTT
  L  G  V  H  D  V  N  G  A  T  Q  L  R  L  W  L  Q  N  R  K

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTCGGGGG TAAAGTAGCG
  N  N  P  Q  F  Y  D  I  T  S  D  L  V  P  K  P  T  F  Y  R

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
  S  H  Y  S  F  P  Q  T  I  T  H  R  S  S  Y  N  V  Y  P  D

                                     >XbaI
                                     |
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
  Y  T  L  A  T  A  K  T  V  F  N  D  D  L  I  V  A  S  S  G

                                     >EcoRI
                                     |
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
  V  G  R  D  G  Q  T  I  P  S  C  P  W  F  E  V  K  V  K  R

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
  I  R  Y  Y  E  F  P  V  S  R  P  N  S  G  G  G  P  P  L  F

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGC GTTCTGA CTGTGGTTCG
  D  N  I  N  F  R  M  M  D  V  A  W  S  P  T  R  V  T  T  R

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
CTTGATAGTG TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
  K  I  T  Y  G  F  T  R  S  L  R  T  N  F  I  G  N  K  R  R

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
  W  R  Y  R  H  R  P  H  V  L  W  P  R  R  R  L  I  Q  G  L

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATATCTGA
  H  S  R  P  R  H  R  R  R  R  Y  R  R  R  P  Y  T  M

      1750      1760
AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT
```

Figure 3 (SEQ ID NO: 3)

LOCUS PCV2B-FD07 ORF2 234 AA 19-DEC-2007
SOURCE FDAH

FEATURES Location/Qualifiers
1..234
/note="PCV2b-FD07 Capsid Protein (ORF2)"

ORIGIN -
1 M T Y P R R R Y R R R R H R P R S H L G Q I L R R R P W L V H P R H R Y R W R R K N G I F N T R L S R T F G Y T I K R T
61 T V R T P S W A V D M M R F N I N D F L P P G G G S N P R S V P F E Y Y R I R K V K V E F W P C S P I T Q G D R G V G S
121 S A V I L D D N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S S R H T I T Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D Y F Q P N N K R
181 N Q L W L R L Q T A G N V D H V G L G T A F E N S I Y D Q E Y N I R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P *



Figure 4 (SEQ ID NO: 4)

LOCUS PCV2B-FDJE 234 AA 19-DEC-2007
SOURCE FDAH

FEATURES Location/Qualifiers
1..234
/note="PCV2B-FDJE Capsid (ORF2) Protein"

ORIGIN -
1 MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWL V HPRHRYRWRR KNGIFNTRL S RTFGYTIKRT
61 TVRTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
121 SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFSYHSRY FTFKPVLDST IDYFQPNNKR
181 NQLWLRQLTA GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDPP LNP*

Figure 5 (SEQ ID NO: 5)

LOCUS PCV2B-FD07 1767 BP SS-DNA CIRCULAR SYN 30-SEP-2006
SOURCE FDAH

FEATURES Location/Qualifiers
CDS 51..995
/note="Replicase gene (ORF1)"
CDS complement(1033..1734)
/note="Capsid gene (ORF2)"

BASE COUNT 447 A 360 C 499 G 461 T 0 OTHER
ORIGIN -

1 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
61 AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
121 CTTC CGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
181 TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
241 TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
301 AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
361 TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
421 GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCTT GTAACGTTTG
481 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
541 ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
601 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
661 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
721 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG
781 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
841 CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
901 GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCCC
961 CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
1021 TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
1081 ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTTCGA ACGCAGTGCC
1141 GAGGCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTCCTTTT
1201 GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
1261 GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
1321 ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
1381 CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
1441 TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
1501 GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCCTTCTGA CTGTGGTTTCG
1561 CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
1621 CCAGCGGTAA CGGTGCGGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
1681 ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATAGCTGA
1741 AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

Figure 6 (SEQ ID NO: 6)

90

LOCUS PCV2B-FDJE 1767 BP DS-DNA SYN 05-NOV-2007
SOURCE FDAH

FEATURES Location/Qualifiers
CDS 51..995
/note="Replicase gene (Orf1)"
CDS complement(1033..1734)
/note="Capsid Gene (Orf2)"

BASE COUNT 446 A 359 C 499 G 463 T 0 OTHER
ORIGIN -

1 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
61 AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
121 CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
181 TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
241 TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
301 AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGTAACCTTAC
361 TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
421 GTACCTTGTG GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
481 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
541 ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
601 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
661 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
721 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG
781 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
841 CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
901 GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCC
961 CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
1021 TTTTATTATT CATTAAAGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
1081 ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC
1141 GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTTCTTTT
1201 GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
1261 GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
1321 ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
1381 CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
1441 TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
1501 GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCGTTCTGA CTGTGGTTCG
1561 CTTGATAGTG TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCTTTCT
1621 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
1681 ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATATCTGA
1741 AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

Figure 1 (SEQ ID NO: 1)

Complete Sequence of PCV2B-FD07 Genome

al

Comments for PCV2B-FD07 genome: 1767 bp ssDNA virus

Replication (replicase) gene: bases 51-995

Capsid gene: bases 1033-1734 C

```

      10          20          30          40          50          60
ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
                                     M P S

      70          80          90          100         110         120
AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCAC TCTGAATAATC
K K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N

     130          140          150          160          170          180
CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
P S E D E R K K I R D L P I S L F D Y F

     190          200          210          220          230          240
TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
I V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N

     250          260          270          280          290          300
TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
F V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I

                                     >PstI
                                     |
     310          320          330          340          350          360
AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
E K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L

                                     >BglIII
                                     |
                                     >SacI
                                     |
     370          380          390          400          410          420
TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
L I E C G A P R S Q G Q R S D L S T A V

     430          440          450          460          470          480
GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
S T L L E S G S L V T V A E Q Y P V T F
```

Figure 1 (SEQ ID NO: 1) continued

92

490 500 510 520 530 540
 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
 V R N F R G L A E L L K V S G K M Q K R

550 560 570 580 590 600
 ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
 D W K T N V H V I V G P P G C G K S K W

610 620 630 640 650 660
 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
 A A N F A D P E T T Y W K P P R N K W W

>NcoI

670 680 690 700 710 720
 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
 D G Y H G E E V V V I D D F Y G W L P W

>EcoRV

>ClaI

730 740 750 760 770 780
 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGT
 D D L L R L C D R Y P L T V E T K G G T

790 800 810 820 830 840
 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
 V P F L A R S I L I T S N Q T P L E W Y

850 860 870 880 890 900
 CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
 S S T A V P A V E A L Y R R I T S L V F

910 920 930 940 950 960
 GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCC
 W K N A T E Q S T E E G G Q F V T L S P

>NdeI

970 980 990 1000 1010 1020
 CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
 P C P E F P Y E I N Y

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
 <* P N L P P D K L N F E R F Q V

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTTCGA ACGCAGTGCC
 <Y M T V R I N Y E Q D Y I S N E F A T G

Figure 1 (SEQ ID NO: 1) continued

93

```

1150      1160      1170      1180      1190      1200
GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTCCTTTT
<L G V H D V N G A T Q L R L W L Q N R K

1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTTGTTTGGT TGGGAAGTAAT CAATAGTGGG ATCTAGGACA GGTTCGGGGG TAAAGTAGCG
<N N P Q F Y D I T S D L V P K P T F Y R

1270      1280      1290      1300      1310      1320
GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
<S H Y S F P Q T I T H R S S Y N V Y P D

                                >XbaI
                                |
1330      1340      1350      1360      1370      1380
ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
<Y T L A T A K T V F N D D L I V A S S G

                                >EcoRI
                                |
1390      1400      1410      1420      1430      1440
CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
<V G R D G Q T I P S C P W F E V K V K R

1450      1460      1470      1480      1490      1500
TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
<I R Y Y E F P V S R P N S G G G P P L F

1510      1520      1530      1540      1550      1560
GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCGTTCTGA CTGTGGTTCTG
<D N I N F R M M D V A W S P T R V T T R

1570      1580      1590      1600      1610      1620
CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
<K I T Y G F T R S L R T N F I G N K R R

1630      1640      1650      1660      1670      1680
CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
<W R Y R H R P H V L W P R R R L I Q G L

1690      1700      1710      1720      1730      1740
ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATAGCTGA
<H S R P R H R R R R Y R R R P Y T M

1750      1760
AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

```

Figure 2 (SEQ ID NO: 2)

Complete Sequence of PCV2B-FDJE Genome

al

Comments for PCV2B-FDJE genome: 1767 bp ssDNA virus

Replication (replicase) gene: bases 51-995
Capsid gene: bases 1033-1734c

```

      10      20      30      40      50      60
ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
                                     M P S

      70      80      90     100     110     120
AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
K K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N

     130     140     150     160     170     180
CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
P S E D E R K K I R D L P I S L F D Y F

     190     200     210     220     230     240
TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
I V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N

     250     260     270     280     290     300
TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
F V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I

                                     >PstI
                                     |
     310     320     330     340     350     360
AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGTAACTTAC
E K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L

                                     >BglII
                                     |
                                     >SacI
                                     |
     370     380     390     400     410     420
TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
L I E C G A P R S Q G Q R S D L S T A V

     430     440     450     460     470     480
GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
S T L L E S G S L V T V A E Q Y P V T F

```

Complete Sequence of PCV2B-FDJE

Figure 2 (SEQ ID NO: 2) continued

05

490	500	510	520	530	540
TCAGAAATTT	CCGCGGGCTG	GCTGAAC TTT	TGAAAGTGAG	CGGGAAAATG	CAGAAGCGTG
V R N F	R G L	A E L	L K V S	G K M	Q K R
550	560	570	580	590	600
ATTGGAAGAC	TAATGTACAC	GTCATTGTGG	GGCCACCTGG	GTGTGGTAAA	AGCAAATGGG
D W K T	N V H	V I V	G P P G	C G K	S K W
610	620	630	640	650	660
CTGCTAATTT	TGCAGACCCG	GAAACCACAT	ACTGGAAACC	ACCTAGAAAC	AAGTGGTGGG
A A N F	A D P	E T T	Y W K P	P R N	K W W

>NcoI

670	680	690	700	710	720
ATGGTTACCA	TGGTGAAGAA	GTGGTTGTTA	TTGATGACTT	TTATGGCTGG	CTGCCCTGGG
D G Y H	G E E	V V V	I D D F	Y G W	L P W

>EcoRV

>ClaI

730	740	750	760	770	780
ATGATCTACT	GAGACTGTGT	GATCGATATC	CATTGACTGT	AGAGACTAAA	GGTGGAACTG
D D L L	R L C	D R Y	P L T V	E T K	G G T
790	800	810	820	830	840
TACCTTTTTT	GGCCCGCAGT	ATTCTGATTA	CCAGCAATCA	GACCCCGTTG	GAATGGTACT
V P F L	A R S	I L I	T S N Q	T P L	E W Y
850	860	870	880	890	900
CCTCAACTGC	TGTCCCAGCT	GTAGAAGCTC	TTTATCGGAG	GATTACTTCC	TTGGTATTTT
S S T A	V P A	V E A	L Y R R	I T S	L V F
910	920	930	940	950	960
GGAAGAATGC	TACAGAACAA	TCCACGGAGG	AAGGGGGCCA	GTTCGTCACC	CTTTCCCCCC
W K N A	T E Q	S T E	E G G Q	F V T	L S P

>NdeI

970	980	990	1000	1010	1020
CATGCCCTGA	ATTTCCATAT	GAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTTATCACT	TCGTAATGGT
P C P E	F P Y	E I N	Y >		
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TTTTATTATT	CATTAAGGGT	TAAGTGGGGG	GTCTTTAAGA	TTAAATTCTC	TGAATTGTAC
<*	P N	L P P	D K L	N F E R	F Q V

Figure 2 (SEQ ID NO: 2) continued

ab

1090	1100	1110	1120	1130	1140
ATACATGGTT	ACACGGATAT	TGTATTCCTG	GTCGTATATA	CTGTTTTTCGA	ACGCAGTGCC
Y M T	V R I N	Y E Q	D Y I	S N E F	A T G
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GAGGCCTACG	TGGTCTACAT	TTCCAGCAGT	TTGTAGTCTC	AGCCACAGCT	GGTTTCTTTT
L G V	H D V N	G A T	Q L R	L W L Q	N R K
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GTTGTTTGGT	TGGAAGTAAT	CAATAGTGGA	ATCTAGGACA	GGTTTGGGGG	TAAAGTAGCG
N N P	Q F Y D	I T S	D L V	P K P T	F Y R
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GGAGTGGTAG	GAGAAGGGCT	GGGTTATGGT	ATGGCGGGAG	GAGTAGTTTA	CATAGGGGTC
S H Y	S F P Q	T I T	H R S	S Y N V	Y P D
>XbaI					
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ATAGGTGAGG	GCTGTGGCCT	TTGTTACAAA	GTTATCATCT	AGAATAACAG	CACTGGAGCC
Y T L	A T A K	T V F	N D D	L I V A	S S G
>EcoRI					
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CACTCCCCTG	TCACCCTGGG	TGATCGGGGA	GCAGGGCCAG	AATTCAACCT	TAACCTTTCT
V G R	D G Q T	I P S	C P W	F E V K	V K R
1450	1460	1470	1480	1490	1500
TATTCTGTAG	TATTCAAAGG	GCACAGAGCG	GGGGTTTGAG	CCCCCTCCTG	GGGGAAGAAA
I R Y	Y E F P	V S R	P N S	G G G P	P L F
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GTCATTAATA	TTGAATCTCA	TCATGTCCAC	CGCCCAGGAG	GGCGTTCTGA	CTGTGGTTCTG
D N I	N F R M	M D V	A W S	P T R V	T T R
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CTTGATAGTG	TATCCGAAGG	TGCGGGATAG	GCGGGTGTG	AAGATGCCAT	TTTTCCTTCT
K I T	Y G F T	R S L	R T N	F I G N	K R R
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CCAGCGGTAA	CGGTGGCGGG	GGTGGACGAG	CCAGGGGCGG	CGGCGGAGGA	TCTGGCCAAG
W R Y	R H R P	H V L	W P R	R R L I	Q G L
1690	1700	1710	1720	1730	1740
ATGGCTGCGG	GGGCGGTGTC	TTCTTCTCCG	GTAACGCCTC	CTTGATACG	TCATATCTGA
H S R	P R H R	R R R	Y R R	R P Y T	M
1750	1760				
AAACGAAAGA	AGTGCGCTGT	AAGTATT			

Figure 3 (SEQ ID NO: 3)

LOCUS PCV2B-FD07 ORF2 234 AA
SOURCE FDAH

19-DEC-2007 *GA*

FEATURES Location/Qualifiers
1..234
/note="PCV2b-FD07 Capsid Protein (ORF2)"

ORIGIN -
1 MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWL V HPRHRYRWRR KNGIFNTRLS RTFGYTIKRT
61 TVRTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
121 SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFYSYHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR
181 NQLWLRLQTA GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDPP LNP*

//

Figure 4 (SEQ ID NO: 4)

LOCUS PCV2B-FDJE 234 AA
SOURCE FDAH

19-DEC-2007 218

FEATURES Location/Qualifiers
1..234
/note="PCV2B-FDJE Capsid (ORF2) Protein"

ORIGIN -
1 MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWL V HPRHRYRWRR KNGIFNTRLS RTFGYTIKRT
61 TVRTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
121 SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFYSYHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR
181 NQLWLRLQTA GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDPP LNP*

//

Figure 5 (SEQ ID NO: 5)

LOCUS PCV2B-FD07 1767 BP SS-DNA CIRCULAR SYN 30-SEP-2006
SOURCE FDAH

99

FEATURES Location/Qualifiers
CDS 51..995
/note="Replicase gene (ORF1)"
CDS complement(1033..1734)
/note="Capsid gene (ORF2)"

BASE COUNT 447 A 360 C 499 G 461 T 0 OTHER
ORIGIN -

```

1 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
61 AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
121 CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
181 TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
241 TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
301 AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
361 TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
421 GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCTT GTAACGTTTG
481 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
541 ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
601 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
661 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
721 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG
781 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
841 CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
901 GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCCC
961 CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
1021 TTTTATTATT CATTAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
1081 ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTTCGA ACGCAGTGCC
1141 GAGGCCACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTCCTTTT
1201 GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
1261 GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
1321 ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
1381 CACTCCCCTG TCACCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
1441 TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA
1501 GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCCTTCTGA CTGTGGTTTG
1561 CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
1621 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
1681 ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATAGCTGA
1741 AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

```

//

Figure 6 (SEQ ID NO: 6)

LOCUS PCV2B-FDJE 1767 BP DS-DNA SYN 05-NOV-2007
SOURCE FDAH

FEATURES Location/Qualifiers
CDS 51..995
/note="Replicase gene (Orf1)"
CDS complement(1033..1734)
/note="Capsid Gene (Orf2)"

BASE COUNT 446 A 359 C 499 G 463 T 0 OTHER
ORIGIN -

