



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITANTE

PATENTE DE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-077615-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-18 16:10:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

21. EXPEDIENTE No. 07-77615A
54. TÍTULO Composiciones inmunogénicas PCV2 y métodos para producir tales composiciones.
51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____
71. SOLICITANTE Boehringer Ingelheim Vetmedica, INC
- DOMICILIO Missouri, St. Joseph, E.U.A.
74. APODERADO Luz Clemencia de Pérez
22. BOGOTÁ, D. C., _____

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-077615-00000-0000

Fecha: 2007-07-30 16:47:16 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 273**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE****PCT**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

ENTRADA EN FASE

No. 07-077615-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-18 16:10:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145**SOLICITUD**

1

☒ Patente de Invención.☐ P☐ Capítulo I.☒ C

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**

sociedad constituida y existente bajo las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 2621 North Belt Highway,
St. Joseph,
Missouri 64506,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: St. Joseph,
Missouri 64506,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)1. **Mike ROOF,** *NO ver folio 277*
3222 Tupelo Circle,
Ames,
Iowa 50014,
Estados Unidos de América3. **Mark EICHMEYER,**
10908 NE 77th Lane,
Bondurant,
Iowa 50035,
Estados Unidos de América2. **Phillip HAYES,**
2775 430 St. Maurice,
Iowa 51036,
Estados Unidos de América4. **Greg NITZEL,**
45620 Finch St.,
Mattawan,
Michigan 49071,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2005/047596Fecha: 29 de diciembre de 2005Publicación Internacional No. WO 2006/072065 A2Fecha: 6 de julio de 2006

6

Título (54)**COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS PCV2 Y METODOS PARA PRODUCIR TALES COMPOSICIONES**

7

Clasificación Internacional (51) C12P 021/006Copia petitorio solicitud.
original.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	07- 77615A. Espacio reservado para el adhesivo de radicación
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1.	Identificación del Tramite
☐	Conversión
☒	División
☐	Fusión
☒	Patente de Invención
☐	Patente de Modelo de Utilidad
☐	Registro de Diseño Industrial
☐	Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2.	Datos del solicitante												
	Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒												
	BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.												
	Nombre o denominación / Nombre o razón social completa												
	Nombre representante legal												
	Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐												
	Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____												
	<table><tr><td>Nacionalidad/País de constitución</td><td>Dirección y domicilio del titular</td><td>Ciudad</td></tr><tr><td>Estados Unidos de América,</td><td>2621 North Belt Highway, Missouri 64506</td><td>St. Joseph</td></tr><tr><td>Dirección electrónica</td><td>No. Fax</td><td>Número telefónico</td></tr><tr><td>clientes@cavelier.com</td><td>2 11 86 50</td><td>3 47 36 11</td></tr></table>	Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad	Estados Unidos de América,	2621 North Belt Highway, Missouri 64506	St. Joseph	Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico	clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11
Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad											
Estados Unidos de América,	2621 North Belt Highway, Missouri 64506	St. Joseph											
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico											
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11											

☐

Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3.	Datos del apoderado:	
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
De Páez Luz Clemencia	C.C. 35.456.344	T.P.A. 23.555
Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 4ª No. 72 –35	Bogotá	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general		

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____	Expediente : 07.077.615	Expediente _____
De: _____	De: _____	De: _____
A: _____	A: _____	A: _____

5. Comprobante de Pago No 12-120823 Fecha 21/11/2012
Comprobante de Pago No 12-121048 Fecha 22/11/2012

6. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☒ Comprobante de pago por 45 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.350.000.
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre y apellidos LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	Firma <i>Luiz Clemencia De Paez</i>
C.C 35.456.344 de Usaqué	Tarjeta Profesional T.P. 23.555 <i>TP#23555</i>

JMSVCBWPC15149\ID-230856

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 07.077.615. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 12453 notificado por fijación en lista del 18 de julio de 2012. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 30 de julio de 2007 y las prioridades que allí se reivindican el 30 de diciembre de 2004; 13 de enero de 2005 y el 29 de diciembre de 2005.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 07.077.615

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS PCV2 Y MÉTODOS PARA PRODUCIR**TALES COMPOSICIONES****SOLICITUDES RELACIONADAS**

5

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional serie No. 60/640,510, presentada en Diciembre 30, 2004, y la solicitud con número de serie 11/034,737, presentada en Enero 13, 2005, cuyas enseñanzas y contenidos se incorporan aquí como referencia.

10

LISTAS DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene una lista de secuencias en formato de papel y en un formato legible por computadora. Cuyas enseñanzas y contenidos se incorporan aquí como referencia.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

20

Un aspecto de la presente invención se relaciona con la recuperación de una proteína expresada mediante una estructura de lectura abierta 2 (ORF2) del circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Más particularmente, la proteína es una proteína recombinante expresada mediante un virus transfectado que contiene secuencias de codificación recombinantes para estructura de lectura abierta 2 de circovirus porcino tipo 2. Aún más particularmente, se permite al virus transfectado infectar las células en medio de crecimiento y la proteína expresada por la estructura de

25

lectura abierta 2 se recupera en el sobrenadante, a diferencia desde el interior de las células. Aún más particularmente el método involucra las etapas de amplificar el gen de estructura de lectura abierta 2 proveniente del circovirus porcino tipo 2, clonar esta porción amplificada en un primer vector, escindir la porción de estructura de lectura abierta 2 proveniente del primer vector y clonarlo en un vector de transferencia, co-transfectar el vector de transferencia con un vector vírico en las células en medio de crecimiento haciendo que las células se infecten mediante el vector vírico y expresando de esta manera la estructura de lectura abierta 2, y recuperar la proteína recombinante expresada codificada mediante la estructura de lectura abierta 2 en el sobrenadante.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición inmunogénica efectiva para inducir una respuesta inmune contra PCV2, y métodos para producir estas composiciones inmunogénicas. Más particularmente, la presente invención se relaciona con una composición inmunogénica efectiva para suministrar una respuesta inmune que protege un animal que recibe la composición, y reduce, o disminuye la severidad, de los síntomas clínicos asociados con la infección PCV2. Aún más particularmente, la presente invención se relaciona con una composición inmunológica basada en proteína que confiere una protección efectiva contra la infección mediante PCV2. Aún más particularmente, la presente invención se relaciona con una composición inmunológica que comprende ORF2 de PCV2, en donde la administración del ORF2 de PCV2 resulta en la protección contra la infección mediante PCV2. Más particularmente, la presente invención se relaciona con una composición inmunológica efectiva para conferir inmunidad efectiva a un cerdo que recibe la composición inmunológica, y en donde la composición comprende una proteína expresada mediante ORF2 de