```
1 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
61 AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
121 CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
181 TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
241 TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
301 AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGTAACCTTAC
361 TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
421 GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
481 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
541 ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
601 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
661 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
721 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG
781 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
841 CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
901 GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCCC
961 CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
1021 TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
1081 ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTTCG ACGCAGTGCC
1141 GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTCCTTTT
1201 GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
1261 GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
1321 ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
1381 CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
1441 TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA
1501 GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GCGGTTCTGA CTGTGGTTCG
1561 CTTGATAGTG TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
1621 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
1681 ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATATCTGA
1741 AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT
```

//

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25
SEQUENCE LISTING

101

<110> wyeth
<120> Methods and Compositions for Immunizing Pigs against Porcine
Circovirus
<130> AM102973PCT
<150> 61/015,894
<151> 2007-12-21
<160> 8
<170> PatentIn version 3.4
<210> 1
<211> 1767
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<400> 1
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcgga cccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggtatct ggggtgcccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctggtga ccgttcgaga gcagtaccct gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtcct ttttatcact tcgtaatggg 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatgggt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttggttggt tggaagtaat caatagtggg atctaggaca gggttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggtt gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25

cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct	1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa	1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg	1560
cttgatagta tatccgaagg tgcgggatag gcggtgttg aagatgccat ttttccttct	1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggagg cggcggagga tctggccaag	1680
atggctgcgg gggcgggtgtc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatagctga	1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt	1767

102

<210> 2
 <211> 1767
 <212> DNA
 <213> Porcine circovirus

<400> 2

accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca	60
agaagaatgg aagaagcggg cccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc	120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatttta	180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt	240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtatct ggggtgcccgc tgccacatcg	300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggtaacttac	360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga	420
gtaccttggt ggagagcggg agtctggtga ccgttcgaga gcagtacct gtaacgtttg	480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg cagaagcgtg	540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg	600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg	660
atggttacca tgggtgaagaa gtgggtgtta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg	720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg	780
tacctttttt ggcccgagc attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatggtact	840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttggtatttt	900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc	960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaatggt	1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac	1080
atacatgggt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc	1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt	1200
gttggttgggt tggaagtaat caatagtgga atctaggaca gggttggggg taaagtagcg	1260
ggagtggtag gagaagggtt gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc	1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc	1380
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct	1440

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25

103

tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagtg tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgccat ttttccttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggagg cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcggtgtc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatatctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

<210> 3
<211> 233
<212> PRT
<213> Porcine circovirus

<400> 3

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 Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser 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 Thr 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 Ala Gly Asn
180 185 190

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25

101

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

<210> 4
<211> 233
<212> PRT
<213> Porcine circovirus

<400> 4

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 Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser 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 Thr 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 Ala Gly Asn
180 185 190

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 205

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

<210> 5
<211> 1767
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<220>
<221> gene
<222> (51)..(995)
<223> replicase gene (ORF1)

<220>
<221> gene
<222> (1033)..(1734)
<223> capsid gene (ORF2) encoded by complement

<400> 5
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcgga cccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatctt gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtatctt ggggtgcccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggtt ggagagcggg agtctggtga ccgttgacaga gcagtaccct gtaacgtttg 480
tcagaaatctt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtggg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatatc cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccgttg gaatgggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttgggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtcctt ttttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatgggtt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25

gttgtttggt tggaagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggct gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagta tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgcat ttttccttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcgggtgc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatagctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

<210> 6
<211> 1767
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<220>
<221> gene
<222> (51)..(995)
<223> replicase gene (ORF1)

<220>
<221> gene
<222> (1033)..(1734)
<223> capsid gene (ORF2) encoded by complement

<400> 6
accagcgac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcggg cccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtatct ggggtgcccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggtaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctggtga ccgttcgaga gcagtacctt gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatgggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttgggtatctt 900

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25

ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtcctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatgggt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tggctctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttgtttggt tggaagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggtt gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttataaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagtg tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgccat ttttccttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcgggtgc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatatctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
atgcccagca agaagaatgg 20

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
tggtttccag tatgtggttt cc 22

**MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZAR CERDOS CONTRA EL
CIRCOVIRUS PORCINO**

Campo de la Invención

5

La presente invención se relaciona con el campo de la salud animal y suministra métodos y composiciones para proteger cerdos contra las cepas tipo-2B patogénicas del circovirus porcino. Más particularmente, la presente invención se relaciona con cepas tipo 2B patogénicas de circovirus porcino recientemente identificadas y las proteínas codificadas por estos ácidos nucleicos. La invención también se relaciona con métodos y composiciones para producir una respuesta inmune a un circovirus patogénico porcino al administrar una composición que comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos uno de estos circovirus porcinos tipo 2B o un ácido nucleico que codifica por lo menos uno de estos circovirus porcino tipo 2 o por lo menos una de las proteínas codificadas por estos ácidos nucleicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

El circovirus Porcino (PCV) es un virus pequeño icosaédrico no envuelto que contiene un único genoma de ADN de cadena circular de cerca de 1.76 kb. Este fue aislado originalmente como un cultivo de células contaminantes de una línea celular de riñón porcino PK-15 (I. Tischer et al., Nature 295:64-66 (1982); I. Tischer et al., Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Orig. A. 226(2):153-167 (1974)). El PCV se clasifica en la familia de los circovirus, que consiste de tres otros circovirus animales (el virus de la anemia del pollo (CAV), el virus de pico psittacino y el virus de la enfermedad de la pluma (PBFDV) y el circovirus columbid recientemente descubierto (CoCV) de las palomas) y tres circovirus de plantas (el virus parte superior de la banana, el virus del decaimiento foliar del coco y el virus del trébol volador subterráneo) (M. R. Bassami et al., Virology 249:453-459 (1998); J. Mankertz et al., Virus Genes 16:267-276 (1998); A. Mankertz et al., Arch. Virol. 145:2469-2479 (2000); B. M. Meehan et al., J. Gen. Virol. 78:221-227 (1997); B. M. Meehan et al., J. Gen. Virol. 79:2171-2179 (1998); D. Todd et al., Arch. Virol. 117:129-135 (1991)). Los miembros de los tres circovirus de animales previamente reconocidos (PCV, CAV, y PBFDV) no comparten

homología de secuencia de nucleótidos o determinantes antigénicos unos con otros (M. R. Bassami et al., 1998, supra; D. Todd et al., 1991, supra). La infección experimental de cerdos con el PCV derivado de células PK-15 no produjo la enfermedad clínica y por lo tanto, este virus no se considera como patogénico para los cerdos (G. M. Allan et al., Vet. Microbiol. 44:49-64 (1995); I. Tischer et al., Arch. Virol. 91:271-276 (1986)). Este PCV no patogénico derivado de la línea de células PK-15 contaminadas se designa como circovirus porcino tipo 1 o PCV1.

El síndrome Post-destete de gasto multisistémico (PMWS), descrito primero en 1991 (J. C. Harding and E. G. Clark, Swine Health and Production 5:201-203 (1997)), es una enfermedad compleja de lechones en el destete o lechones destetados que se ha esparcido de una manera incremental. El PMWS afecta principalmente a los cerdos entre 5-18 semanas de edad. Los signos clínicos del PMWS incluyen pérdida de peso progresivo, dispnea, taquipnea, anemia, diarrea, e ictericia. La tasa de mortalidad puede variar de 1% a 2%, y hasta el 40% en algunos casos complicados en el Reino Unido (M. Muirhead, Vet. Rec. 150:456 (2002)). Las lecciones Microscópicas características del PMWS incluyen la neumonía intersticial granulomatosa, la linfadenopatía, hepatitis, y la nefritis (G. M. Allan and J. A. Ellis, J. Vet. Diagn. Invest. 12:3-14 (2000); J. C. Harding and E. G. Clark, Swine Health and Production 5:201-203 (1997)).

Aunque el PCV1 es ubicuo en cerdos, no es patogénico para los cerdos. El agente causante principal del PMWS es usualmente una cepa patógena de PCV designada como circovirus porcino tipo 2 o PCV2 (G. M. Allan et al., Vet. Rec. 142:467-468 (1998); G. M. Allan et al., J. Vet. Diagn. Invest. 10:3-10 (1998); G. M. Allan et al., Vet. Microbiol. 66:115-23 (1999); G. M. Allan and J. A. Ellis, J. Vet. Diagn. Invest. 12:3-14 (2000); J. Ellis et al. Can. Vet. J. 39:44-51 (1998); A. L. Hamel et al., J. Virol. 72:5262-5267 (1998); B. M. Meehan et al., 1998, supra; I. Morozov et al., J. Clin. Microbiol. 36:2535-2541 (1998)). Se ha determinado la secuencia genómica completa del PCV2 asociado con la PMWS (M. Fenaux et al., J. Clin. Microbiol. 38:2494-503 (2000); A. L. Hamel et al., 1998, supra; J. Mankertz et al., 1998, supra; B. M. Meehan et al., 1997, supra; B. M. Meehan et al., 1998, supra; I. Morozov et al., 1998, supra).

110

Los análisis de las secuencias revelan que el PCV2 asociado con la PMWS comparte solamente cerca del 75% de identidad de secuencia del nucleótido con el PCV1 no patogénico. El gen ORF2 de ambos, el PCV1 no patogénico y el PCV2 patogénico codifica para la proteína del cápsido vírico inmunogénico mayor (P. Nawagitgul et al., Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1:33-40 (2002); P. Nawagitgul et al., J. Gen. Virol. 81:2281-2287 (2000)).

Debido a su impacto potencial en la industria de los cerdos, el desarrollo de una vacuna contra el PCV2 se ha vuelto de gran importancia. Por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 6,287,856 (Poet et al.) y la WO 99/45956 describen ácidos nucleicos del virus del pico psittacino y la enfermedad de la pluma (BFDV), un circovirus que infecta las especies de aves, del circovirus porcino (PCV). La patente propone composiciones de vacuna que comprenden ADN desnudo o mRNA y describe un vector de ácido nucleico para la expresión transitoria PCV en una célula eucariótica que comprende una transcripción cis-actantes o una secuencia regulatoria de traducción derivada del citomegalovirus humano inmediato o el gen temprano promotor o mejorador funcionalmente ligado a un ácido nucleico de la secuencia.

La Patente Estadounidense No. 6,217,883 (Allan et al.) y la Patente Francesa No. 2,781,159B describen el aislamiento de cinco cepas de PCV de muestras de pulmón y gangliónicas tomadas de marranos o cerdos infectados con PMWS en Canadá, California y Francia (Brittany), y su uso en combinación con por lo menos un antígeno del parvovirus porcino en composiciones de vacuna/inmunogénicas. Aunque las proteínas codificadas por PCV2 de los cuadros de lecturas abiertos (ORF) consiste de ORF1 hasta ORF13 son ampliamente descritas en las patente, no hay ejemplificación de ninguna proteína específica que exhiba propiedades inmunogénicas. La patente describe adicionalmente lectores que consisten de plásmidos de ADN, moléculas lineales de ADN y virus recombinantes que contienen y expresan in vivo una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno PCV.

Varias otras referencias, por ejemplo, La Patente Estadounidense No. 6,391,314 B1; la Patente Estadounidense No. 6,368,601 B1; la Patente Francesa No.

2,769,321; la Patente Francesa No. 2,769,322; WO 01/96377 A2; WO 00/01409; WO 99/18214; WO 00/77216 A2; WO 01/16330 A2; WO 99/29871; etc., describen la administración de polipéptidos de PCV1 o PCV2 o los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de varias cepas como composiciones de vacunas.

5

La citación de cualesquier referencias aquí debería considerarse como una admisión de que tales referencias están disponibles como estado de la técnica con respecto a la presente invención.

10 RESUMEN DE LA INVENCION

En su aspecto más amplio, la presente invención suministra el aislamiento e identificación de dos nuevas cepas de circovirus porcino tipo 2 (PCV2), cada una de las cuales pueden ser usadas solas, o en combinación, para la preparación de una vacuna o composición inmunogénica para uso en la protección de los cerdos contra la infección patogénica del PCV2 o para mejorar por lo menos un síntoma asociado con el síndrome post-destete de gasto multisistémico (PMWS).

De acuerdo a lo anterior, un primer aspecto de la invención suministra un circovirus porcino tipo 2 aislado cuyo genoma comprende la moléculas de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 (designada FD07) o 2 (designada FDJE), o cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que tiene por lo menos 95% de homología de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 2.

En una modalidad, los dos circovirus porcinos aislados y recientemente identificados tipo 2B son circovirus porcino tipo 2B (PCV2B).

En una modalidad, el circovirus porcino aislado tiene una proteína ORF2 con por lo menos 92% de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 3 (del FD07) o 4 (del FDJE).

En una modalidad, los circovirus porcinos aislados tienen una proteína ORF2 que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 3 o 4.

112

Un segundo aspecto de la invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un circovirus patogénico porcino tipo 2B, o que codifica por lo menos una proteína de dicho circovirus, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótido que tiene por lo menos 95% de homología de secuencia con respecto a cualquiera de las SEQ ID NOs:1 o 2.

En una modalidad, la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótido de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 o 2.

En una modalidad, la molécula de ácido nucleico aislada codifica la proteína ORF 1 replicasa del FD07 que comprende los números de residuos 51-995 de SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína del cápsido ORF 2 de FD07 que comprende los números de residuos 1033-1734 de SEQ ID NO: 5.

En una modalidad, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína ORF 1 replicasa del FDJE comprende los números de residuos 51-995 de SEQ ID NO: 6 y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína del cápsido ORF 2 del FDJE que comprende los números de residuos 1033-1734 de SEQ ID NO: 6.

En una modalidad, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de ORF2 que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3 o 4.

Un tercer aspecto de la invención suministra una composición inmunogénica o de vacuna que comprende por lo menos uno de los siguientes: por lo menos uno de los circovirus porcino tipo 2B aislados como se describió aquí, o una combinación de estos; por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos uno de los circovirus porcinos tipo 2B descritos aquí; por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína de por lo menos uno de los circovirus porcinos tipo 2B descritos aquí o por lo menos una proteína

obtenida de por lo menos uno de los circovirus porcino tipo 2B descritos aquí y un adyuvante Farmacéuticamente aceptable.

5 En una modalidad, la vacuna o composición inmunogénicas puede comprender uno o de los siguientes:

- a) Una PCV2B vivo/atenuado, o vivo modificado cuyo genoma comprende la molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NOs: 1 o 2;
- 10 b) Un PCV2B muerto/inactivado cuyo genoma comprende la molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NOs: 1 o 2;
- c) Una vacuna de ADN del PCV2B (por ejemplo un vector de plásmido que expresa el ORF2 del PCV2B cuyo genoma comprende la molécula de ácido nucleico de la SEQ
15 ID NOs: 1 o 2); o
- d) Un vector vírico inactivado (por ejemplo un baculovirus, adenovirus, o virus de la viruela, tal como el virus de la viruela del mapache; o una bacteria, tal como la *E.coli*),
20 que expresa el ORF2 del PCV2B cuyo genoma comprende la molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NOs:1 o 2.

En una modalidad, una vacuna o composición inmunogénicas en donde el gen ORF 2 es obtenido de un circovirus porcino tipo 2B de la SEQ ID NOs: 1 o 2 pueden proteger de manera cruzada contra infecciones con una cepa porcina tipo 2A, tipo 2C o tipo 2D, u otras variantes. Administrar tal vacuna o composición
25 inmunogénica resulta en la protección del cerdo contra las cepas tipo 2A, de baja virulencia/baja mortalidad, y también resulta en protección cruzada contra las cepas tipo 2B de alta virulencia/alta mortalidad de circovirus patogénico porcino. La vacuna o composición inmunogénica utilizada puede ser administrada como una sola dosis o
30 como múltiples dosis. La administración resulta en la protección del cerdo de cualquier una o más de los síntomas o secuelas asociadas con el síndrome post-destete del gasto multisistémico (PMWS). Más aún, la administración de la vacuna o la composición inmunogénica comprende cualquiera de las modalidades

anteriormente anotadas también resulta en la mortalidad mayor al promedio asociada con las cepas tipo 2B de alta virulencia/alta mortalidad del circovirus porcino.

- 5 En una modalidad, la composición inmunogénica o de vacuna descrita anteriormente puede ser usada para producir una respuesta inmune contra el circovirus porcino, o para proteger los cerdos contra la infección patogénica del PCV2, o para mejorar por lo menos un síntoma asociado con la enfermedad.

- 10 En una modalidad, la composición inmunogénica o de vacuna descrita anteriormente comprende adicionalmente por lo menos un otro microorganismo, o un antígeno obtenido de dicho microorganismo contra el cual una respuesta inmune se desea. En una modalidad, la composición inmunogénica o de vacuna descrita anteriormente comprende adicionalmente por lo menos otra molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno de por lo menos un otro
- 15 microorganismo contra el cual se desea una respuesta inmune. El otro microorganismo se puede seleccionar del grupo que consiste del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), el parvovirus porcino (PPV), el *Mycoplasma hyopneumoniae*, el *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*,
- 20 *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, la bacteria leptospira, el virus de la influenza del marrano, el antígeno de la *Escherichia coli*, el coronavirus respiratorio porcino, el rotavirus, un patógeno causante de la enfermedad de Aujeszky, un patógeno causante de la Gastroenteritis transmisible en marranos, y una segunda cepa diferente de un circovirus porcino. La segunda cepa diferente del circovirus
- 25 porcino puede ser un tipo 2A o un tipo 2B del circovirus.

En una modalidad, la composición inmunogénica o de vacuna es administrada con o sin un adyuvante.

- 30 En una modalidad, la composición inmunogénica o de vacuna es administrada en una sola dosis o en múltiples dosis subcutáneamente, intramuscularmente, intranasalmente, transdérmicamente, intrahepáticamente, o por vía de la ruta intralinfoide.

115

Un cuarto aspecto de la invención suministra un método para inmunizar un cerdo contra la infección vírica o contra el síndrome post-destete del gasto multisistémico (PMWS), o para prevenir el PMWS en un cerdo causado por una cepa del PCV2, o para mejorar por lo menos un síntoma asociado con el PMWS, que
5 comprende administrar al cerdo una cantidad inmunogénicamente efectiva de una composición que comprende una cualquiera o más de los siguientes:

a) Una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos un circovirus porcino del tipo 2 codificado por la molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NOs: 1 o 2, como
10 se describió aquí;

b) Una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un circovirus porcino del tipo 2 de a);

15 c) Una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos una proteína aislada de por lo menos un circovirus porcino del tipo 2 de a); o

d) Una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína de c).

20

En una modalidad, la invención suministra métodos para inmunizar o proteger cerdos contra por lo menos una cepa patógena del circovirus porcino mediante administrar una vacuna o composición inmunogénica que comprende un portador no tóxico, fisiológicamente aceptable y una cantidad inmunogénicamente
25 efectiva de un circovirus porcino tipo 2 muerto/inactivado, o un circovirus porcino tipo 2 vivo, atenuado como se describió aquí, cuyo genoma comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 o 2. En una modalidad, los métodos de la invención suministran la inmunización o protección de un cerdo contra la infección por circovirus porcino mediante administrar la vacuna o composición
30 inmunogénica, como se describió anteriormente, que comprende adicionalmente un adyuvante.

En una modalidad, la invención suministra métodos para inmunizar o proteger un cerdo contra una cepa patógena tipo 2B del circovirus porcino, mediante

administrar una vacuna o composición inmunogénica que comprende un ácido nucleico infeccioso que codifica el circovirus porcino tipo 2 como se muestra en la SEQ ID NO:1 o 2, en donde la administración resulta en el mejoramiento de uno o más de los síntomas de una infección del circovirus porcino.

5

En una modalidad, la invención suministra métodos para inmunizar o proteger un cerdo contra una cepa patógena del circovirus porcino tipo 2B, al administrar una cantidad inmunogénicamente efectiva de una vacuna o composición inmunogénica, en donde la composición comprende por lo menos una proteína del circovirus porcino tipo 2 como se describió en la presente invención, o un ácido nucleico que codifica la proteína del circovirus porcino tipo 2 de la presente invención. En una modalidad, la proteína del circovirus porcino tipo 2B de la presente invención es la proteína ORF2. En una modalidad, el gen ORF-2 que codifica la proteína ORF2 del circovirus porcino tipo 2B de la presente invención, designado FD07 y FDJE, comprende los números de residuos 1033-1074 de la secuencia de nucleótido como se establece en la SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente, y la proteína codificada por el gen ORF-2 de FD07 y FDJE que comprende la secuencia de aminoácido como se establece en las SEQ ID NO: 3 o 4, respectivamente.

20

En una modalidad, la invención suministra métodos para inmunizar o proteger un cerdo contra una cepa patógena tipo 2B del circovirus porcino, que comprende administrar una vacuna o composición inmunogénica que comprende un circovirus porcino tipo 2, o un ácido nucleico que codifica un circovirus porcino tipo 2, en donde el circovirus porcino es codificado por la secuencia de nucleótido como se establece en la SEQ ID NO: 1 o 2, sus hilos complementarios o una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 95% de homología con respecto a la secuencia del nucleótido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

30

En una modalidad, la invención suministra métodos para inmunizar o proteger un cerdo contra una cepa patógena tipo 2B del circovirus porcino mediante administrar una vacuna o composición inmunogénica que comprende por lo menos uno de los dos nuevos circovirus porcinos tipo 2B o un ácido nucleico que codifica por lo menos uno de los dos nuevos circovirus porcinos tipo 2B de la presente invención, o por lo menos una proteína de por lo menos uno de las dos cepas tipo 2B de la

117

presente invención, o el ácido nucleico que codifica por lo menos uno de estas dos proteínas, en donde la cepa patógena tipo 2B del circovirus porcino es una cepa de circovirus porcino que contiene un proteína cápsido codificado por un gen ORF 2 que exhibe no menos del 92% de identidad de secuencia con una proteína cápsida codificada por el gen ORF 2 de por lo menos una de las dos cepas del circovirus porcino tipo 2B descritas en la presente invención. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas cápsidas de las cepas tipo 2B del circovirus porcino de la presente invención se muestran en la SEQ ID NOs: 3 y 4.

10 En una modalidad, los métodos de la invención suministran inmunidad o protección a un cerdo contra la infección con una cepa patógena del circovirus porcino tipo 2B, que comprende administrar a un cerdo una vacuna o una composición inmunogénica que comprende un circovirus porcino tipo 2B, o un ácido nucleico que codifica un circovirus porcino tipo 2B, o que codifica por lo menos una proteína de dicho circovirus porcino de la presente invención, en donde dicha administración resulta en el mejoramiento de uno o más de los siguiente síntomas clínicos:

20 Reducción de lesiones microscópicas en uno o más tejidos linfoides o no linfoides de los cerdos expuestos a una forma virulenta de un circovirus porcino tipo 2B;

Reducción de la viremia asociada con una infección del circovirus porcino;

25 Reducción en el nivel del ácido nucleico tipo 2A o tipo 2B en uno o más de los tejidos.

En una modalidad, el método comprende adicionalmente administrar una cantidad inmunogénicamente efectiva de una segunda composición inmunogénica diferente antes de, en conjunto con, o siguientes a, administrar la composición inmunogénica del circovirus porcino tipo 2 como se describió aquí.

30 En una modalidad, la segunda composición inmunogénica diferente comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos un otro microorganismo que es patogénico para los cerdos, o por lo menos un antígeno obtenido de dicho microorganismo o una molécula de ácido nucleico que codifica

118

dicho antígeno, en donde el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), el parvovirus porcino (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella*
5 *bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacteria leptospira, virus de la influenza de los cerdos, antígeno de la *Escherichia coli*, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, un patógeno causante de la enfermedad de Aujeszky, un patógeno causante de la gastroenteritis transmisible en los cerdos y una segunda cepa diferente del circovirus porcino. La segunda cepa diferente del
10 circovirus porcino puede ser el circovirus tipo 2A o un tipo 2B.

Un quinto aspecto de la presente invención suministra un vector que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico exógena que codifica una proteína del circovirus porcino tipo 2A o una tipo 2B, en donde la proteína del
15 circovirus porcino es una proteína ORF2, y en donde la molécula de ácido nucleico exógena que codifica dicha proteína está establecida en los residuos 1033-1734 de la SEQ ID NO: 5 o 6.

En una modalidad, el vector es un vector del virus de la viruela del
20 mapache que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína del circovirus porcino PCV2A, o una del PCV2B como se describe aquí, o ambas.

En una modalidad, el vector comprende adicionalmente uno o más
25 moléculas de ácido nucleico exógenos que codifican un antígeno de un microorganismo que es patógeno a los cerdos, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste del virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino (PRRS), el parvovirus porcino (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus*
30 *pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacteria de leptospira, virus de la influenza de los marranos, antígeno de la *Escherichia coli*, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, un patógeno causante de la enfermedad Aujeszky, un patógeno causante de la gastroenteritis transmisible en los marranos y una segunda cepa diferente de un circovirus porcino.

11a

Un sexto aspecto de la invención suministra un método para determinar si un mamífero porcino tiene, o está en riesgo de desarrollar el síndrome post-destete de gasto multisistémico (PMWS), el método comprende:

5

(I) medir una cantidad de un ácido nucleico PCV2 o proteína codificada por dicho ácido nucleico en una muestra de tejido derivada del mamífero, en donde dicho ácido nucleico PCV2 o proteína es:

10 a) Un ácido nucleico que comprende cualquier SEQ ID NOs: 1, 2, 5 o 6, o un ácido nucleico derivado de ellas;

b) Una proteína que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 3 o 4;

15 c) Un ácido nucleico que comprende una secuencia hibridable de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 5 o 6, o sus complementos bajo condiciones de alta rigidez, o una proteína que comprende una secuencia codificada por dicha secuencia hibridable;

20 d) Un ácido nucleico de por lo menos 95% de homología con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 5, o 6, o sus complementos como se determino usando el algoritmo NBLAST; o una proteína que se codifica por ellos; y

(II) comparar la cantidad de dicho ácido nucleico o proteína en la muestra de tejido del mamífero sospechoso de tener, o estar en riesgo de desarrollar el PMWS con la cantidad de ácido nucleico proteína presente en una muestra de tejido de un mamífero normal, o el estándar predeterminado para una muestra de tejido normal, en donde una cantidad elevada de dicho ácido nucleico o proteína en la muestra del tejido del mamífero porcino que tiene o se sospecha que tiene PMWS comparado con la cantidad en la muestra de tejido normal o el estándar predeterminado para una muestra de tejido normal indica que el mamífero tiene o está en riesgo de desarrollar el PMWS.

25

30

En una modalidad, el método para determinar si un mamífero porcino tiene, o está en riesgo de desarrollar PMWS se suministra para medir la cantidad del ácido nucleico PCV 2B o de la proteína de la invención en una muestra de tejidos

no

seleccionada del grupo que consiste del nodo inguinal superficial linfáticos, el nodo traqueobronquial linfático, el nodo submandibular, pulmón, amígdalas, bazo, hígado, riñón, sangre entera y células sanguíneas.

5 Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1. Secuencia completa del genoma del circovirus porcino tipo 2B designada FD07 (SEQ ID NO: 1).

10 La Figura 2. Secuencia completa de genoma del circovirus porcina tipo 2B designada FDJE (SEQ ID NO: 2).

La Figura 3. La secuencia de aminoácido de la proteína capsida ORF2 del PCV2B designado FD07 (SEQ ID NO: 3).

15

La Figura 4. La secuencia de aminoácido de la proteína capsida ORF2 del PCV2B designada FDJE (SEQ ID NO: 4).

20 La Figura 5. La secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas ORF1 y ORF2 del FD07 (SEQ ID NO: 5).

La Figura 6. La secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas ORF1 y ORF2 del FDJE (SEQ ID NO: 6).

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 Antes de describir los presentes métodos y metodología de tratamiento, se debe entender que esta invención no se limita a los métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología usada aquí tiene el propósito de describir solamente modalidades particulares, y no el propósito de ser limitativa.

Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "un", "una" y "el o la" incluyen referencias plurales a menos que el

121

contexto dicte claramente otra forma. Así, por ejemplo la referencia a "el método" incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito aquí y/o que serán evidentes para aquellas personas versadas en la técnica luego de la lectura de esta descripción etc.

5

De acuerdo a lo anterior, en la presente solicitud, se puede emplear Biología molecular convencional y microbiología, y técnicas de ADN recombinantes dentro del experticio de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (de aquí en adelante "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

20

Aunque cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la invención, los métodos preferidos y materiales preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad.

25 **Definiciones**

Los términos usados aquí tienen los significados reconocidos y conocidos por aquellos versados en la técnica, sin embargo, para conveniencia y para hacer completa la descripción, se establecen aquí adelante términos particulares y sus significados.

30

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que promueve la respuesta inmune a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito de tejido que lentamente libera el antígeno y también como un activador del sistema

722

linfoide que promueve de manera no especifica la respuesta inmune (Hood et al., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). Dependiendo de las circunstancias, una infección primaria con un antígeno solo, en la ausencia de un adyuvante puede fallar en producir una respuesta inmune humoral o

5 celular. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, el adyuvante completo de Freund, el adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, hemocianinas lapa ojo de cerradura, dinitrofenol, y adyuvantes humanos

10 potencialmente utiles, tal como BCG (*bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Preferiblemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

Por "antígeno" se quiere decir una molécula que contiene uno o más epítipo capaces de estimular un sistema inmune del anfitrión para lograr una

15 respuesta inmune celular especifica al antígeno o una respuesta de anticuerpo humoral cuando el antígeno es presentado de acuerdo con la presente invención. Normalmente, un epítipo incluirá entre cerca de 3-15, generalmente cerca de 5-15 aminoácidos. Los epítipos de una proteína dada pueden ser identificados usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítipo, bien conocidas en la técnica.

20 Ver, por ejemplo, epítipo Mapping Protocols in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. por ejemplo, los epítipos lineales pueden ser determinados por ejemplo, números grandes de sinterización concurrente de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a las funciones de la molécula de la proteína, y hacer reaccionar los péptidos con

25 anticuerpos mientras los péptidos todavía están sujetos a los soporte. Tales técnicas son conocidas bien en el arte y se describen en, por ejemplo, la Patente Estadounidense 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, todas incorporadas aquí como referencia en su totalidad. Similarmente, los epítipos conformacionales

30 son fácilmente identificados mediante determinar la conformación espacial de los aminoácidos, tal como por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear de dos dimensiones. Ver, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, supra. Además, para propósitos de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y

123

sustituciones (generalmente conservativas en naturaleza, pero que pueden ser no conservativas), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la habilidad para producir una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagenia dirigida a sitio, o mediante procedimientos sintéticos particulares, o por un modelo de ingeniería genérica, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de los anfitriones, que producen los antígenos.

El término "atenuado", como se usa aquí para describir, por ejemplo, un "virus atenuado" y similares se refiere a un microorganismo, por ejemplo, un virus, que está limitado en su habilidad para crecer o replicarse in Vitro o in vivo.

El término "circovirus", Como se utiliza aquí, a menos que se indique lo contrario, se refiere a cualquier cepa de circovirus que caiga dentro de la familia circoviridae. Por ejemplo, en la presente invención, el circovirus es un circovirus patogénico porcino. En modalidades particulares, el circovirus patogénico porcino es una cepa de circovirus porcino de baja virulencia/baja mortalidad tipo 2A o una cepa de circovirus porcino de alta virulencia/alta mortalidad tipo 2B.

"Complementario" se entiende en su significado reconocido como identificar un nucleótido en una secuencia que hibrida (hibridiza) en un nucleótido en otra secuencia de acuerdo con la regla A→T, U y C→G (y viceversa) y por lo tanto "se empareja" con su socio para propósitos de esta definición. La transcripción enzimática tiene tasas medibles y bien conocidas de error (dependiendo de la enzima específica usada), por lo tanto dentro de los límites de la precisión transcripcional usando los modos descritos aquí, en que una persona versada podría entender que la fidelidad de la síntesis de hilo complementario enzimático no es absoluta y que el amplicón necesario para ser un emparejamiento completamente en cada nucleónico en el objetivo o en el ARN. De plantilla. Los procedimientos que usan condiciones de alta rigurosidad son como sigue. Prehibridación de filtros que contienen ADN se lleva a cabo durante 8h hasta durante la noche a 65°C en amortiguador compuesto de 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM de EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizada. Los filtros se hibridan durante 48h a 65°C en la mezcla de prehibridación que contiene 100 µg/ml

124

de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y $5-20 \times 10^6$ cpm de la probeta marcada ^{32}P . Lavar los filtros se hace a 37°C durante 1h en una solución que contiene 2X SSC, 0.01% PVP, 0.01% Ficoll, y 0.01% BSA. Esto es seguido por un lavado en 0.1X SSC a 50°C durante 45 min antes de autorradiografía. Otras

5 condiciones de alta rigurosidad que pueden ser usadas son bien conocidas en la técnica. (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; ver también, Ausubel et al., eds., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, 1987-1997 Current Protocols, © 1994-1997 John

10 Wiley and Sons, Inc.).

Se nota que en esta descripción, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares pueden tener los significados atribuidos a ellos en la ley de Patente de los Estados Unidos, por

15 ejemplo, ellos pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares. Los términos tales como "que consiste esencialmente de" y "consiste esencialmente de" tienen el significado atribuido a ellos en la ley de Patente Estadounidense, por ejemplo, ellos permiten la inclusión de ingredientes adicionales o etapas adicionales que no detraen de la novedad o características básicas de la invención, es decir, ellos

20 excluyen ingredientes no recitados adicionales o etapas que detraen de las características novedosas y básicas de la invención, y ellos excluyen ingredientes o etapas del estado de la técnica, tales como documentos en la técnica que son citados aquí o están incorporados como referencia aquí, especialmente cuando su propósito de este documento es definir modalidades que son patentables, por ejemplo,

25 novedosas, no obvias, inventivas, enfrente del estado de la técnica, por ejemplo, frente a documentos citados aquí o incorporados como referencia aquí. Y, los términos "consiste de" y "que consiste de" tienen el significado adscrito a ellos en la ley de Patentes de los Estados Unidos, particularmente, que estos términos son cerrados.

30

"Codificado por" o "que codifica" se refiere a una secuencia de ácidos nucleico que codifica para una secuencia de polipéptido, en donde la secuencia de polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos de por lo menos 3 a 5 aminoácidos, más preferiblemente por lo menos de 8 a 10 aminoácidos, y aún más

ns

preferiblemente por lo menos 15 a 20 aminoácidos, y aún más preferiblemente por lo menos 15 a 20 aminoácidos, un polipéptido que codifica por las secuencias del ácido nucleico. También están abarcadas las secuencias de polipéptidos, que son identificables inmunológicamente con un polipéptido que codifica por la secuencia.

- 5 Así, una secuencia de antígeno "polipéptido", "proteína", o "aminoácidos" pueden tener por lo menos 70% C, preferiblemente por lo menos cerca de 80% similitud, más preferiblemente cerca de 90-95% similitud, y mucho más preferiblemente cerca de 99% similitud, con un polipéptido o secuencia de aminoácido de un antígeno.

- 10 Un "gen" como se usa en el contexto de la presente invención es una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico (cromosoma, plásmido, etc.) con la cual una función genética se asocia. Un gen es una unidad hereditaria, por ejemplo de un organismo, que comprende una secuencia de polinucleótidos) por ejemplo, una secuencia de ADN para mamíferos) que ocupa una localización física
- 15 específica (un "locus de gen" o "locus genético") dentro del genoma de un organismo. Un gen puede codificar un producto expresado, tal como un polipéptido o un polinucleótido (por ejemplo, tARN. Alternativamente, un gen puede definir una localización genómica para un evento/función particular, tal como el ligado de proteínas y/o ácidos nucleicos (por ejemplo, sitios de sujeción fago), en donde el gen
- 20 no codifica un producto expresado. Típicamente, un gen incluye secuencias de codificación, tal como secuencias que codifican polipéptidos, y secuencias que no codifican, tales como secuencias promotoras, secuencias de poli-adenilación, secuencias de regulación transcriptional (por ejemplo, secuencias promotoras). Muchos genes eucarióticos tienen "exones" (secuencias codificadoras) interrumpidas
- 25 por "intrones" (secuencias no codificadoras). En ciertos casos, un gen puede compartir secuencias con otros genes (por ejemplo genes superpuestos).

- 30 Así, "homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a similitud de secuencias entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar mediante comparar una posición en cada secuencia, que pueden ser alineadas para propósitos de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada se ocupa por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de homología o similitud o identidad entre secuencias de ácido nucleico es una función del número de

76

- nucleótidos idénticos o emparejados en las posiciones compartidas por las secuencias de ácidos nucleicos. Un grado de identidad de secuencia de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos en las posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos. Un grado de homología o similitud de secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos, es decir relacionada estructuralmente, en las posiciones compartidas por la secuencia de aminoácidos. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40% de identidad, aunque preferiblemente es menos de 25% de identidad, con una de las secuencias de la presente invención. Por lo tanto, un "homólogo" de un circovirus porcino o de un fragmento del mismo, debería compartir por lo menos cerca del 75% de homología con el circovirus porcino o fragmento del mismo (preferiblemente cerca del 80% de homología, más preferiblemente entre cerca de 90-95% de homología y mucho más preferiblemente cerca del 99% de homología).
- 15 Una "respuesta inmune" a una vacuna o una composición inmunogénica es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o mediada por células a moléculas presentes en el antígeno o composición de vacuna de interés. Para propósitos de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" es una respuesta inmune mediada por anticuerpo e involucra la generación de anticuerpo
- 20 con afinidad por el antígeno/vacuna de la invención, mientras que una "respuesta inmune mediada por células" es una mediada por linfocitos T y/o otras células sanguíneas blancas. Una "respuesta inmune mediada por células" se produce mediante la presentación de epítopos antigénicos en asociación con moléculas clase I o Clase II del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Este activa las células
- 25 auxiliares CD4+ T específicas a antígeno o las células de linfocito T citotóxico más CD8+ ("CTL"). Las CTL tienen especificidad por antígenos de péptidos que están presente en asociación con proteínas codificadas por el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) y se expresa sobre la superficie de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios
- 30 intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular involucra una respuesta específica a antígeno por células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y se enfocan en la actividad de células efectoras no específicas contra las células que muestran antígenos de péptidos en asociación con moléculas MHC sobre su

17A

superficie. Una "respuesta inmune mediada por células" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras de tales moléculas producidas por células T activadas y/o otras células sanguíneas blancas, incluyendo aquellas derivadas de las células T CD4+ y CD8+. La habilidad de un antígeno particular o composición para estimular una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar por un número de ensayo, tal como mediante los ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, mediante ensayar linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o al medir la producción de citocinas por células T en respuesta a la re-estimulación con antígeno. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Ver por ejemplo, Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

El término "inmunogénico" se refiere a la habilidad de un antígeno o de una vacuna para producir una respuesta inmune, sea esta humoral o mediada por célula, o ambas. Una "cantidad inmunogénicamente efectiva" como se usa aquí se refiere a la cantidad de antígeno o vacuna suficiente para producir una respuesta inmune, una respuesta celular (células T) o humoral (célula B o anticuerpo), o ambas, como se midió por los ensayos estándar conocidos por aquellos versados en la técnica. La efectividad de un antígeno como un inmunógeno, puede ser medida mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citolíticos, tal como ensayos de liberación de cromo para medir la habilidad de una célula T para romper su célula objetivo específica, o medir los niveles de la actividad de la célula B para medir los niveles de los anticuerpos circulantes específicos para el antígeno en el suero. Adicionalmente, el nivel de protección de la respuesta inmune puede ser medida al infectar el anfitrión inmunizado con el antígeno que se ha inyectado. Por ejemplo, si el antígeno del cual se desea una respuesta inmune es un virus o una célula de tumor, el nivel de protección inducido por la "cantidad inmunogénicamente efectiva" del antígeno se mide al detectar el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de la infección con el virus o la célula de tumor de los animales. En una modalidad, una "cantidad inmunogénicamente efectiva" de la vacuna o de la composición inmunogénica se refiere a un título de partículas de virus que varían entre cerca de 1 a 7 Log₁₀ de partículas de virus/ml según se mide por el método FAID₅₀ (King et al., Journal of Comparative Medicine and Vet. Science, 29:85-89



(1965)) y en la Patente Estadounidense No. 4,824,785. En una modalidad, una "cantidad inmunogénicamente efectiva" de la vacuna o las composiciones inmunogénicas es un título de partícula de virus que varía entre 2 a 5 Log₁₀ partículas de virus/ml según se mide por el método FAID₅₀ (King et al., Journal of Comparative
5 Medicine and Vet. Science, 29:85-89 (1965)) y la Patente Estadounidense No. 4,824,785. En una modalidad, una "cantidad inmunogénicamente efectiva" de una vacuna o composición inmunogénica de ADN infeccioso puede variar entre cerca de 50 a 5000 µg. En una modalidad, una "cantidad inmunogénicamente efectiva" de una vacuna o composición inmunogénica de ADN infeccioso puede variar en alrededor de
10 50 a 1000 µg. En ciertas modalidades, el término "cerca de" significa dentro del 20%, preferiblemente dentro de 10%, y más preferiblemente dentro de 5%.

El término "composición inmunogénica" se relaciona con cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo un microorganismo,
15 dicha composición puede ser usada para producir una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmunes puede incluir una respuesta de célula T, una repuesta de célula B, o ambas una respuesta de célula T y B. la composición puede servir para sensibilizar el mamífero mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas MHC en la superficie celular. En adición, los linfocitos T o
20 anticuerpos específicos para antígeno se pueden generar para permitir la futura protección de un anfitrión inmunizado. Una "composición inmunogénica" puede contener una vacuna viva, atenuada o muerta/inactivada que comprende un microorganismo completo o una porción inmunogénica derivada del mismo que induce o una respuesta inmune mediada por célula (célula T) o una respuesta inmune
25 mediada por anticuerpo (célula B) o ambas, y puede proteger al animal de uno o más de los síntomas asociados con la infección mediante el microorganismo, o puede proteger al animal de la muerte debido a infección con el microorganismo.

Un "ORF inmunogénico" o "ORF innumogénico" se refiere a un cuadro de
30 lectura abierto que produce una respuesta inmune, por ejemplo, el ORF2 codifica una proteína cápsida inmunogénica.

Las vacunas y composiciones inmunogénicas de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más "inmunomoduladores" adicionales, los

na

cuales son agentes que perturban o alteran el sistema inmune, tal que se regule hacia arriba o hacia abajo la inmunidad humoral y/o mediada por células observadas. En una modalidad particular, se prefiere la regulación hacia arriba de las armas humorales y/o mediadas por células del sistema inmune. Ejemplos de ciertos

5 inmunomoduladores incluyen, por ejemplo una "adyuvante farmacéuticamente aceptable" o citocina entre otros. Ejemplos no limitativos de "adyuvantes farmacéuticamente aceptables" que se pueden utilizar en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alum, geles de mineral tales como gel de hidróxido aluminio, emulsiones de aceite en agua,

10 emulsiones de agua en aceite, tales como, por ejemplo, los adyuvantes completos e incompletos de Freund, el copolímero de bloque (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), el adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A y otras fracciones de sapolina, el lípido monofosforilo A, y el adyuvante de lípido Avridina -amina. Ejemplos no limitativos de

15 emulsiones de aceite en agua útiles en la vacuna de la invención incluyen el SEAM62 modificado y la formulación SEAM 1/2. El SEAM62 modificado es una emulsión de aceite en agua que contiene 5% (v/v) de escualeno (Sigma), 1% (v/v) del detergente SPAN® 85 (ICI Surfactants), 0.7% (v/v) del detergente TWEEN® 80 (ICI Surfactants), 2.5% (v/v) de etanol, 200 µg/ml Quil A, 100 µg/ml colesterol, y 0.5% (v/v) de lecitina.

20 El SEAM ½ modificado es una emulsión de aceite en agua que comprende 5% (v/v) de escualeno, 1% (v/v) del detergente SPAN® 85, 0.7% (v/v) del detergente Tween 80, 2.5% (v/v) de etanol, 100 µg/ml Quil A, y 50 µg/ml colesterol. Otros "inmunomoduladores" que pueden estar incluidos en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones, u otras citocinas conocidas. En una modalidad,

25 el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina un polímero polianiónico, tal como aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,165,995 y 6,610,310, respectivamente.

El término "infeccioso" significa que el virus se replica o es capaz de

30 replicarse en los cerdos, sin importar si o no el virus causa cualquier enfermedad. En la presente invención, un ejemplo de un ADN "infeccioso" se muestra en el ADN del PCV2 de SEQ ID NOs: 1 o 2.

130

El término "aislado" o "purificado" significa que el material es removido de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si es de ocurrencia natural). Por ejemplo, un péptidos o proteína "aislado" o "purificado" esta sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de fuente celular o de tejidos de los cuales la proteína se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sinteriza químicamente. El lenguaje, "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptido/proteína en las cuales el polipéptido/proteína es separado de los componentes celulares de las células de las cuales se aísla o produce recombinantemente. Por lo tanto, un polipéptido /proteína que esta sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de polipéptido/proteína que tiene menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, o 1%, (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido/proteína se produce recombinantemente, este está preferiblemente sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de cerca del 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el polipéptido/proteína se produce por síntesis química, este está preferiblemente libre de precursores químicos u otros químicos, es decir es separado de los precursores químicos u otros químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. De acuerdo a lo anterior, tales preparaciones de polipéptido/proteína tienen menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de los precursores químicos o compuestos diferentes del fragmento de interés del polipéptido/proteína. Una molécula de ácido nucleico "aislada" o "purificada" es una que ha sido separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Más aún, una molécula de ácido nucleico "aislada" tal como una molécula de cADN o de ARN, puede ser sustancialmente libre de otros materiales celulares, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando es sintetizada químicamente.

El término "muerto" o "inactivado" se utilizan de manera intercambiable aquí y se refieren a una reducción significativa o completa en la infectividad de los virus utilizados por la preparación de las composiciones de vacuna. El matar o inactivar los virus puede ser evaluado de acuerdo con cualquier procedimiento conocido por aquellos versados en la técnica, por ejemplo, mediante métodos de biología molecular (PCR), métodos para la titulación del título viral, fluorescencia,

131

métodos inmunológicos (ELISA, RIA y similares), métodos inmuno enzimáticos que permiten la detección de uno o más polipéptidos virales (Western y similares). Un número de diferentes agentes inactivantes y medios han sido empleados incluyendo formalina, azida, congelamiento-descogelamiento, sonicación, tratamiento térmico, caída súbita de presión, detergente (especialmente detergentes no iónicos), lisozima, fenol, enzimas proteolíticas y beta.-propiolactona.

El término "tejido linfoide" se refiere a cualquier tejido que es rico en linfocitos y células accesorias tales como macrófagos y células reticulares y está soportado por una red de tejidos conectivos. El tejido linfoide incluye la médula ósea, el timo, los nodos linfáticos, el bazo, amígdalas, adenoides, parches Peyer y agregados de linfocito sobre superficies de mucosa. El tejido "no linfoide" se refiere a cualquier otro tejido que no es rico en linfocitos y células accesorias como se define aquí.

Como se uso aquí, la frase "ácido nucleico" o "moléculas de ácido nucleico" se refiere a ADN, ARN, lo mismo que cualquiera de las bases conocidas análogas de ADN y ARN o quimeras formadas de ellas. Así, un "ácido nucleico" o una "molécula de ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o deoxiribonucleósidos (deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxitimidina, o deoxicitidina; "moléculas de ADN") en cualquier forma de cadena única, o de hélice de doble cadena. Las hélices de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN de doble cadena son posibles. El término molécula de ácido nucleico y en particular la molécula de ADN o de ARN, se refiere solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a cualquier forma terciaria particular. Así, este término incluye el ADN de doble cadena encontrado, inter alia, en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo fragmentos de restricción), plásmidos, y cromosomas. Al discutir la estructura de moléculas de ADN de doble cadena particulares, las secuencias pueden ser descritas aquí de acuerdo con la convención normal de dar solamente la secuencia en la dirección 5N a 3N a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir la cadena que tiene una secuencia homóloga al mRNA). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sufrido una manipulación biológica molecular.

132

Un "nucleótido" se refiere a una subunidad de ADN o ARN que consiste de bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina), una molécula de fosfato, y una molécula de azúcar (deoxiribosa en ADN y ribosa en ARN)).

5

El término "cuadro de lectura abierto" o "ORF", u "ORF", como se usa aquí se refiere a la secuencia de nucleótido mínima requerida para codificar una proteína de circovirus particular o antígeno sin una intervención del codón de detención.

10

El término "parenteral" se refiere a una sustancia tomada dentro del cuerpo o administrada de una manera diferente que mediante el tracto digestivo, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o intramuscular.

15

El término "patogénico" se refiere a la habilidad de cualquier agente de infección, tal como una bacteria o un virus, que causa una enfermedad. En la presente invención, el término "patogénico" se refiere a la habilidad de un circovirus porcino, en particular, un circovirus porcino tipo 2, que causa una enfermedad en cerdos llamada como el "síndrome post-destete de gasto multisistémico" o "PMWS".

20

Esta enfermedad es frecuentemente caracterizada por el gasto o desempeño pobre en cerdos destetados y mediante lesiones moderadas a severas linfoides con vaciado linfoides y reemplazo histiocítico de los folículos en los tejidos linfoides. Los cerdos que sufren de PMWS también se sabe que tienen una enfermedad respiratoria, por ejemplo, neumonía intersticial, hepatitis linfocítica y nefritis intersticial

25

linfocítica. Otras condiciones asociadas con un circovirus porcino tipo 2 "patogénico" incluyen la falla reproductiva esporádica, enteritis, y dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS). Un microorganismo "no-patogénico" se refiere a un microorganismo que carece de las características anotadas anteriormente para las

cepas "patogénicas" del circovirus porcino. El circovirus porcino "no patogénico" generalmente se ha llamado como el circovirus porcino tipo 1. Las cepas

30

"patogénicas" del circovirus porcino en general se llaman circovirus porcino tipo 2. El circovirus porcino "no patogénico" se llama en general circovirus porcino tipo 1.

(33)

Así, el término "porcentaje idéntico" o "porcentaje de identidad de secuencia" se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. Varios algoritmos de alineamiento y/o programas pueden ser usados, incluyendo FASTA, BLAST, o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como una parte del paquete de análisis de secuencias GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.), y puede ser usado con, por ejemplo, parámetros por defecto. ENTREZ está disponible mediante el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. En una modalidad, el porcentaje de identidad de dos secuencias puede ser determinado por el programa GCG con un espacio de peso de 1, por ejemplo, cada espacio de aminoácido es pesado como si fuera un único aminoácido o una disparidad de nucleótido entre dos secuencia.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa un portador aprobado por una agencia regulatoria de un gobierno Federal o de Estado, u otra agencia regulatoria, o listado en la farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, incluyendo humanos lo mismo que mamíferos no humanos. El término "portado" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual la composición farmacéutica es administrada. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como el aceite de maní, el aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica es administrada intravenosamente. La soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol también puede ser empleadas como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables, los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes amortiguadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, capsulas, polvos, formulaciones de liberaciones sostenidas y similares. La composición puede ser formulada como un supositorio, con aglutinantes

131

tradicionales portadores tal como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Un "polinucleótido" es un polímero de ácido nucleico, que codifica típicamente una proteína o polipéptido biológicamente activos (por ejemplo, inmunogénico). Dependiendo de la naturaleza del polipéptido codificado por el polinucleótido, un polinucleótido puede incluir tan poco como 10 nucleótidos, por ejemplo, donde el polinucleótido codifica un antígeno. Adicionalmente, un "polinucleótido" puede influir tanto secuencias de cadena doble o de cadena única y se refieren a, pero no se limita a, cADN de mRNA viral, procariótico o eucariótico, secuencias de ARN y ADN genómicas de ADN vírico (por ejemplo virus de ARN y ADN y retrovirus) o procariótico, y también secuencias de ADN sintético. El termino también captura secuencias que incluyen cualquiera de las base análogas conocidas de ADN y ARN. El término incluye adicionalmente modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (por ejemplo metilaciones o taponamientos), a una secuencia nativa, preferiblemente de modo que la molécula de ácido nucleico codifique, por ejemplo, una proteína antigénica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas o mediante mutagenia dirigida a sitio, o mediante procedimientos sintéticos particulares, o mediante un modelo de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de los anfitriones, que produce en los antígenos. El término "oligonucleótido" o "oligo" se usan de manera intercambiable aquí.

Los términos "porcinos" y "marranos" se usan de manera intercambiable y se refieren a cualquier animal que un miembro de la familia Suidae tal como, por ejemplo, un cerdo.

El término "proteger" se refiere a apantallar por ejemplo un mamífero, en particular un cerdo, con respecto a una infección o una enfermedad, mediante inducir una respuesta inmune a un patógeno particular, por ejemplo circovirus. Tal protección

135

es lograda en general luego de tratar un mamífero con las composiciones de vacunas descritas aquí.

El término "proteínas", "polipéptidos" y "péptidos" se refieren a un polímero de residuos de aminoácido y no está limitado a una longitud mínima del producto. Así, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, están incluidos dentro de la definición. Tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de la misma están abarcados por la definición. El término también incluyen modificaciones, tal como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en naturaleza, pero que pueden ser no conservativas), a una secuencia nativa, preferiblemente tal que la proteína mantiene la habilidad para producir una respuesta inmunológica dentro de un animal al cual la proteína es administrada. También están incluidos las modificación post-expresión, por ejemplo glicosilación, acetilación, fosforilación y similares.

Como se utiliza aquí, el término "homología de secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere a la relación entre proteínas que poseen un origen evolutivo común, incluyendo proteínas homologas de diferentes especies (Reeck et al., 1987, Cell 50:667).

Dos secuencia de ADN son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando por lo menos cerca de 75% (preferiblemente cerca de 80%, y más preferiblemente por lo menos cerca de 90 o 95%, y mucho más preferiblemente cerca del 99%) de los nucleótidos casan con respecto a la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden ser identificadas mediante comparar las secuencias usando el software estándar disponible en los bancos de datos de secuencias, o en el experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas según se define para ese sistema particular. Definir las condiciones de hibridación apropiadas esta dentro del experticio del arte. Ver, por ejemplo, Maniatis et al., *supra*; DNA Cloning, Vols. I & II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

Similarmente, dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 70% de los aminoácidos

son idénticos, o funcionalmente idénticos. Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas son identificadas mediante alineamiento usando, por ejemplo, programa de apilado GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin).

5

Como se utiliza aquí, "tratamiento" (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a una cualquiera o más de los siguiente: (i) la prevención de la infección o la reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción en la severidad de, o, en la eliminación de los síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o del desorden en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento puede ser efectuado profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección). En la presente invención, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con una modalidad particular de la presente invención, se suministran composiciones y métodos que tratan, incluyendo

10 inmunizar profilácticamente y/o terapéuticamente, un animal anfitrión contra una infección viral. Los métodos de la presente invención son útiles por que confieren inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un mamífero, preferiblemente un cerdo. Los métodos de la presente invención también pueden ser practicados sobre mamíferos para aplicaciones de investigación biomédica.

20

Los términos "vacunas" o "composición de vacunas", se utilizan de manera intercambiable, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden por lo menos una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune en un animal. Una vacuna o composición de vacuna puede proteger al animal de enfermedad o posible muerte debido a una infección, y puede o no incluir uno o más componentes adicionales que promuevan la actividad inmunológica del componente activo. Una vacuna o composición de vacuna puede adicionalmente comprender componentes adicionales típicos a las composiciones farmacéuticas. Una vacuna o composición de vacuna puede adicionalmente comprender componentes típicos

25 adicionales a vacunas o composiciones de vacunas, incluyendo, por ejemplo, un adyuvante o un inmunomodulador. El componente inmunogénicamente activo de una vacuna puede comprender organismos completamente vivos en su forma original, u organismos atenuados en una vacuna viva modificada, u organismos inactivados mediante métodos apropiados en una vacuna muerta o inactivada, o su unidad de

30

137

vacuna que comprende una o más componentes inmunogénicos del virus, o vacunas producidas por ingeniería genética por mutación o clonación preparadas por métodos conocidos por aquellos versados en la técnica. Una vacuna puede comprender una o simultáneamente más de un elemento descrito anteriormente. En la presente invención, las composiciones de vacuna incluyen, pero no se limitan a, formas vivas, atenuadas o muertas/inactivadas de circovirus porcino quimérico completo, ácidos nucleicos infecciosos que codifican los circovirus porcinos quiméricos, u otras vacunas de ADN infecciosas incluyendo plásmido, vectores, u otros portadores para inyectar directamente ADN en los cerdos.

10

Descripción General

Debido a su impacto potencial en la industria de los cerdos, el desarrollo de una vacuna contra formas patogénicas del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es de vital importancia. Se cree que el PCV1 no patogénico será de uso limitado contra las infecciones PCV2.

Más aún, han surgido nuevas cepas virulentas de PCV2, las cuales están caracterizadas en parte por una tasa de mortalidad mayor a la promedio. Estas cepas patogénicas de alta virulencia/alta mortalidad del PCV2 se han designado PCV2B, mientras que las cepas patogénicas de baja virulencia y baja mortalidad se han designado PCV2A. Nomenclatura alternas recientemente propuestas para estas dos cepas se refieren a la cepa PCV2A como "Genotipo II", o "RFLP 422", mientras que la cepa PCV2B se ha llamado como "Genotipo I", o "RFLP 321". Aunque ciertas de las composiciones de vacunas previamente descritas pueden probar ser efectivas contra la disminución de la mortalidad, cepas patogénicas menos virulentas del PCV2A, ninguna ha mostrado ser efectivas contra las cepas PCV2B patogénicas de alta virulencia, caracterizadas en parte por sus tasas de mortalidad más altas que el promedio.

Dada la severidad de las infecciones y las tasas de mortalidad más altas al promedio asociadas con estas las cepas PCV2B patogénicas altamente virulentas

138

del circovirus porcino, seria ventajoso identificar, aislar y utilizar una o más de estas cepas para la preparación de una composición inmunogénica o de vacuna para la inmunización y protección de los cerdos contra el síndrome post-destete de gasto multisistémico ((PMWS).

5

La presente invención se dirige hacia la identificación y aislamiento de tales cepas de PCV2B

En una modalidad, las recientemente identificadas y aisladas circovirus porcino es una cepa tipo 2B que tiene una secuencia de ácido nucleico como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 o 2. En una modalidad, el circovirus porcino aislado es una cepa tipo 2B que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos cerca del 95% de homología de secuencia con aquella de la SEQ ID NO: 1 o 2. En una modalidad, la proteína ORF2 del recientemente identificado y aislado circovirus porcino tipo 2B tiene por lo menos 92% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOs: 3 o 4.

En una modalidad de la presente invención, los métodos suministrados para inmunizar un cerdo contra un circovirus porcino patogénico tipo 2A o 2B (PCV2) comprenden administrar una cantidad inmunogénicamente efectiva de una composición inmunogénica que comprende un circovirus porcino codificado por los ácidos nucleicos de la presente invención.

En particular, los métodos de la presente invención suministran para el uso de una vacuna o composición inmunogénica que comprende uno o más de los siguientes:

a) Una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos uno de los circovirus porcino tipo 2 como se describen aquí, en cualquiera de sus formas atenuadas o inactivadas/muertos;

b) Una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos uno de los circovirus porcinos tipo 2 de a);

139

c) Una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos una proteína aislada de por lo menos uno de los circovirus porcinos tipo 2 de a); o

5 d) Una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína de c).

En una modalidad, la vacuna o composición inmunogénica puede comprender una vacuna de ADN de PCV2B (por ejemplo un vector plásmido que expresa el PCV2B ORF2. en una modalidad, la vacuna o composición inmunogénica
10 puede comprender un vector vírico inactivado (por ejemplo, un baculovirus, adenovirus, o virus de la viruela, o un virus de viruela del mapache; o una bacteria, tal como la *E.coli*), que expresa el PCV2B ORF2.

También se ha contemplado que la vacuna o las composiciones
15 inmunogénicas como se describen aquí son efectivas para prevenir uno o más de los síntomas asociados con el síndrome post-destete del gasto multisistémico (PMWS). Estos síntomas pueden incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: enfermedad respiratoria, lesiones microscópicas en uno o más de los tejidos u órganos, inflamación histiocítica o vaciado linfóide.

20

Más aún, las composiciones de vacunas o inmunogénicas descritas aquí pueden ser usadas con una segunda o tercera vacuna o composición inmunogénica que protege los cerdos contra una o más virus porcino patogénicos o bacterias que incluyen: el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), el
25 parvovirus porcino (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacteria leptospira, virus de la influenza del marrano, antígeno del *Escherichia coli*, corona virus respiratorio porcino, rotavirus, un patógeno
30 causante de la enfermedad de Aujeszky, y un patógeno causante de la gastroenteritis transmisible en cerdos. Por ejemplo, en una modalidad, la vacuna PCV o la composición inmunogénica pueden ser combinadas con una vacuna contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) o una composición inmunogénica para ello. En una modalidad, la vacuna o composición inmunogénica

MO

de PCV puede ser combinada con una vacuna contra el *Mycoplasma hyopneumoniae* o una composición inmunogénica de este. En una modalidad, la vacuna o composición inmunogénica de PCV puede ser combinada con una vacuna o composición inmunogénica del *Mycoplasma hyopneumoniae* y una vacuna o
5 composición inmunogénica del virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino (PRRS).

USO DE LAS COMPOSICIONES DE VACUNA E INMUNOGÉNICAS DE PCV 1-2

10 La presente invención suministra la identificación y aislamiento de dos nuevos circovirus porcinos PCV2B patogénicos. Dada la necesidad de una vacuna o composición inmunogénica para ser administrada a los cerdos para impedir la PMWS causada por una cepa patógena del circovirus porcino, o para mejorar por lo menos uno de los síntomas asociados con esta enfermedad en los cerdos, se visualiza que
15 por lo menos una de esta dos nuevas cepas, o por lo menos uno de los ácidos nucleicos que codifican estas dos nuevas cepas, o por lo menos, una de las proteínas obtenidas de por lo menos una de estas cepas, se puede formular en una composición de vacuna o inmunogénica para suministrarse a un cerdo para poder inmunizar el cerdo contra esta enfermedad, suministrando así la protección de los
20 cerdos contra la infección vírico y síndrome posdestete del gasto multisistémico (PMWS).

La vacuna o composición inmunogénica comprende por lo menos una de los circovirus porcinos PCV2B recientemente identificados y aislados propuestos para
25 uso como una composición inmunogénica o de vacuna en los presentes estudios se prepara usando los métodos descritos aquí.

Ácidos Nucleicos de la Invención

30 Las moléculas de ácido nucleico purificadas y aisladas que codifican el circovirus porcino de longitud completa tipo 2B patogénico, Como se describió aquí, y como se establece en la SEQ ID Nos: 1 y 2. Los métodos convencionales que están reconocidos en la técnica se pueden usar para hacer cadenas complementarias o secuencias de nucleótidos que poseen alta homología, por ejemplo, mediante el

141

estándar reconocido en la técnica o técnicas de hibridación de alta rigurosidad. La molécula de ácido nucleico purificada y aislada comprende la secuencia de ADN del gen cáspido inmunogénico del ADN del PCV2 como se establece en los residuos 1033-1734 de la SEQ ID Nos 5 y 6.

5

De acuerdo a lo anterior, cualquier célula animal adecuada que contiene la molécula de ácido nucleico del PCV2B descrita aquí puede producir circovirus porcino vivo e infeccioso. El virus vivo e infeccioso es derivado del clon de ADN mediante transfectar, por ejemplo, células PK-15 mediante *in vitro* o *in vivo*. Como se anotó anteriormente, un ejemplo del ADN del PCV2 es la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID Nos: 1 y 2. La invención visualiza adicionalmente que el virus se puede derivar de la cadena complementaria o de una secuencia de nucleótido que tiene alta homología, por lo menos 80%, y más preferiblemente, entre 95 a 99% de homología con respecto a la secuencia de nucleótido.

15

También se incluyen dentro del alcance la presente invención los plásmidos biológicamente funcionales, los vectores víricos y similares que contienen las moléculas de ácido nucleico descritas aquí, células anfitrionas adecuadas transfectadas por el vector que comprende los clones de ADN y los productos de expresión del polipéptido inmunogénico. En una modalidad, la proteína inmunogénica es la proteína cápsida codificada por el ORF2 a partir de una cepa patógena tipo 2B del circovirus porcino, como se describió aquí. La secuencia de aminoácido de esta proteína cápsida en el circovirus porcino se establece en la SEQ ID Nos: 3 y 4. Parientes biológicamente activos de las misas se abarcan adicionalmente por la invención. Una persona experta en la técnica podría saber modificar, sustituir, eliminar, etc., aminoácidos de la secuencia de polipéptido y producir variantes biológicamente activas que retengan la misma o, sustancialmente la misma actividad que la secuencia pariente sin debido esfuerzo.

30

Para producir los productos de polipéptido inmunogénico de ésta invención, el proceso puede incluir las siguientes etapas: hacer crecer, bajo condiciones de nutrientes adecuadas células anfitrionas procarióticas o eucarióticas transfectadas con las moléculas de ácido nucleico descritas aquí de una manera que permita la expresión de los productos de polipéptido, y aislar los productos de

142

polipéptido deseados mediante métodos estándar conocidos en la técnica. Se contempla que las proteínas inmunogénicas pueden prepararse mediante otras técnicas tales como, por ejemplo, síntesis bioquímica y similares.

5 Vacunas y Composiciones Inmunogénicas

La preparación de las vacunas o composiciones inmunogénicas que comprenden el virus patogénico PCV2B, como se describió aquí, y los métodos para usarlas para la protección de cerdos contra la infección con cepas patogénicas de circovirus porcino y PMWS, también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Se visualiza que los nuevos aislados del PCV2B se pueden utilizar como una preparación muerta/inactiva o se pueden atenuar o modificar genéticamente para uso en la inmunización de cerdos contra la infección vírico y el PMWS. De acuerdo a lo anterior, la presente invención propone métodos para inmunizar cerdos contra la infección con un circovirus patogénico o contra la PMWS estando una cantidad inmunogénicamente efectiva de una vacuna o composición inumogénica que comprende una de los dos circovirus porcinos patogénicos descritos aquí, o por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos uno de estos dos circovirus, o por lo menos una proteína obtenida a partir de por lo menos uno de estos dos circovirus. El método puede proteger los cerdos que requieren de protección contra la infección vírico contra el PMWS mediante administrar al cerdo una cantidad inmunogénicamente efectiva de una vacuna de acuerdo con la invención, tal como, por ejemplo, una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica del ADN del PCV2B, el virus clonado, un plásmido o un vector vírico que contiene el ADN del PCV2B, los productos de fusión del polipéptido, etc. La vacuna como se describió aquí, se puede administrar con una segunda o tercera vacuna o composición inmunogénica contra otros patógenos porcinos incluyendo por ejemplo, PRRSV, PPV, y otros agentes infecciosos de los cerdos seleccionados entre los siguientes: *Mycoplasma hyponeumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleunopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella cholerasuis*, *Erysipelothrix rhusiophatiae*, bacteria leptospira, virus de la influenza del cerdo, parvovirus porcino, *Escherichia coli*, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, un patógeno causante de la enfermedad de Aujesky, y un patógeno causante del antígeno de la Gastroenteritis Transmisibile

en los Marranos. Las combinaciones particulares pueden incluir una vacuna o composición inmunogénica de PCV en combinación con una vacuna PRRSV o una composición inmunogénica de ésta. Una vacuna o composición inmunogénica de PCV en combinación con una vacuna o composición inmunogénica de *Mycoplasma*
5 *hyponeumoniae* o una vacuna o composición inmunogénica PCV en combinación con ambas vacuna o composiciones inmunogénicas anteriores. Los estimulantes inmunes se pueden dar concurrentemente a los cerdos para suministrar un amplio espectro de protección contra otras infecciones virales o bacterianas.

10 Las vacunas o composiciones inmunogénicas usadas en los métodos de la invención no están restringidas a ningún tipo particular o método de preparación. Las vacunas o composiciones inmunogénicas pueden incluir, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica uno o más de las proteínas de circovirus porcino, vacunas de ADN infeccioso (es decir que usan plásmidos, vectores, u otros portadores
15 convencionales para directamente inyectar ADN en los cerdos), vacunas vivas, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivas, vacunas de subunidades, vacunas atenuadas, vacunas trabajadas en ingeniería genética, etc. En ciertas modalidades, la vacuna puede incluir el ADN infeccioso del PCV2B, el genoma del ADN clonado del PCV en plásmidos adecuados o vectores adecuados, tales como, por ejemplo, un
20 vector pSK, un avirulento, un virus vivo, un virus inactivo, etc., o un vector vírico que se puede usar, tal como, pero sin limitarse a, un vector de baculovirus, un vector de adenovirus, o un vector poxvirus, tal como virus del mapache, o el E. coli. Cualquiera de los anteriores se puede usar en combinación con un portador no tóxico, fisiológicamente aceptable y opcionalmente, uno o más adyuvantes.

25 Las vacunas o composiciones inmunogénicas del virus inactivo se preparan mediante tratar el virus derivado del ADN del clonado del PCV con agentes inactivantes tales como formalina o disolventes hidrófobos y etc., mediante irradiación con luz ultravioleta o rayos X mediante el calor, etc. La inactivación se conduce de una manera comprendida en la técnica. Por ejemplo, en la inactivación química, una
30 muestra de virus adecuado o una muestra de suero que contiene el virus se trata durante una longitud de tiempo suficiente con una cantidad suficiente o concentración suficiente del agente inactivante a una temperatura suficientemente alta (o baja, dependiendo del agente inactivante) o un pH para inactivar el virus. La inactivación

por calor es conducida a una temperatura y durante una longitud de tiempo suficiente para inactivar el virus. La inactivación por irradiación es conducida usando una longitud de onda de luz u otra fuente de energía durante una longitud de tiempo suficiente para inactivar el virus. El virus se considera inactivo si es incapaz de infectar una célula susceptible a la infección.

La preparación de vacunas de subunidades típicamente difiere de la preparación de una vacuna modificada viva o de una vacuna inactiva. Antes de la preparación de una vacuna de subunidad, los componentes protectores o antigénicos de la vacuna se pueden identificar. Tales componentes protectores identificados o antigénicos incluyen ciertos segmentos de aminoácido o fragmentos de las proteínas de cápsidas virales que promueven una respuesta protectora o inmunológica particularmente fuerte en cerdos; las proteínas cápsidas virales únicas o múltiples mismas, oligómeros de ellas, y asociaciones de alto orden de las proteínas cápsidas virales que forman estructuras de virus o partes identificables o unidades de tales estructuras; oligoglicósidos, glicolípidos o glicoproteínas presentes en o cerca a la superficie del virus o estructuras virales tales como las lipoproteínas o los grupos lípidos asociados con el virus, etc. Preferiblemente, una proteína cápsida tal como la proteína codificada por el gen ORF2, se emplea como el componente antigénico de la vacuna de subunidad. Otras proteínas codificadas por el clon de ADN infeccioso también se pueden utilizar. Estos componentes inmunogénicos son fácilmente identificables por métodos conocidos en la técnica. Una vez identificados, las porciones protectoras o antigénicas del virus (es decir la "subunidad") se purifican y/o se clonan subsiguientemente mediante procedimientos conocidos en la técnica. La vacuna de subunidad suministra una ventaja sobre otras vacunas con base en el virus ya que la subunidad, tal como subunidades altamente purificadas del virus, son menos tóxicas que el virus completo.

Si una vacuna de subunidades producida mediante técnicas genéticas recombinantes, la expresión de la subunidad clonada tal como el gen ORF2 (cápsido), por ejemplo, se puede optimizar por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbo, Mass., 1989). Si la subunidad que está empleada representa un rasgo estructural intacto del

145

virus, tal como una proteína cápsida completa, el procedimiento para su aislamiento del virus entonces se puede utilizar. Cualquier caso, después de la optimización del protocolo de inactivación, el protocolo de purificación de la subunidad se puede optimizar antes de la fabricación.

5

Para preparar vacunas atenuadas de clones patogénicos, el cultivo del tejido adaptado, vivo, patogénico PCV2 se atenúa primeramente, es decir se convierte en no patogénico o no dañino) mediante métodos conocidos en la técnica, típicamente mediante pasajes seriado a través de cultivos celulares. La atenuación de clones también se puede hacer por eliminaciones o mutaciones de genes producidas viralmente. Entonces, los virus PCV2 atenuados se pueden usar para construir virus PCV2 adicionales que retienen el fenotipo no patogénico del PCV1 pero pueden variar en la fuerza de los tratos en inmunogenicidad seleccionados del genoma PCV2 mediante tecnología recombinante.

15

Vacunas adicionales obtenidas por ingeniería genética, que son deseables en la presente invención, se producen mediante técnicas conocidas en la técnica. Tales técnicas involucran, pero no se limitan a, manipulación adicional de ADN recombinante, modificación o sustituciones a las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes y similares.

Las vacunas producidas por ingeniería genética con base en la tecnología de ADN recombinante se hacen, por ejemplo, mediante identificar porciones alternativas del gen vírico responsable para inducir una respuesta inmune más fuerte o protectora en los ceros (por ejemplo, proteínas derivadas del ORF3, ORF4, etc.). Tales genes identificados o fragmentos inmunodominantes se pueden clonar en vectores de expresión de proteína estándar, tal como el vector baculovirus, y utilizados para infectar células anfitrionas apropiadas (ver, por ejemplo, O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman & Co., 1992). Las células anfitrionas se cultivan, las cuales expresan las proteínas de vacuna deseadas, que se pueden purificar al grado deseado y formuladas en productos de vacuna adecuados.

146

Si los clones retienen cualquiera de las habilidades naturales no deseables de causar enfermedad, también es posible apuntar las secuencias de nucleótido en el genoma vírico responsable de la virulencia, y por medio de ingeniería genética avirulentar el virus mediante, por ejemplo, mutagenia dirigida a sitio. La mutagenia dirigida a sitio es capaz de agregar, eliminar o cambiar uno o más nucleótidos (por ejemplo, ver Zoller et al., DNA 3:479-488, 1984). Un oligonucleótido se sintetiza el cual contiene la mutación deseada y se incluye en una porción del ADN vírico de cadena única. La molécula híbrida, que resulta de ese procedimiento, se emplea para transformar bacterias. Luego el ADN de doble cadena, que se aísla que contiene la mutación apropiada, se utiliza para producir ADN de longitud completa mediante la ligación a un fragmento de restricción de este último que se transfecta posteriormente en un cultivo celular adecuado. La ligación del genoma dentro del vector adecuado para transferir se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica estándar conocida por aquellos expertos en la técnica. La transacción del vector en células anfitrionas para la producción de la progenia vírica se puede hacer utilizando cualquiera de los métodos convencionales tales como transacción mediada por calcio-fosfato o por DEAE-dextran, electroporación, fusión de protoplasto y otras técnicas bien conocidas (por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El virus clonado exhibe entonces la mutación deseada. Alternativamente, dos oligonucleótidos se pueden sintetizar los cuales contienen la mutación apropiada. Estos se pueden ingresar para formar el ADN de doble cadena que se puede insertar en el ADN vírico para producir el ADN de longitud completa.

Las proteínas trabajadas por ingeniería genética, útiles en las vacunas, por ejemplo, se pueden expresar en células de insectos, células de levadura o células de mamíferos. Las proteínas trabajadas por ingeniería genética, que se pueden purificar o aislar mediante métodos convencionales, pueden ser directamente inoculadas en cerdos para conferir la protección contra la infección vírica o el síndrome postdestete de gastro multisistémico (PMWS) originado por el PCV2.

Una línea celular de insectos (como HI-FIVE) se puede transformar con un vector de transferencia que contiene las moléculas de ácido nucleico obtenidas del virus o copiadas del genoma vírico que codifican una o más de las proteínas

inmunodominantes del virus. El vector de transferencia incluye, por ejemplo, ADN del baculovirus linearizado y un plásmido que contiene los polinucleótidos deseados. La línea celular anfitriona se puede cotransfectar con el ADN del baculovirus linearizado y un plásmido para poder hacer un baculovirus recombinante.

5

Alternativamente, el ADN de un cerdo que sufre de PMWS, el cual codifica una o más proteínas cápsidas, el clon de ADN molecular infeccioso del PCV2 o el genoma del ADN del PCV clonado se puede insertar en vectores vivos, tal como poxvirus o un adenovirus y se puede utilizar como una vacuna.

10

Una cantidad inmunogénicamente efectiva de las composiciones de la presente invención es administrada a un cerdo que necesita de protección contra la infección vírica o contra el PMWS. La cantidad inmunogénicamente efectiva o la cantidad inmunogénica que se inyecta al cerdo se puede determinar fácilmente o titular fácilmente mediante ensayos de rutina. Una cantidad efectiva es una en la cual una respuesta inmunológica suficiente a la vacuna se logra para proteger al cerdo expuesto al virus que causa el PMWS. Preferiblemente, el cerdo está protegido hasta un grado en el cual uno o todos los síntomas fisiológicos adversos o efectos de la enfermedad vírica se reducen significativamente, se mejoran o son totalmente impedidos.

20

La vacuna o composición inmunogénica se puede administrar en una dosis única o en dosis repetidas. Las dosificaciones pueden variar, por ejemplo, entre 50 a 5,000 microgramos del ADN del plásmido que contiene el genoma de ADN infeccioso (dependiendo de la concentración del componente inmunoactivo de la vacuna) pero no debería contener una cantidad de antígeno basado en virus suficiente para resultar en una reacción adversa o síntomas fisiológicos de infección vírica. Los métodos se conocen en la técnica para determinar o titular las dosificaciones adecuadas del agente antigénico activo con base en el peso del cerdo, la concentración del antígeno y otros factores típicos. Preferiblemente, el clon de ADN vírico infeccioso se utiliza como una vacuna o un virus infeccioso vivo se puede generar in vitro y luego el virus vivo se puede atenuar y utilizar como una vacuna. En ese caso, 100 a 200 microgramos del ADN del PCV es clonado o aproximadamente

25

30

10,000 en un cultivo de tejido al 50% de dosis no efectiva (TCID₅₀) de virus atenuado vivo se puede dar a un cerdo.

De forma deseable, la vacuna o composición inmunogénica se administra a un cerdo que todavía no está expuesto al virus PCV. La vacuna que contiene el clon de ADN infeccioso del PCV2 u otras formas antigénicas del mismo puede convenientemente administrarse intranasalmente, trasdérmicamente (es decir, aplicada sobre o en la superficie de la piel para absorción sistémica), parenteralmente, etc. La ruta parenteral de administración incluye, pero no se limitan a rutas intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica (es decir, inyectada o de otra manera colocada por debajo de la piel) y similares. Ya que las rutas intramuscular e intradérmica de inoculación han sido exitosas en otros estudios utilizando clones de ADN infeccioso vírico (E. E. Sparger et al., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," Virology 238:157-160 (1997); L. Willems et al., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," Virology 189:775-777 (1992)), estas rutas son las más preferidas, en adición a la ruta práctica intranasal de administración. Aunque menos conveniente, también se contempla que la vacuna se de al cerdo mediante la vía intralinfoide de inoculación. Un método único y altamente preferido de administración involucra inyectar directamente el ADN del plásmido que contiene el PCV2 o el virus de PCV2 (atenuado o inactivado) en el cerdo de manera intramuscular, intradérmica, intralinfoide, etc.

Cuando se administra como un líquido, la presente vacuna se puede preparar en la forma de una solución acuosa, jarabe, elixir, tintura, o similar. Tales formulaciones se conocen en la técnica y se preparan típicamente mediante la disolución del antígeno u otros aditivos típicos en el portador apropiado o sistema disolvente. Los portadores "fisiológicamente aceptables" adecuados o disolventes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, etc. Los aditivos típicos son, por ejemplo, tinturas certificadas, saborizantes, endulzantes, y conservantes antimicrobianos tales como timerosal (etilmercuritosalicilato de sodio). Tales soluciones se pueden estabilizar, por ejemplo, mediante la adición de gelatina parcialmente hidrolizada, sorbitol o medio de cultivo celular, y se pueden amortiguar mediante métodos convencionales utilizando reactivos conocidos en la

técnica, tal como fosfato de sodio hidrógeno, dihidrogenfosfato de sodio, hidrogenfosfato de potasio, dihidrogenfosfato de potasio, una mezcla de estos, y similares.

- 5 Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión o de emulsificación en combinación con otros coformulantes estándar. Estos tipos de formulaciones líquidas se pueden preparar mediante métodos convencionales. Las suspensiones, por ejemplo, se pueden preparar utilizando un molino coloide. Las emulsiones, por
- 10 ejemplo, se pueden preparar utilizando un homogenizador.

- Las formulaciones parenterales, designadas para inyección dentro de los sistemas de fluido del cuerpo, requieren la isotonicidad apropiada y amortiguación del pH a los niveles correspondientes de los fluidos del cuerpo porcino. La isotonicidad
- 15 se puede ajustar apropiadamente con cloruro de sodio u otras sales según se requiera. Los disolventes adecuados, tales como etanol, o propilenglicol, se pueden utilizar para incrementar la solubilidad de los ingredientes en la formulación y la estabilidad de la preparación líquida. Aditivos adicionales que se pueden emplear en la presente vacuna incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, antioxidantes
- 20 convencionales y agentes quelantes convencionales tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). Las formas de dosificación parenteral también pueden ser esterilizadas antes de uso.

- En una modalidad, el gen cápsido ORF2 inmunogénico derivado de por lo
- 25 menos uno de los circovirus tipo 2B descritos aquí se pueden utilizar en la vacuna o en la composición inmunogénica.

Adyuvantes

- 30 La presente invención proporciona para el aislamiento e identificación de dos circovirus porcinos tipo 2B nuevos (PCV2B) codificados por secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NOs: 1 y 2. Estas nuevas cepas de PCV2B se aíslan de cerdos que se expusieron ambientalmente y como tales, pueden ser candidatos ideales para uso en la preparación en la vacuna y las composiciones inmunogénicas.

150

Es un objeto de la invención utilizar estas cepas en las formas muertas/inactivadas, o preparar formas atenuadas de estas dos cepas para la preparación de la vacuna o de las composiciones inmunogénicas. También es un objeto de la invención proporcionarlas con o sin un adyuvante a una población de cerdos para prevenir el

5 PMWS o APRA mejorar por lo menos un síntoma asociado con esta enfermedad.

De acuerdo con lo anterior, un circovirus porcino tipo 2B vivo, atenuado, o un circovirus porcino muerto/inactivado como se describió aquí o el ácido nucleico que codifica estos circovirus porcinos, o por lo menos una proteína obtenida de estos

10 circovirus se puede administrar con o sin un adyuvante. En una modalidad, la vacuna es un circovirus del PCV2B muerto/inactivo, que se administra con un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que incrementa la respuesta inmunológica del cerdo a la vacuna. El adyuvante se puede administrar al mismo tiempo y en el mismo sitio de la vacuna, o a diferente tiempo, por ejemplo, como un impulsador. Los adyuvantes

15 también se pueden administrar ventajosamente al cerdo de una manera o en un sitio diferente de la manera o sitio en el cual se administró la vacuna. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio (alum), complejos inmunoestimuladores (ISCOMS), polímeros o copolímeros de bloque no iónicos, citocinas (como IL-1, IL-2, IL-7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.), saponinas, lípido A monofosforilo (MLA), dipéptidos muramilo (MDP) y similares. Otros adyuvantes

20 adecuados incluyen, por ejemplo, sulfato de aluminio potasio, lábil por calor o enterotoxina lábil por calor o estable al calor aislada del Escherichia coli, toxina del cólera o la subunidad de la misma, la toxina de la difteria, la toxina de tétano, la toxina de la tos ferina, el adyuvante incompleto o completo de Freund, etc. Los

25 adyuvantes con base en toxinas, tal como la toxina de la difteria, la toxina del tétano y la toxina de la tos ferina se pueden inactivar antes del uso, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído.

Ensayos para medir la respuesta inmune

30

La producción funcional de vacunar un cerdo contra el circovirus porcino se puede determinar mediante ensayos adecuados que monitorean la inducción de la inmunidad celular o humoral o la actividad de la célula T. Estos ensayos se conocen por aquellos expertos en la técnica, pero pueden incluir mediciones de la actividad de

157

la célula T citolítica utilizando por ejemplo, un ensayo de liberación de cromo. Alternativamente, los ensayos proliferativos de célula T se pueden utilizar como una indicación de la reactividad inmune o la carencia de ella. Adicionalmente, se pueden hacer estudios in vivo para determinar el nivel de protección en un mamífero

5 vacunado contra un patógeno usando los métodos de la presente invención. Ensayos in vivo típicos pueden involucrar vacunar un animal con un antígeno, tal como el circovirus porcino quimérico descrito aquí. Después de esperar un tiempo suficiente para la inducción de un anticuerpo o la respuesta de las células T, en general en

10 aproximadamente 1 a 2 semanas después de la inyección, los animales serán infectados con el antígeno, tal como un virus, y el mejoramiento de uno de los síntomas asociados con la infección viral, o la supervivencia de los animales se monitorea.

Un régimen de vacunación exitoso con el circovirus de porcino resultará

15 en una disminución significativa en uno o más de los síntomas asociados con la infección viral, o una disminución en la viremia, o una disminución en el número o severidad de lesiones asociadas con una infección viral, o la supervivencia cuando se compara con controles no vacunados. El suero también se puede recolectar para monitorear los niveles de anticuerpos generados en respuesta a la infecciones de

20 vacuna, según se mide por los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Métodos para comparar aislados de circovirus porcino tipo 2A y tipo 2B

25 Puede ser posible que los circovirus porcinos tipo 2B recientemente identificados pueden ser efectivos como vacunas o composiciones inmunogénicas para proteger contra la infección contra cualquiera de los tipos de circovirus tipo 2A o tipo 2B, ambos de los cuales son patogénicos en los cerdos. Las cepas tipos 2A y tipo 2B se pueden diferenciar mediante el uso de análisis de polimorfismo de

30 restricción de longitud de fragmento (RFLP). La RFLP utiliza la digestión de enzimas del ácido nucleico vírico (parcial o completo), lo que resulta en un patrón de corte específico que se visualiza sobre un gel. Si hay diferencias entre los virus en el sitio de corte de la enzima, se pueden observar diferentes patrones. Esta técnica de huella digital se ha utilizado comúnmente para los virus de ADN. Meng *et al.* (Publicación

152

de patente U.S. 2005/0147966) describe el uso de un ensayo PCR-RFLP utilizando la enzima de restricción NcoI para distinguir entre circovirus porcinos no patogénicos tipo I y circovirus porcinos patogénicos tipo II. Un ensayo de PCR-RFLP con base en ORF2 descrito en 2000 que utiliza *Hinfl*, *HinP1I*, *KpnI*, *MseI*, y *RsaI* como enzimas es capaz de distinguir entre aislados de PCV2 (PCV2A, B, C, D, and E) (Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP: PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.* 64:44-52, 2000).

Un ensayo PCR-RFLP con base ORF2 que utiliza las enzimas *Sau3AI*, *BanII*, *NsPI*, *XbaI*, y *CfrI* se ha descrito recientemente y es capaz de distinguir entre 9 genotipos de PCV2 diferentes (Wen L, Guo X, Yang H: Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet Microbiol.* 110:141-146, 2005). El análisis PCV2 RFLP mostró que existe un cambio significativo entre el RFLP tipo 422 al tipo 321 en 2005 en Ontario, Canada (Delay J, McEwen B, Carman S, van Dreuel T, Fairles J: Porcine circovirus type 2-associated disease is increasing. *AHL Newsletter.* 9:22, 2005).

En adición a la utilización del análisis RFLP para diferenciar entre el circovirus porcino tipo 2A y tipo 2B se cree que estas dos cepas se pueden diferenciar sobre la base del análisis de secuencias.

Por ejemplo, con el análisis de secuencias es posible caracterizar la información genética y comparar los aislados uno con el otro (Choi J, Stevenson GW, Kiupel M, Harrach B, Anothayanontha L, Kanitz CL, Mittal SK: Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 66:217-224, 2002; De Boissésou C, Béven V, Bigarré L, Thiéry R, Rose N, Eveno E, Madec F, Jestin A: Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol.* 85:293-304, 2004; Fenaux M, Halbur PG, Gill M, Toth TE, Meng XJ: Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and

153

PCV-2. J Clin Microbiol. 38:2494-2503, 2000; Grierson SS, King DP, Sandvik T, Hicks D, Spencer Y, Drew TW, Banks M: Detection and genetic typing of type 2 porcine circovirus in archived pig tissues from the UK. Arch Virol. 149:1171-1183, 2004; Kim JH, Lyoo YS: Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. J Vet Sci. 3:31-39, 2002; Mankertz A, Domingo M, Folch JM, LeCann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Plana-Durán J, Soike D: Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. Virus Res. 66:65-77, 2000). Para investigar adicionalmente posibles diferencias entre aislados de PCV2 es posible secuenciar el genoma completo del PCV2 o secuenciar solamente el ORF2.

10

Las dos cepas también difieren con respecto a la patología, los síntomas clínicos y la mortalidad asociada con la enfermedad misma, con el tipo 2A demostrando menos lesiones severas en los tejidos del cuerpo y una tasa de mortalidad más baja, comparado con las lesiones más severas y la tasa de mortalidad más alta asociada con la cepas tipo 2B. Estos parámetros clínicos se pueden utilizar midiendo procedimientos estándar conocidos en la técnica y como se demuestra en la presente invención.

15

EJEMPLOS

20

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. Sin embargo, se debe entender que estos ejemplos tienen el propósito de ilustrar solamente y no tienen los propósitos de ser completamente definitivos en cuanto a las condiciones y alcance de esta invención. Se debería apreciar que cuando las condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.) se han dado, las condiciones tanto anteriores y posteriores de los rangos especificados también se pueden utilizar aunque generalmente son menos convenientes. Todas las partes y porcentajes nombrados aquí son con base a peso y todas las temperaturas se expresan en grados C a menos que se especifique de otra forma.

25

30

EJEMPLO 1

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DOS NUEVAS CEPAS TIPO 2B DE CIRCOVIRUS PORCINO

154

Un estudio fue planeado para ensayar una nueva formulación de vacuna en cerdos para determinar su eficacia contra circovirus porcino y *M. hyopneumoniae*. Durante el curso del estudio, se observó que varios de los cerdos en el control y los grupos vacunados exhibieron síntomas del PMWS. Esto fue confirmado luego de que los cerdos fueron expuestos al PCV2 ambiental antes de la infección. El análisis molecular sobre las muestras de sangre y de tejido de estos cerdos reveló que ellos cosecharon una cepa tipo 2B que era diferente de la cepa utilizada para la infección. Más aún, el análisis de secuencia estableció que la cepa PCV2B designadas FD07 y otra nueva cepa PCV2B aislada de un cerdo en la finca (designada FDJE) eran diferentes de las otras cepas tipo 2B identificadas en otros estudios de campo y de aquellas identificadas previamente con otros. Los materiales y métodos para el aislamiento y caracterización de estas dos nuevas cepas PCV2B se describen adelante.

15

Materiales y Métodos

Animales de Ensayo

Cerdos convencionales macho y hembra criados mezclados se utilizan para este estudio. Hubo 24 vacunados y 24 de control. Los cerdos tenían tres semanas de edad en el momento de la vacunación.

Los cerdos para el estudio se compraron de una finca comercial y se identifican utilizando una etiqueta en la oreja. Los cerdos se obtuvieron de un solo rebaño de puente. En el momento de la primera vacunación los cerdos eran seronegativos con respecto al PCV2 según se determinó por ELISA (proporción S/P $\leq$ 0.5). La población objetivo para el estudio era cerdos alimentados saludables. Con respecto a su función inmune, los animales seleccionados para este estudio fueron representativos de cerdos de criadores en los Estados Unidos.

Los cerdos se encerraron en instalaciones aisladas en FDAH, Fort Dodge, IA. Los vacunados y los de control se entremezclaron durante todo el estudio en ambientes similares. Los lechones se bloquearon en curtos por camadas. El

155

espacio de los sitios cumple con las regulaciones aplicables del bienestar animal. Los cerdos se alimentan con una dieta comercial estándar con agua y alimento disponibles *a voluntad*.

- 5 Los cerdos que requirieron atención médica se trataron según sea necesario por el veterinario de planta después de consultar con el investigador del estudio.

- 10 Los resultados del ensayo PCV2-PCR de las muestras de suero indicaron la exposición al PCV2 accidental/ambiental de los lechones en uno de los cuartos antes de la infección experimental. El PCV2 se detectó primero en el suero de un lechón de control a los días después de la vacunación, e identificado como una cepa de circovirus porcino tipo 2B (PCV2B) por secuenciamiento de ADN. Este PCV2B infectó seis lechones adicionales. Dos de los cerdos de control no vacunados
15 desarrollaron signos clínicos asociados con PCV2 y se les practicó eutanasia a los 18 días después de la infección debido a las pobres condiciones de salud. Los signos clínicos incluyeron, pero no se limitaron a, inapetencia, letargia, depresión, estornudos, tos, descarga nasal, descarga ocular y dispnea. Antes de practicar la eutanasia a los animales, muestras de tejido y de sangre se recolectaron para los
20 análisis del circovirus y el secuenciamiento.

Recolección y ensayo de las muestras

Recolección de muestras

25

Muestras nasales

- 30 Las muestras nasales se recolectan en los días 0 después de la vacunación (DPV) para el aislamiento del PCV2 para asegurarse de que no hay infección PCV2 en los animales ensayados antes de la vacunación. Las muestras de pegado nasal se colocan en tubos estériles individuales que contienen 3 mL de MEM con hidrolisato de lactalbúmina (LAH) y gentamicina (60 µg/mL), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL), y se almacena por debajo de 50° C hasta el ensayo.

156

Muestras de suero

- 5 Los cerdos se les tomó muestras de sangre para recolectar muestras de suero (no más de 10 mL) en 0, 13, 28 DPV, y -1, 7, 14, 20 DPC para ensayos ELISA, y en 0, 13, 28 DPV, -1, 3, 7, 10, 14, 17, 20 DPC para ensayos PCR.

Muestras de tejidos

- 10 Todos los animales se les practicó necropsia en los días 20/21 DPC. Las secciones de tres nodos linfáticos (traquobronquial, iliaco e inguinal), de amígdalas, y bazo se recolectaron y fijados en formalina para el examen de histopatología y la inmunohistoquímica del PCV2 (IHC).

15 Ensayo de las Muestras

Ensayo de inmunosorbencia ligado a enzima (ELISA)

- 20 El ELISA indirecto se utiliza para detectar anticuerpos anti-PCV2 en las muestras de suero utilizando proteína cápsida PCV2 recombinante (expresada en baculovirus) según se capture por el antígeno. Brevemente, una placa de poliestireno de 96 pozos se recubre con antígeno de captura positivo (células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante que expresa la proteína cápsida PCV2). Seis pozos en cada placa se recubren con antígeno de captura negativo (células de insecto SF9) como un control. Después de tratar la placa con reactivo de bloqueo la placa se incuba con las muestras de ensayo y de control de suero. Cada muestra de suero de ensayo se agrega dentro de los pozos de un antígeno de captura positivo con inmunoplaaca recubierta (tres pozos por cada muestra de ensayo). Las muestras de suero de control positivo se agregan a seis pozos de la inmunoplaaca recubierta con el antígeno de captura positivo (control positivo) y seis pozos de la inmunoplaaca recubierta con el antígeno de captura negativo (control negativo). Luego el anticuerpo secundario anti-cerdo de cabra conjugado con HRP se agrega a la placa. Finalmente, TMB (sustrato de peroxidasa) se agrega e incuba durante un tiempo apropiado y consistente. El color desarrollo se cuantifica con un lector de placa ELISA. Cada
- 25
- 30

157

- reactivo en la placa ELISA se incubaba de una manera bien definida y se lava para remover el exceso de reactivo antes de cada etapa sucesiva. El OD de las muestras de ensayo y el control positivo fueron calculado mediante restar el OD promedio del control negativo del OD promedio de las muestras de ensayo y del control positivo. El
- 5 título de suero se expresa como la proporción S/P (muestra/control positivo) que es, el OD de la muestra de ensayo dividido por aquel de la muestra de control positivo.

10 **Ensayo PCR**

- El ensayo PCR específico a PCV2 se utiliza para detectar la presencia de ADN genómico vírico de PCV2 en muestras de suero. El ADN genómico vírico se purifica del suero utilizando el minikit del virus MatAttract QIAGEN y la M48
- 15 Workstation QIAGEN BioRobot. Para detectar secuencias específicas del PCV2, un fragmento 592-bp se amplifica mediante utilizar la polimerasa de ADN ABI AmpliTaq Gold y los cebadores específicos a gen: F1PCV2, 5'-ATGCCCAGCAAGAA GAATGG-3' (SEQ ID NO:7) y RPCV2, 5'-TGGTTTCCAGTATGT GGTTC-3' (SEQ ID NO: 8). El ADN vírico purificado se utiliza como plantilla y desnaturalizado a 95° C
- 20 durante 10 minutos. El programa PCR de las reacciones consiste de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s, templado a 59° C durante 1 min, y la extensión a 72° C durante 1 min. 10 µL del producto PCR se utiliza para detectar el fragmento de ADN 592 bp de PCV2 mediante electrofóresis de gel de azarosa.

25 **Histopatología**

- Muestras de tejido del bazo, amígdalas y tres nodos linfáticos (traqueobronquial, iliaco e inguinal), se recolectan de cada animal durante la necropsia, se fijan en formalina amortiguada neutra a 10% durante 2 a 4 días y
- 30 embebida en parafina. Secciones de 4 micrómetros se manchan con hematoxilina y eusina y examinadas bajo microscopio de luz para la evaluación histopatológica.

Las muestras se evalúan en cuanto al grado de vaciado de linfocitos/reemplazo histiocítico. Brevemente, todos los tejidos se examinan de una

manera a ciegas y se les da marcaciones subjetivas para el nivel de vaciado de linfocitos y el reemplazo histiocítico graduada las marcas de vaciado de linfoides entre 0 a 3 se asignó como sigue: 0 – normal, 1 – vaciado de linfoides suave con pérdida de celularidad general, 2 – vaciado de linfoides moderado, 3 – vaciado
5 severo de linfoides con pérdida de estructura del folículo linfoide. Las marcas graduadas de reemplazos histiocíticos entre 0 a 3 se asignan de una manera similar como sigue: 0 – normal, 1 – inflamación histiocítica a granulomatosa suave, 2 – inflamación histiocítica a granulomatosa moderada, 3 – inflamación histiocítica a granulomatosa severa con reemplazo de folículos.

10

Las evaluaciones histopatológicas se conducen por un patologista certificado en el Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (Ames, IA).

15 **Ensayo de Inmunohistoquímica (IHC)**

El antígeno específico a PCV2 en los nodos linfáticos, en tejidos de amígdalas y de bazo se detectan por el ensayo inmunohistoquímico. Brevemente, secciones de 4 micrómetros de tejidos se colocan sobre placas de vidrio y se tratan
20 con xileno para remover la parafina. Las secciones desparafinizadas se calman para peroxidasa endógena con 3% de H_2O_2 en PBS durante 20 min. Después de enjuagar con agua destilada las secciones se incuban a temperatura ambiente durante la noche con suero policlonal anti PCV2 de conejo diluido 1:1,000 en PBS. Después de lavar con PBS las secciones luego se incuban con IgG anticonejo de cabra biotinilado
25 durante 30 min a temperatura ambiente. Luego las secciones se incuban con el conjugado de estreptavidina peroxidasa y “visualizada” con sustrato de tratrahidrocloruro de diaminobenzidina. La cantidad del antígeno PCV2 se determina de una manera a ciegas con base en el nivel del manchado de antígeno del PCV2. La graduación se asigna como sigue: 0 – no hay manchas, 1 – bajo nivel de manchado,
30 2 – nivel medio de mancado, y 3 – alto nivel de manchado. El IHC de los tejidos se conduce en el Veterinary Diagnostic Laboratory in the Iowa State University College of Veterinary Medicine (Ames, IA).

RESULTADOS

Aislamiento del virus

5 Las muestras nasales se recolectan en los días 0 postvacunación (DPV) para aislamiento de PCV2 para asegurar que no hay infección PCV2 en los animales de ensayo antes de la vacunación. Ningún virus se aísla de las muestras nasales de cada animal de ensayo, indicando la carencia de exposición de estos cerdos a la infección PCV2 ambiental en el momento de la vacunación.

10

Titulación del material de infección PCV2

Los resultados de la titulación del material de infección virulento PCV2 (Cepa 40895) se muestran en la Tabla 1. El título promedio del virus de infección de 15 titulaciones por triplicado es de 4.6 Log₁₀ FAID₅₀/mL.

Serología

20 Los resultados del ELISA de anticuerpo específico a PCV2 se muestran en la tabla 2.

En el día 0 DPV1, las proporciones ELISA S/P en los controles (grupo C) variaron de -0.009 a 0.366 con una proporción S/P promedio de 0.135. Luego de la vacunación, los títulos de anticuerpo ELISA en los controles declinaron hasta niveles 25 de fondo en el día 13 DPV y todos los lechones permanecieron seronegativos hasta el día de la infección. Las proporciones S/P promedio son 0.049 en 13 DPV, 0.023 en 28 DPV, y 0.004 en 35 DPV (-1 DPC), respectivamente. Luego de la infección con PCV2 las proporciones S/P promedio se incrementan significativamente desde 0.125 en 7 DPC, 0.612 en 14 DPC, a 0.922 en 20 DPC.

30

En 0 DPV1, las proporciones ELISA S/P en los vacunados (grupo V) variaron de -0.028 a 0.364 con proporciones S/P promedio de 0.126. Luego de la vacunación las proporciones S/P son 0.041 en 13 DPV, 0.097 en 28 DPV, y 0.167 en 35 DPV (-1 DPC). Después de la infección con PCV2, un impulso significativo en los

títulos ELISA en los lechones de este grupo se observa tan temprano como en el 7 DPC, con las proporciones S/P promedio de 1.069 en 7 DPC, 1.373 en 14 DPC, y 1.356 en 20 DPC.

5 Viremia PCV2

La detección de la viremia de PCV2 por el PCR específico a PCV2 en los sueros de los vacunados y los controles se resume en la Tabla 3A. Este PCR específico a PCV2 es por lo menos 1.000 veces más sensible que el método de cultivo celular convencional.

En los días -1 después de la infección (DPC), inesperadamente, se encontró que tres de los veinticuatro vacunados (cerdos #P102, P103, y P104) y 6 de los 24 controles (cerdos # G197, G205, O162, P107, P108 y P110) se detectan como positivos en cuanto al ADN del PCV2 en las muestras de suero mientras que los otros permanecieron negativos. Todos los 9 cerdos positivos al PCV2 se alojaron en el mismo cuarto (#12). Desafortunadamente 6 cerdos infectados con PCV2 (cerdos #P102, P103, P104, P107, P108 y P110) y dos cerdos no infectados se relocaron en el cuarto #13 y mezclados con cerdos no infectados del cuarto #11 a -1 DPC debido a requerimientos de espacio. Por lo tanto, todos los animales en los cuartos #12 y 13 se expusieron potencialmente al PCV2 ambiental.

Para investigar la fuente de la exposición ambiental al PCV2, las muestras de suero recolectadas en 0, 13, y 28 DPV, se ensayan mediante PCR específico a PCV2. Todos los cerdos fueron negativos al PCV2 excepto el cerdo #P108 (Control, cuarto #12) con una banda PCR extremadamente fuerte positiva en 13 DPV. Este resultado sugiere que la exposición al PCV2 accidental ambiental se origina del cerdo #P108, y luego se esparció a otros cerdos en el cuarto #12 y #13. El origen exacto de este PCV2 no se conoce, sin embargo, lo más probable del ambiente o de la finca en la cual el cerdo #P108 se infectó a un nivel no detectable antes de enlistarse para el estudio.

Para determinar el genotipo del PCV2 de la exposición ambiental, los productos PCR del cerdo #P108 se clonaron para su secuenciamiento. El análisis de

la secuencia de ADN indica que el PCV2 del cerdo #P108 es una cepa tipo 2B, diferente de la cepa #40895 (2A). Los genomas de estas dos cepas PCV2 comparten 95.98% de identidad de secuencia de ADN. Para diferenciar adicionalmente la infección PCV2 experimental (cepa #40895) de la infección del contacto ambiental (2B del cerdo #P108), los productos PCR de todos los cerdos virémicos PCV2 se clonan para su secuenciamiento de ADN. Los resultados de los genotipos se muestran en la columna "infección con PCV2": "A" representa que ningún PCV2B se detecta en las muestras de suero y la infección tiene lugar solamente por la cepa experimental PCV2-#40895; "A + B" representa que adicionalmente a la infección experimental, el PCV2B también se detecta y todos los PCV2B son del cerdo #P108 debido a la secuencia idéntica; y "A + (B)" representa que además a la infección experimental, los cerdos se infectaron potencialmente con PCV2B debido a que estos cerdos estaban mezclados con el cerdo #P108 en el cuarto #12/13. Sin embargo, todos estos cerdos se protegieron de la infección PCV2.

15

Para poder evaluar el impacto de las infecciones experimental y por contacto ambiental, los resultados PCR para la viremia PCV2 se discuten en tres categorías: comparación general (Tabla 3A), infección experimental (Tabla 3B), e infecciones experimentales y por contacto ambiental (Tabla 3C).

20

La comparación general entre los grupos muestra que 10/24 (41.7%) de los vacunados son positivos para la presencia de ADN de PCV2 en el suero, por al menos ocurrencia única positiva y no conclusiva. Si una ocurrencia única no conclusiva no es contable, 5/24 (20.8%) de los vacunados con positivos para ADN de PCV2. En contraste, 24/24 (100%) de los controles son positivos en la presencia de ADN de PCV2 en el suero para múltiples ocurrencias. La secuencia y densidad de la banda positiva de PCV2 en los controles fue significativamente más alta y más fuerte que en los vacunados (ver Tabla 3A).

25

30

La comparación entre los grupos expuestos a la infección experimental PCV2 (Tabla 3B) muestra que 1/9 (11.1%) de los vacunados son positivos en el ADN PCV2 para solamente una ocurrencia positiva. En contraste, 14/14 (100%) de los

162

controle son positivos en cuanto a la presencia del ADN de PCV2 en el suero para múltiples ocurrencias.

5 La comparación entre los grupos expuestos a las infecciones experimental y de contacto por el ambiente PCV2 (Tabla 3C) muestra que 4/15 (26.7%) de los vacunados son Positivos al ADN PCV2, para por lo menos una sola ocurrencia positiva. En contrate, 10/10 (100%) de los controles fueron positivos en cuanto a la presencia de ADN de PCV2 en el suero para múltiples ocurrencias.

10 **Lesiones microscópicas-vaciado linfoide**

15 Los tejidos de los nodos linfáticos, de base y de amígdalas se examinan microscópicamente en cuanto al vaciado linfoide. Los resultados totales de lesiones microscópicas-vaciado linfoide se resumen en la Tabla 4A (número de animales con marcas 0-3).

20 La comparación general entre los grupos muestra que una marca de vaciado linfoide anormal en por lo menos un tejido se observa en 15/24 (62.5%) de los cerdos vacunados, comparado con 23/24 (95.8%) de los cerdos de control. Las lesiones de vaciado linfoide moderadas a severas se observaron en 4/24 (16.7%) de los vacunados, comparado con 14/24 (58.3%) de los controles.

25 La comparación entre los grupos expuestos a la infección experimental con PCV2 (Tabla 4B) muestra que una marca de vaciado linfoide anormal en por lo menos un tejido se observa en 6/9 (66.7%) de los cerdos vacunados, en comparación con 13/14 (92.9%) de los cerdos de control.

30 La comparación entre los grupos expuestos a las infecciones experimental y de contacto ambiental al PCV2 experimental (Tabla 4C) muestra que una marca de vaciado linfoide anormal en por lo menos un tejido se observa en 9/15 (60%) de los cerdos vacunados, en comparación con 10/10 (100%) de los cerdos de control.

Lesiones microscópicas-reemplazo histiocítico

Los tejidos de los nodos linfáticos, bazo y amígdalas se examinan microscópicamente en cuanto a la inflamación histiocítica a granulomatosa con reemplazo de folículos. Los resultados totales de las lesiones microscópicas-reemplazo histiocítico se resumen en la tabla 5.

La comparación general muestra que compradas de 22/24 (91.7%) de los controles, 15/24 (62.5%) de los vacunados se observan con marcas de reemplazo histiocítico anormal en por lo menos un tejido linfático.

Inmunohistoquímica

Los resultados de la detección de la cantidad de antígeno al PCV2 por teñido IHC en los nodos linfáticos, bazo, y amígdalas se resume en la Tabla 6 (número de animales con marcas 0-3).

La comparación general muestra que comparados 23/24 (95.8%) de los controles, 7/24 (29.2%) de los vacunados son teñidos IHC específicos a PCV2 en por lo menos un tejido linfático.

Observaciones clínicas postinfección

Los resultados de las observaciones diarias para los signos clínicos postinfección en cerdos individuales se da en la Tabla 7. Ningún signo clínico se observa en ninguno de los cerdos excepto dos cerdos de control (#P108 y O162).

El cerdo #P108 se observó con tos en 1 DPC, diarrea en 10 DPC, adelgazamiento, diarrea e inactividad en el 17 DPC. Este cerdo desarrolló signos clínicos obvios de desgaste. Debido a la pobre condición el lechón se le practicó la eutanasia en 18 DPC. La necropsia reveló muy poca grasa subcutánea, consolidación craneoventral moderada en los pulmones, estómago e intestinos vacíos. Este cerdo desarrolló la enfermedad asociada con el PCV soportada por los hallazgos en la viremia PCV2 (extremadamente fuerte para el positivo PCR), vaciado

linfoide severo, y alta carga de antígeno PCV2 (por manchado IHC) en los tejidos linfáticos.

El cerdo #O162 se observó que estaba delgado y cojo de la pata izquierda trasera en 14 DPC. En 17 DPC este cerdo se observó nuevamente que estaba delgado, incapaz de moverse, y con las coyunturas encogidas en las patas traseras. Debido a la pobre condición el cerdo se le practicó la eutanasia en 18 DPC. La necropsia reveló una consolidación moderada a severa en el pulmón con adhesiones fibrinoasas. La evaluación microscópica de los tejidos de pulmón mostró una bronconeumonía severa aguda y fibrosis intersticial focal crónica. Este cerdo desarrolló la enfermedad asociada con PCV, soportada por los hallazgos en la viremia PCV2 (positivo PCR extremadamente fuerte), vaciado linfoide severo, y alta carga de antígeno PCV2 (por manchado IHC) en los tejidos linfáticos.

Tabla 1. Titulación del material de infección PCV2 (#40895)

Replicado	*Título
1	4.6
2	4.8
3	4.4
4	4.6
5	4.6
Ave ± DE	4.6 ± 0.14

*Log₁₀ FAID₅₀ por mL
Ave ± DE = Título Promedio ± Desviación Estándar

Tabla 2. Seroconversión a PCV2 en el suero de cerdos vacunados y de control medido por ELISA* de anticuerpo PCV2

ID	DE	GRUPO	0 DPV	13 DPV	28 DPV	- 1 DPC	7 DPC	14 DPC	20 DPC
CERDO									
G199	V		0.029	0.022	0.425	0.883	1.298	1.367	1.358
G203	V		0.010	-0.015	-0.007	0.004	0.591	1.373	1.458
G204	V		0.038	-0.002	0.057	0.034	1.399	1.524	1.524
G289	V		0.121	0.055	0.021	0.034	0.938	1.530	1.536
G290	V		0.162	0.035	0.041	0.027	1.007	1.438	1.451
O112	V		0.222	0.062	0.059	0.017	0.520	1.145	1.127
O113	V		0.050	0.007	0.057	0.112	1.164	1.460	1.395
O117	V		-0.028	-0.010	0.381	0.608	1.264	1.334	1.282
O119	V		0.030	-0.007	0.001	-0.013	0.935	1.209	1.196
O156	V		0.058	0.008	0.158	0.272	1.434	1.438	1.416
O158	V		0.099	0.039	0.023	0.128	1.451	1.462	1.447
O159	V		0.082	0.034	0.184	0.234	1.194	1.433	1.415
P102	V		0.108	0.028	0.026	0.017	1.199	1.307	1.321
P103	V		0.206	0.096	0.177	0.238	1.322	1.457	1.371
P104	V		0.139	0.046	0.023	0.034	1.351	1.438	1.394
P109	V		0.179	0.048	0.041	0.630	1.396	1.492	1.409
P113	V		0.113	0.026	0.039	0.011	0.980	1.251	1.368
P115	V		0.141	0.077	0.055	0.077	1.266	1.436	1.353
P145	V		0.069	-0.003	0.120	0.219	1.215	1.521	1.500
P146	V		0.158	0.065	0.030	0.037	0.213	1.372	1.273
P150	V		0.124	0.049	0.009	0.108	0.619	1.265	1.306
P192	V		0.288	0.113	0.173	0.072	0.697	1.399	1.314
P213	V		0.364	0.121	0.116	0.085	0.909	0.847	0.967
P214	V		0.264	0.097	0.110	0.135	1.299	1.444	1.373
Ave	(proporción)		0.126	0.041	0.097	0.167	1.069	1.373	1.356
S(P)± SD			0.094	0.039	0.111	0.228	0.334	0.150	0.127

165

G197	C	0.072	0.005	0.017	-0.005	1.011	1.135	1.240
G205	C	0.028	-0.010	-0.003	-0.016	0.389	1.072	1.042
G293	C	0.202	0.033	0.019	-0.011	-0.017	0.376	0.949
G296	C	0.266	0.052	0.032	-0.001	0.016	0.932	1.073
Q109	C	0.014	-0.007	-0.012	-0.013	0.009	0.701	1.254
Q110	C	0.001	-0.015	-0.017	-0.003	-0.032	0.355	0.704
Q111	C	-0.002	-0.019	-0.021	-0.033	-0.034	0.448	0.858
Q114	C	-0.009	-0.014	-0.019	-0.028	-0.041	0.159	0.216
Q162	C	0.219	0.040	0.039	0.032	0.216	0.536	NA
Q164	C	0.057	0.018	-0.005	-0.007	0.019	0.227	0.675
Q166	C	0.072	0.003	-0.003	-0.009	0.041	0.914	1.146
P105	C	0.228	0.234	0.035	0.022	0.134	1.376	1.428
P107	C	0.142	0.043	0.037	0.001	0.549	1.102	1.195
P108	C	0.266	0.080	0.039	-0.029	-0.036	-0.029	NA
P110	C	0.204	0.047	0.027	0.024	0.574	0.704	0.772
P112	C	0.069	0.132	0.036	0.019	0.023	0.783	1.170
P116	C	0.080	0.023	0.006	0.012	-0.005	0.338	0.841
P147	C	0.149	0.024	0.029	-0.006	-0.005	0.199	0.597
P148	C	0.033	0.008	0.016	-0.016	0.006	0.642	0.966
P194	C	0.343	0.136	0.106	0.042	0.070	0.208	0.633
P195	C	0.169	0.100	0.046	0.021	0.028	0.816	1.093
P215	C	0.110	0.037	0.032	0.013	0.029	0.433	0.826
P216	C	0.171	0.071	0.044	0.035	0.036	0.600	0.906
P218	C	0.366	0.147	0.082	0.043	0.027	0.664	0.701
Ave	(proporción	0.135	0.049	0.023	0.004	0.125	0.612	0.922
S/P)± SD		0.109	0.063	0.031	0.022	0.256	0.358	0.277

*Resultados expresados como proporciones muestra/control positivo (S/P); Prom (proporción S/P Ratio)±SD= proporción S/P ± desviación estándar

20 NA = no determinado; V = grupo vacunado; C = grupo de Control

166

Tabla 3A. Detección de la viremia PCV2 por PCR específico a PCV2 en el suero de cerdos vacunados y de control: comparación general

ID DE CERDO	GRUPO	CUARTO	INFECCIÓN CON PCV2	0 DPV	13 DPV	28 DPV	-1 DPC	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	20 DPC	Viremia PCV2
G199	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G203	V	12	A + B	-	-	-	-	+	++	++++	+++	++	++	P
G204	V	12	A + B	-	-	-	-	++	++	++	++	+	+	P
G289	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
G290	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
O112	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O113	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O117	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O119	V	11-13	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	P
O156	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O158	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O159	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P102	V	12-13	A + B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	P

167

169

170

20

171



64



V = Grupo vacunado; C = grupo de Control; NA = no determinado; cuartos 11 o 12: los lechones fueron encerrados durante el estudio completo (fases de vacunación y de infección); cuartos 11-13 y 12-13: los lechones se encerraron en los cuartos 11 o 12 durante la fase de vacunación y relocalizados en el cuarto 13 en ODPC (fase de infección).

Cepa de infección PCV2: A = infección experimental-PCV2 #40895; A + (B) = En adición a la infección experimental -PCV2 #40895, infección potencial por contacto ambiental debido al mezclado con el cerdo #108 durante la fase de vacunación o la fase de infección.

Sin embargo, estos cerdos se protegieron de la infección PCV2, y ningún producto PCR se puede secuenciar para el PCV2B; A + B = infección experimental -PCV2 #40895, infección por contacto ambiental debido al cerdo #108, y el producto PCR fue secuenciado e identificado como PCV2B desde la misma fuente (cerdo #108)

Marcación de la intensidad de banda PCR: - Negativo; ± banda PCR muy desvanecida marginalmente visible; + Positivo; ++ fuertemente positivo; +++ muy fuertemente positiva; ++++ Extremadamente fuerte positiva; viremia PCV2:--Negativo; P = positivo; P* = no conclusivo (una única ocurrencia o dos de la banda PCR no conclusiva).

172,

Tabla 3B. Detección de la viremia PCV2 por PCR específico a PCV2 en suero de cerdos vacunados y de control: infección experimental PCV2 (#40895)

ID DE CER DO	GRU PO	CUA RTO	INFECCIÓN CON PCV2	0 DPV	13 DPV	28 DPV	-1 DPC	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	20 DPC	Viremia PCV2
G289	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
G290	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
O119	V	11-13	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	P
P113	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P115	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P145	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P146	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	P*
P150	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P192	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			# positivo	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	2/9	1/9	0/9	0/9	1/9	4/9 (1*/9)
			% positivo	0%	0%	0%	0%	0%	22.2%	11.1%	0%	0%	11.1%	44.4 (11.1*)%

5

10

15

173

174

V = Grupo vacunado; C = grupo de Control; NA = no determinado; cuartos 11 o 12: los lechones fueron encerrados durante el estudio completo (fases de vacunación y de infección); cuartos 11-13 y 12-13: los lechones se encerraron en los cuartos 11 o 12 durante la fase de vacunación y relocizados en el cuarto 13 en ODPC (fase de infección).

Cepa de infección PCV2: A = infección experimental-PCV2 #40895;

- 5 Marcación de la intensidad de banda PCR: - Negativo; ± banda PCR muy desvanecida marginalmente visible; + Positivo; ++ fuertemente positivo; +++ muy fuertemente positiva; ++++ Extremadamente fuerte positiva; viremia PCV2: - = Negativo; P = positivo; P* = no conclusivo (una única ocurrencia o dos de la banda PCR no conclusiva).

128

Tabla 3C. Detección de Viremia PCV2 por PCR específico a PCV2 en sueros de cerdos vacunados y de control: infección Experimental PCV2 (#40895) e infección por contacto ambiental

ID DE CER DO	GRU PO	CUART O	INFECCIÓN POR PCV2	0 DPV	13 DPV	28 DPV	-1 DPC	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	20 DPC	Viremia PCV2
G199	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G203	V	12	A + B	-	-	-	-	+	++	++++	+++	++	++	P
G204	V	12	A + B	-	-	-	-	++	++	++	++	+	+	P
O112	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O113	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O117	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O156	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O158	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O159	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P102	V	12-13	A + B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	P
P103	V	12-13	A + B	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	P*
P104	V	12-13	A + B	-	-	-	++	++++	++	+++	+++	+	±	P

178

P109	V	12-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P213	V	12	A + (B)	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P*	-
P214	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			# positivo	0/15	0/15	0/15	3/15	4/15	3/15	3/15	3/15	3/15	3/15	3/15	3/15	3/15	3/15	6/15 (4*/15)	
			% positivo	0%	0%	0%	20%	26.7%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	40 (26.7*)%	
G197	C	12	A + B	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	P	
G205	C	12	A + B	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	P	
O162	C	12	A + B	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NA	NA	NA	P	
O166	C	12	A + B	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	P	
P105	C	12-13	A + B	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	P	
P107	C	12-13	A + B	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	P	
P108	C	12-13	A + B	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	NA	NA	NA	P	
P110	C	12-13	A + B	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	P	
P215	C	12	A + B	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	P	
P218	C	12	A + B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	P	
			# positivo	0/10	0/10	1/10	6/10	10/10	10/1	10/10	10/10	10/10	10/10	10/1	7/8	10/10	10/10		
			% positivo	0%	0%	10%	60%	100%	100	100%	100%	100%	100%	100	87.5	100 %	100 %		

177

V = Grupo vacunado; C = grupo de Control; NA = no determinado; cuartos 11 y 12: los lechones fueron encerrados durante el estudio completo (fases de vacunación y de infección); cuartos 11-13 y 12-13: los lechones se encerraron en los cuartos 11 o 12 durante la fase de vacunación y relocalizados en el cuarto 13 en ODPC (fase de infección).

Cepa de infección PCV2: A + (B) = En adición a la infección experimental -PCV2 #40895, infección potencial por contacto ambiental debido al mezclado con el cerdo #108 durante la fase de vacunación o la fase de infección. Sin embargo, estos cerdos se protegieron de la infección PCV2, y ningún producto PCR se puede secuenciar para el PCV2B; A + B = infección experimental -PCV2 #40895, infección por contacto ambiental debido al cerdo #108, y el producto PCR fue secuenciado e identificado como PCV2B desde la misma fuente (cerdo #108)

Marcación de la intensidad de banda PCR: - Negativo; ± banda PCR muy desvanecida marginalmente visible; + Positivo; ++ fuertemente positivo; +++ muy fuertemente positiva; ++++ Extremadamente fuerte positiva;

viremia PCV2: - = Negativo; P = positivo; P* = no conclusivo (una única ocurrencia o dos de la banda PCR no conclusiva).

Tabla 4A. Vaciado linfoide en nodos linfoides, bazo y amígdalas: comparación general*

Grupo	Número de animales con marca*			
	0	1	2	3
Nodo linfático iliaco (IL LN)				
Vacunados	13	7	2	2
Control	4	9	3	8
Nodo linfático Inguinal (IG LN)				
Vacunados	15	7	1	1
Control	5	10	6	3
Nodo linfático traqueobronquial (TB LN)				
Vacunados	12	11	0	1
Control	2	9	9	4
Bazo				
Vacunados	15	9	0	0
Control	7	6	8	3
Tonsil				
Vacunados	19	4	1	0
Control	10	4	7	3

*Marca de vaciado linfoide: 0 = Normal, 1 = suave, 2 = Moderado, y 3 = Severo
Tabla 4B. Vaciado linfoide en nodos linfáticos, bazo y amígdalas: infección Experimental PCV2 (#40895)

Grupo	Número de animales con marca*			
	0	1	2	3
Nodo linfático iliaco (IL LN)				
Vacunados	4	4	0	1
Control	3	7	2	2
Nodo linfático Inguinal (IG LN)				
Vacunados	6	3	0	0
Control	5	7	2	0
Nodo linfático traqueobronquial (TB LN)				
Vacunados	4	5	0	0
Control	2	8	3	1
Bazo				
Vacunados	6	3	0	0
Control	7	5	2	0
Tonsil				
Vacunados	9	0	0	0
Control	10	2	2	0

182

75

* Marca de vaciado linfoide: 0 = Normal, 1 = suave, 2 = Moderado, y 3 = Severo

Tabla 4C. Vaciado linfoide en nodos linfáticos, bazo y amígdalas: infecciones Experimental PCV2A (#40895) y por contacto ambiental

Grupo	Número de animales con marca*			
	0	1	2	3
Nodo linfático iliaco (IL LN)				
Vacunados	9	3	2	1
Control	1	2	1	6
Nodo linfático Inguinal (IG LN)				
Vacunados	9	4	1	1
Control	0	3	4	3
Nodo linfático traqueobronquial (TB LN)				
Vacunados	8	6	0	1
Control	0	1	6	3
Bazo				
Vacunados	9	6	0	0
Control	0	1	6	3
Tonsil				
Vacunados	10	4	1	0

103

77

Control	0	2	5	3
---------	---	---	---	---

5

10

15

1021

* Marca de vaciado linfoide: 0 = Normal, 1 = suave, 2 = Moderado, y 3 = Severo

Tabla 5. Inflamación hisiocítica a granulomatosa con reemplazo de folículos en nodos linfáticos, bazo y amígdalas: comparación general

Grupo	Número de animales con marca*			
	0	1	2	3
Nodo linfático iliaco (IL LN)				
Vacunados	14	2	7	1
Control	4	8	7	5
Nodo linfático Inguinal (IG LN)				
Vacunados	18	3	3	0
Control	8	9	4	3
Nodo linfático traqueobronquial (TB LN)				
Vacunados	14	7	3	0
Control	4	9	9	2
Bazo				
Vacunados	18	2	4	0
Control	9	4	8	3
Tonsil				
Vacunados	19	4	1	0
Control	11	5	4	4

185

79



* Marca de reemplazo histiocítico: 0 = Normal, 1 = suave, 2 = Moderado, y 3 = Severo

Tabla 6. Cantidad de antígeno específico a PCV2 demostrado por inmunohistoquímica (IHC) en los nodos linfáticos, bazo y amígdalas: comparación general*

Grupo	Número de animales con marca*			
	0	1	2	3
Nodo linfático iliaco (IL LN)				
Vacunados	17	2	5	0
Control	4	6	7	7
Nodo linfático Inguinal (IG LN)				
Vacunados	21	1	2	0
Control	10	9	4	1
Nodo linfático traqueobronquial (TB LN)				
Vacunados	20	2	1	1
Control	7	12	3	2
Bazo				
Vacunados	20	2	2	0
Control	9	9	4	2
Tonsil				
Vacunados	21	1	2	0



81

Control	5	10	6	3
---------	---	----	---	---

5

10

15

Marca del manchado IH: 0 =No, 1 =nivel bajo, 2 =nivel Medio, y 3 = nivel alto

Tabla 7. Observaciones clínicas postinfección *

PIGID	GRUP	-	-	0	1	2	3	4	5	6	7	10	14	17	20 DPC
G199	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G203	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G204	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G289	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G290	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O112	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O113	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O117	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O119	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O156	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O158	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O159	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P102	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P103	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P104	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P109	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P113	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P115	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P145	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P146	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P150	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P192	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P213	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P214	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G197	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

100

101

RESUMEN

- 5 Dos nuevas cepas de circovirus porcino patogénico tipo 2B han sido aisladas de cerdos en el presente estudio. La identificación y aislamiento de estas dos nuevas cepas del circovirus tipo 2B de cerdos números P108 y O162 en el estudio descrito aquí permitirá la preparación de composiciones inmunogénicas o de vacuna para la protección de los cerdos contra el PMWS.

192

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

- 5
1. Un circovirus porcino aislado cuyo genoma comprende la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NOs: 1 o 2, o cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que tiene por lo menos 95% de homología de secuencia de SEQ ID NOs: 1 o 2.
- 10
2. El circovirus porcino aislado de la reivindicación 1, cuyo genoma comprende la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NOs: 1 o 2.
- 15
3. El circovirus porcino aislado de las reivindicaciones 1 o 2, que es un circovirus porcino tipo 2B.
- 20
4. El circovirus porcino aislado de la reivindicación 3, que tiene una proteína ORF2 con por lo menos 92 % de identidad de secuencia de SEQ ID NOs: 3 o 4.
- 25
5. El circovirus porcino aislado de la reivindicación 2, en donde el ácido nucleico que codifica la proteína comprende los residuos 1033-1734 de SEQ ID NOs: 5 o 6.
- 30
6. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un circovirus porcino patogénico tipo 2B, o que codifica por lo menos una proteína de dicho circovirus, en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótido de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 5 o 6 o una secuencia de nucleótido que tiene por lo menos 95% de homología de secuencia para cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 5 o 6.
7. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 6, que comprende la secuencia de nucleótido de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 5 o 6.

1a3

8. La molécula de ácido nucleico aislada de las reivindicaciones 6 o 7, en donde el ácido nucleico que codifica una proteína ORF2 se encuentra en los residuos 1033-1734 de SEQ ID NOs: 5 o 6.
- 5 9. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 8, que codifica una proteína ORF2 que tiene la secuencia de aminoácido como se establece en la SEQ ID NO: 3 o 4.
- 10 10. Una composición inmunogénica que comprende el circovirus porcino aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1- 5, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 15 11. La composición inmunogénica de la reivindicación 10, en donde el circovirus porcino aislado se atenúa o inactiva.
12. La composición inmunogénica de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente por lo menos un otro microorganismo, o un antígeno obtenido de dicho microorganismo contra el cual se desea una respuesta inmune.
- 20 13. La composición inmunogénica de la reivindicación 12, en donde el otro microorganismo se selecciona del grupo que consiste de virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), parvovirus porcino (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacteria leptospira, virus de la influenza del cerdo, Antígeno de la *Escherichia coli*, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, un patógeno que causa la enfermedad Aujeszky, un patógeno que causa la gastroenteritis transmisible en los cerdos, y una segunda cepa diferente de circovirus porcino.
- 25 30 14. La composición inmunogénica de la reivindicación 13, en donde la segunda cepa diferente de circovirus porcino es un circovirus tipo 2A o un tipo 2B.

194

15. Una composición inmunogénica que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 6- 9, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 5 16. La composición inmunogénica de la reivindicación 15, que comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno de por lo menos un otro microorganismo contra el cual se desea una respuesta inmune.
- 10 17. La composición inmunogénica de la reivindicación 16, en donde el otro microorganismo se selecciona del grupo que consiste de virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), parvovirus porcino (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella*
- 15 *bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacteria leptospira, virus de la influenza del cerdo, Antígeno de la *Escherichia coli*, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, un patógeno que causa la enfermedad Aujeszky, un patógeno que causa la gastroenteritis transmisible en los cerdos y una segunda cepa diferente de circovirus porcino.
- 20 18. La composición inmunogénica de la reivindicación 17, en donde la segunda cepa diferente de circovirus porcino es un circovirus tipo 2A o un tipo 2B.
- 25 19. La composición de las reivindicaciones 10 o 15, en donde la composición se administra en una dosis o en múltiples dosis subcutáneamente, intramuscularmente, intranasalmente, transdérmicamente, intrahepáticamente, o por vía de la ruta intralinfoide.
- 30 20. Un método para inmunizar un cerdo contra la infección vírica o el síndrome postdestete de desgaste multisistémico (PMWS), o para prevenir el síndrome postdestete de desgaste multisistémico (PMWS) en un cerdo causado por una cepa de PCV2, que comprende administrar al cerdo una cantidad inmunogénicamente efectiva de una composición que comprende una cualquiera o más de los siguientes:

105

- a) una cantidad inmunogénicamente efectiva del circovirus porcino tipo 2 de cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
- b) una molécula de ácido nucleico que codifica el circovirus porcino tipo 2 de a);
- 5 c) una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos una proteína aislada del circovirus porcino tipo 2 de cualquiera de las reivindicaciones 1-5; o
- 10 d) una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína de c).
21. El método de la reivindicación 20, en donde el método comprende adicionalmente administrar una cantidad inmunogénicamente efectiva de una segunda composición inmunogénica diferente antes de, en conjunto con, o
- 15 siguiente a, la administración de la composición inmunogénica del circovirus porcino tipo 2.
22. El método de la reivindicación 21, en donde la segunda composición inmunogénica diferente comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de por lo menos un otro microorganismo que es patógeno para los cerdos, o
- 20 por lo menos un antígeno obtenido de dicho microorganismo o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho antígeno, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste de virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), parvovirus porcino (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacteria leptospira, virus de la
- 25 influenza del cerdo, Antígeno de la *Escherichia coli*, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, un patógeno que causa la enfermedad Aujeszky, un patógeno que causa la gastroenteritis transmisible en los cerdos y una
- 30 segunda cepa diferente de circovirus porcino.
23. El método de la reivindicación 22, en donde la segunda cepa diferente de circovirus porcino circovirus es un tipo 2A o 2B.

1916

24. Un vector que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico exógena que codifica una proteína de circovirus porcino tipo 2A o tipo 2B, en donde la proteína de circovirus porcino es una proteína ORF2, y en donde la molécula de ácido nucleico exógena que codifica dicha proteína se establece en los residuos 1033-1734 de SEQ ID NOs: 5 o 6.
25. El vector de la reivindicación 24, en donde el vector es un vector del poxvirus de mapache.
26. El vector de las reivindicaciones 24 o 25, que comprende adicionalmente una o más moléculas de ácido nucleico exógeno que codifica un antígeno de un microorganismo que es patógeno a los cerdos, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste de virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), parvovirus porcino (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacteria leptospira, virus de la influenza del cerdo, Antígeno de la *Escherichia coli*, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, un patógeno que causa la enfermedad Aujesky, un patógeno que causa la gastroenteritis transmisible en los cerdos y una segunda cepa diferente de circovirus porcino.
27. Un método para determinar si un mamífero porcino tiene, o está en riesgo de desarrollar el síndrome de postdestete de desgaste multisistémico (PMWS), el método comprende:
- (I) medir una cantidad de un ácido nucleico PCV2 o proteína codificada por dicho ácido nucleico en una muestra de tejido derivada del mamífero, en donde dicho ácido nucleico PCV2 o proteína es:
- a) Un ácido nucleico correspondiente a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 5 o 6, o un derivado de ácido nucleico de estos;

197

- b) Una proteína que comprende la SEQ ID NOs: 3 o 4;
- c) Un ácido nucleico que comprende una secuencia hibridable de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 5 o 6, o sus complementos bajo condiciones de alta rigurosidad, o una proteína que comprende una secuencia codificada por dicha secuencia hibridable;
- d) Un ácido nucleico por lo menos 95% homólogo a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 5, o 6, o su complemento según se determina utilizando el algoritmo NBLAST; o una proteína codificada por él;
- (II) comparar la cantidad de dicho ácido nucleico o proteína en la muestra de tejido del mamífero sospechoso de tener, o estar en riesgo de desarrollar PMWS con la cantidad de ácido nucleico o proteína presente en una muestra de tejido de un mamífero normal, o el estándar predeterminado para una muestra de tejido normal, en donde una cantidad elevada de dicho ácido nucleico o proteína en la muestra de tejido del mamífero porcino que tiene o se sospecha de tener PMWS comparado con la cantidad en la muestra de tejido normal o estándar predeterminado para una muestra de tejido normal indica que el mamífero tiene o está en riesgo de desarrollar PMWS.
28. El método de la reivindicación 27, en donde la muestra de tejido se selecciona del grupo que consiste de inguinal superficial, nodo linfático traqueobronquial, nodo linfático submandibular, pulmón, amígdala, bazo, hígado, riñón, sangre completa o células sanguíneas.

198

RESUMEN

- La presente invención se relaciona con el aislamiento y la identificación de dos
- 5 nuevas cepas de circovirus porcino tipo 2B. Estas dos nuevas cepas de circovirus porcino se pueden utilizar para la preparación de vacuna o de composiciones inmunogénicas para inmunizar cerdos contra el síndrome postdestete de desgaste multisistémico (PMWS). De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona métodos para producir una respuesta inmune protectora contra un circovirus porcino
- 10 patológico mediante administrar a un cerdo una cantidad inmunogénicamente efectiva de una vacuna o composición inmunogénica de circovirus porcino tipo 2B que comprende por lo menos uno de los circovirus porcinos que tienen una secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NOs: 1 o 2, o por lo menos una proteína de por lo menos una de las dos cepas tipo 2B nuevas de circovirus porcino
- 15 como se describió aquí. La invención adicionalmente se relaciona con la protección de un cerdo de una cualquiera o más de los síntomas o secuelas asociadas con PMWS.

Figure 1 (SEQ ID NO: 1)

109

Complete Sequence of PCV2B-FD07 Genome

Comments for PCV2B-FD07 genome: 1767 bp ssDNA virus

Replication (replicase) gene: bases 51-995
Capsid gene: bases 1033-1734 C

```

      10      20      30      40      50      60
ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
                                     M P S

      70      80      90     100     110     120
AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCACCCCA ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
K K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N

     130     140     150     160     170     180
CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
P S E D E R K K I R D L P I S L F D Y F

     190     200     210     220     230     240
TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
I V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N

     250     260     270     280     290     300
TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
F V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I

                                     >PstI
                                     |
     310     320     330     340     350     360
AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
E K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L

                                     >BglIII
                                     |
                                     >SacI
                                     |
     370     380     390     400     410     420
TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
L I E C G A P R S Q G Q R S D L S T A V

     430     440     450     460     470     480
GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
S T L L E S G S L V T V A E Q Y P V T F
```

Figure 1 (SEQ ID NO: 1) continued

200

```

      490      500      510      520      530      540
TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
V R N F   R G L   A E L   L K V S   G K M   Q K R

      550      560      570      580      590      600
ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
D W K T   N V H   V I V   G P P G   C G K   S K W

      610      620      630      640      650      660
CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
A A N F   A D P   E T T   Y W K P   P R N   K W W

      >NcoI
      |
      670      680      690      700      710      720
ATGATTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
D G Y H   G E E   V V V   I D D F   Y G W   L P W

                                >EcoRV
                                |
                                >ClaI
                                |
      730      740      750      760      770      780
ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGCTG
D D L L   R L C   D R Y   P L T V   E T K   G G T

      790      800      810      820      830      840
TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
V P F L   A R S   I L I   T S N Q   T P L   E W Y

      850      860      870      880      890      900
CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
S S T A   V P A   V E A   L Y R R   I T S   L V F

      910      920      930      940      950      960
GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCCC
W K N A   T E Q   S T E   E G G Q   F V T   L S P

                                >NdeI
                                |
      970      980      990      1000      1010      1020
CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
P C P E   F P Y   E I N   Y

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
<* P N   L P P   D K L   N F E R   F Q V

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC
<Y M T   V R I N   Y E Q   D Y I   S N E F   A T G

```

Figure 1 (SEQ ID NO: 1) continued

20

```

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTTCTTTT
<L G V H D V N G A T Q L R L W L Q N R K

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
<N N P Q F Y D I T S D L V P K P T F Y R

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
<S H Y S F P Q T I T H R S S Y N V Y P D

                                >XbaI
                                |
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
<Y T L A T A K T V F N D D L I V A S S G

                                >EcoRI
                                |
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
<V G R D G Q T I P S C P W F E V K V K R

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
<I R Y Y E F P V S R P N S G G G P P L F

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTCTGA CTGTGGTTCTG
<D N I N F R M M D V A W S P T R V T T R

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
<K I T Y G F T R S L R T N F I G N K R R

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
<W R Y R H R P H V L W P R R R L I Q G L

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATAGCTGA
<H S R P R H R R R R Y R R R P Y T M

      1750      1760
AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

```

Figure 2 (SEQ ID NO: 2)

202

Complete Sequence of PCV2B-FDJE Genome

Comments for PCV2B-FDJE genome: 1767 bp ssDNA virus

Replication (replicase) gene:

bases 51-995

Capsid gene:

bases 1033-1734c

```

      10      20      30      40      50      60
ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
                                     M P S

      70      80      90     100     110     120
AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
K K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N

     130     140     150     160     170     180
CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
P S E D E R K K I R D L P I S L F D Y F

     190     200     210     220     230     240
TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
I V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N

     250     260     270     280     290     300
TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
F V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I

                                     >PstI
                                     |
     310     320     330     340     350     360
AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGTAACCTTAC
E K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L

                                     >BglII
                                     |
                                     >SacI
                                     |
     370     380     390     400     410     420
TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
L I E C G A P R S Q G Q R S D L S T A V

     430     440     450     460     470     480
GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
S T L L E S G S L V T V A E Q Y P V T F
```

Complete Sequence of PCV2B-FDJE

Figure 2 (SEQ ID NO: 2) continued

203

```

      490      500      510      520      530      540
TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
V R N F   R G L   A E L   L K V S   G K M   Q K R

      550      560      570      580      590      600
ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
D W K T   N V H   V I V   G P P G   C G K   S K W

      610      620      630      640      650      660
CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
A A N F   A D P   E T T   Y W K P   P R N   K W W

      >NcoI
      |
      670      680      690      700      710      720
ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
D G Y H   G E E   V V V   I D D F   Y G W   L P W

                                >EcoRV
                                |
                                >ClaI
                                |
      730      740      750      760      770      780
ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG
D D L L   R L C   D R Y   P L T V   E T K   G G T

      790      800      810      820      830      840
TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
V P F L   A R S   I L I   T S N Q   T P L   E W Y

      850      860      870      880      890      900
CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
S S T A   V P A   V E A   L Y R R   I T S   L V F

      910      920      930      940      950      960
GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCCC
W K N A   T E Q   S T E   E G G Q   F V T   L S P

                                >NdeI
                                |
      970      980      990      1000      1010      1020
CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
P C P E   F P Y   E I N   Y *>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
TTTATTATT CATTAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
<* P N   L P P   D K L   N F E R   F Q V

```

Complete Sequence of PCV2B-FDJE

Figure 2 (SEQ ID NO: 2) continued

204

```

1090      1100      1110      1120      1130      1140
ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC
Y M T V R I N Y E Q D Y I S N E F A T G

1150      1160      1170      1180      1190      1200
GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTTCTTTT
L G V H D V N G A T Q L R L W L Q N R K

1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTTGTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
N N P Q F Y D I T S D L V P K P T F Y R

1270      1280      1290      1300      1310      1320
GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGCT
S H Y S F P Q T I T H R S S Y N V Y P D

                                >XbaI
                                |
1330      1340      1350      1360      1370      1380
ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
Y T L A T A K T V F N D D L I V A S S G

                                >EcoRI
                                |
1390      1400      1410      1420      1430      1440
CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTC AACCT TAACCTTTCT
V G R D G Q T I P S C P W F E V K V K R

1450      1460      1470      1480      1490      1500
TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
I R Y Y E F P V S R P N S G G G P P L F

1510      1520      1530      1540      1550      1560
GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTCTGA CTGTGGTTCTG
D N I N F R M M D V A W S P T R V T T R

1570      1580      1590      1600      1610      1620
CTTGATAGTG TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
K I T Y G F T R S L R T N F I G N K R R

1630      1640      1650      1660      1670      1680
CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
W R Y R H R P H V L W P R R R L I Q G L

1690      1700      1710      1720      1730      1740
ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATATCTGA
H S R P R H R R R R Y R R R P Y T M

1750      1760
AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

```

Complete Sequence of PCV2B-FDJE

Figure 3 (SEQ ID NO: 3)

205

LOCUS PCV2B-FD07 ORF2 234 AA 19-DEC-2007
SOURCE FDAH

FEATURES Location/Qualifiers
1..234
/note="PCV2b-FD07 Capsid Protein (ORF2)"

ORIGIN -
1 MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWLV HPRHRYRWRR KNGIFNTRLS RTFGYTIKRT
61 TVRTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
121 SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFSYHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR
181 NQLWLRLQTA GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDPP LNP*
//

Figure 4 (SEQ ID NO: 4)

LOCUS PCV2B-FDJE 234 AA
SOURCE FDAH

19-DEC-2007

FEATURES Location/Qualifiers
1..234
/note="PCV2B-FDJE Capsid (ORF2) Protein"

ORIGIN -
1 MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWLV HPRHRYRWRR KNGIFNTRLS RTFGYTIKRT
61 TVRTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
121 SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFSYHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR
181 NQLWLRLQTA GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDPP LNP*
//

Figure 5 (SEQ ID NO: 5)

207

LOCUS PCV2B-FD07 1767 BP SS-DNA CIRCULAR SYN 30-SEP-2006
SOURCE FDAH

FEATURES Location/Qualifiers
CDS 51..995
/note="Replicase gene (ORF1)"
CDS complement(1033..1734)
/note="Capsid gene (ORF2)"

BASE COUNT 447 A 360 C 499 G 461 T 0 OTHER
ORIGIN -
1 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
61 AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCAC TGAATAATC
121 CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
181 TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
241 TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
301 AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
361 TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
421 GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCTT GTAACGTTTG
481 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACCTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
541 ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
601 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
661 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTGA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
721 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAC TG
781 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
841 CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
901 GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCC
961 CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
1021 TTTTATTATT CATTAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
1081 ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC
1141 GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTCCTTTT
1201 GTTGTTTGGT TGGAAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
1261 GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
1321 ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
1381 CACTCCCCTG TCACCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATCAACCT TAACCTTTCT
1441 TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA
1501 GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCAGGAG GGCGTTCTGA CTGTGGTTCG
1561 CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
1621 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
1681 ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATAGCTGA
1741 AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATT

//

Figure 6 (SEQ ID NO: 6)

LOCUS
SOURCE

PCV2B-FDJE
FDAH

1767 BP DS-DNA

SYN

05-NOV-2007



FEATURES

CDS

CDS

Location/Qualifiers

51..995

/note="Replicase gene (Orf1)"

complement(1033..1734)

/note="Capsid Gene (Orf2)"

BASE COUNT

ORIGIN

446 A

359 C

499 G

463 T

0 OTHER

1 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA

61 AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCACCCCA ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC

121 CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA

181 TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT

241 TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCCG TGCCACATCG

301 AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGTAAC TTAC

361 TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA

421 GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG

481 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG

541 ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG

601 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG

661 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG

721 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG

781 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT

841 CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT

901 GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCCC

961 CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT

1021 TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC

1081 ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC

1141 GAGGCCACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTTCTTTT

1201 GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG

1261 GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC

1321 ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC

1381 CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT

1441 TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA

1501 GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCGTTCTGA CTGTGGTTCG

1561 CTTGATAGTG TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT

1621 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG

1681 ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATATCTGA

1741 AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

//

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25
SEQUENCE LISTING

209

<110> wyeth
<120> Methods and Compositions for Immunizing Pigs against Porcine
Circovirus
<130> AM102973PCT
<150> 61/015,894
<151> 2007-12-21
<160> 8
<170> PatentIn version 3.4
<210> 1
<211> 1767
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<400> 1
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgccagca 60
agaagaatgg aagaagcgga cccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtatct ggggtgcccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctgggtga ccgttgacaga gcagtaccct gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaagtgg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggccgcagc attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaatggg 1020
ttttattatt cattaagggg taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatgggt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttgtttggt tggaaagtaat caatagtggg atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggct gggttatggg atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380

210

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag gggtttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagta tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgccat ttttccttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggcgg cggcgaggga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcggtgtc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatagctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

<210> 2
<211> 1767
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<400> 2
accagcgac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgccagca 60
agaagaatgg aagaagcggg cccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtattt ggggtgcccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggtaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtacctgtgt ggagagcggg agtctggtga ccgttgcaga gcagtaccct gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagaccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtggg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatct cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccgttg gaatgggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc ttatcggag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatggtt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct gggttctttt 1200
gttgtttggt tggaagtaat caatagtga atctaggaca gggttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggct gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440

211

tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa 1500
 gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
 cttgatagtg tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgccat ttttccttct 1620
 ccagcggtaa cggtggcggg ggtggacgag ccaggggagg cggcggagga tctggccaag 1680
 atggctgcgg gggcgggtgtc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatatctga 1740
 aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

<210> 3
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Porcine circovirus

<400> 3

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 Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser 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 Thr 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 Ala Gly Asn
 180 185 190

252

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

<210> 4
<211> 233
<212> PRT
<213> Porcine circovirus
<400> 4

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 Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser 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 Thr 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 Ala Gly Asn
180 185 190

23

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 200 205

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

<210> 5
<211> 1767
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<220>
<221> gene
<222> (51)..(995)
<223> replicase gene (ORF1)

<220>
<221> gene
<222> (1033)..(1734)
<223> capsid gene (ORF2) encoded by complement

<400> 5
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcggg ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtattt ggggtgcccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctggtga ccgttgacga gcagtaccct gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaattggg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtggg 660
atgggtacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatatc cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccgttg gaatggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaattggg 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatgggt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct gggtttctttt 1200

214

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25

gttgttttgggt tggaagtaat caatagtgga atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggct gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagta tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgccat ttttccttct 1620
ccagcggtaa cggtggcggg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcgggtgtc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatagctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

<210> 6
<211> 1767
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<220>
<221> gene
<222> (51)..(995)
<223> replicase gene (ORF1)

<220>
<221> gene
<222> (1033)..(1734)
<223> capsid gene (ORF2) encoded by complement

<400> 6
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcggg ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtatct ggggtgcccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggtaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctgggtga ccgttgacga gcagtaccct gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtggg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatatc cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatgggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttgggtattt 900

215

PC70832A_Formerly_ AM102973 PCT revised_ST25

ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggg taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatgggt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttgtttggt tggaagtaat caatagtgga atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggct gggttatggt atggcgggag gagtagtta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagtg tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgccat tttccttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggagg cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcgggtgc ttcttctccg gtaacgcctc ctgggatacg tcatatctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
atgcccagca agaagaatgg 20

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
tggtttccag tatgtggttt cc 22

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MALLON, Veronica
WYETH LLC
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

IPGS-MADISON

FEB 18 2010

PFIZER INC

Date of mailing (day/month/year) 04 February 2010 (04.02.2010)	
Applicant's or agent's file reference AM102973 (070832)	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/087361	International filing date (day/month/year) 18 December 2008 (18.12.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address WYETH Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
Telephone No.		
Facsimile No.		
E-mail address		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality	☐ the residence	
Name and Address WYETH LLC Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
Telephone No.		
Facsimile No.		
E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized		
3. Further observations, if necessary: The above change is to be recorded also in respect of the agent, as indicated in the addressee box at the top of this form.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Blanc Veronique e-mail PT08.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 08
---	---

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/ECNBG0UA2

JUN 17 2009

PCT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

WYETH

Attn. Mallon, Veronica

Patent Law Department

Five Giralda Farms

Madison, New Jersey 07940-0874

ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

12/06/2009

Applicant's or agent's file reference

AM102973

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2008/087361

International filing date
(day/month/year)

18/12/2008

Applicant

WYETH

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.**Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until **30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within **20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

RECEIVED

Name and mailing address of the International Searching Authority

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Authorized officer

Pauline Bensau

JUN 29 2009

SHEILA MCBRIDE

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43 bis.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AM102973	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2008/087361	International filing date (day/month/year) 18/12/2008	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 21/12/2007
Applicant WYETH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1



as suggested by the applicant



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2008/087361

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/087361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N7/00

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)
C12N

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, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/238662 A1 (JESTIN ANDRE [FR] ET AL JESTIN ANDRE [FR] ET AL) 27 October 2005 (2005-10-27) SEQ ID NO: 1 and 5 show 99,3% identity with SEQ ID NO: 15 or 19 over its entire length. SEQ ID NO: 3 shows 98,7% identity with identity with SEQ ID NO: 26 over its entire length. ----- -/--	1-27

☒ 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.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 2009

Date of mailing of the international search report

12/06/2009

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

Rojo Romeo, Elena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/087361

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 11 August 2006 (2006-08-11), "Porcine circovirus 2 isolate n32eu, complete genome." <u>XP002520796</u> retrieved from EBI accession no. EMBL:DQ629115	1-9
Y	Database accession no. DQ629115 SEQ ID NO: 1 and 5 show 99,9% identity with EM_VI:DQ629115 over the entire length -& CHEUNG A K ET AL: "Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds" ARCHIVES OF VIROLOGY ; OFFICIAL JOURNAL OF THE VIROLOGY DIVISION OF THE INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES, SPRINGER-VERLAG, VI, vol. 152, no. 5, 15 January 2007 (2007-01-15), pages 1035-1044, <u>XP019519429</u> ISSN: 1432-8798	10-27
X	DATABASE UniProt [Online] 1 March 2003 (2003-03-01), "SubName: Full=Putative capsid protein; SubName: Full=Cap; SubName: Full=Cap protein; SubName: Full=Capsid; SubName: Full=Capsid protein; SubName: Full=Putative uncharacterized protein;" <u>XP002520797</u> retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8BCA6	1-9
Y	Database accession no. Q8BCA6 SEQ ID NO: 3 has 100% identity with UNIPROT:Q8BCA6_PCV2	10-27
X	US 2005/147966 A1 (MENG XIANG-JIN [US] ET AL) 7 July 2005 (2005-07-07) SEQ ID NO: 3 shows 99,6% identity with SEQ ID NO: 25, see example 5.	4,27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/087361

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see additiona sheet(s)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-27 (partially)

Isolated porcine circovirus whose genome comprises the nucleic acid molecule of SEQ ID NO: 1, or whose genome comprises a nucleic acid molecule having at least 95% sequence homology to SEQ ID NO: 1; isolated porcine circovirus having an ORF2 protein with at least 92% sequence identity to SEQ ID NO: 3; isolated nucleic acid molecule encoding a pathogenic type 2B porcine circovirus, or encoding at least one protein from said circovirus, wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or a nucleotide sequence having at least 95% sequence homology to SEQ ID NO 1 or 5; immunogenic compositions thereof, method of immunizing, diagnostic method.

2. claims: 1-27 (partially)

Isolated porcine circovirus whose genome comprises the nucleic acid molecule of SEQ ID NO: 2 or whose genome comprises a nucleic acid molecule having at least 95% sequence homology to SEQ ID NO: 1; isolated porcine circovirus having an ORF2 protein with at least 92% sequence identity to SEQ ID NO: 4; isolated nucleic acid molecule encoding a pathogenic type 2B porcine circovirus, or encoding at least one protein from said circovirus, wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 6 or a nucleotide sequence having at least 95% sequence homology to SEQ ID NO 2 or 6; immunogenic compositions thereof, method of immunizing, diagnostic method.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2008/087361

26

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005238662	A1	27-10-2005	NONE	
US 2005147966	A1	07-07-2005	US 2003096377 A1	22-05-2003



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-074488- -00000-0000

Fecha: 2010-06-21 17:13:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 226

221

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 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 ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH LLC

REFERENCIA	Radicación No.	10 074488
	Solicitud internacional	PCT/US2008/087361
	Fecha inicio fase nacional	21/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>10338</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...

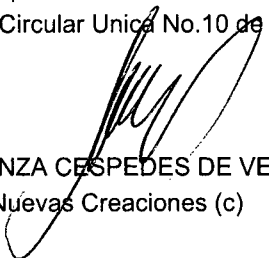


Continuación radicado No: 10 074488

229


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


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

13 AGO. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11

Al contestar favor indique el número de
radicación que se encuentra a continuación

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH LLC

REFERENCIA	Radicación No.	10 074488
	Solicitud internacional	PCT/US2008/087361
	Fecha inicio fase nacional	21/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10339

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 13 AGO. 2010
adpa11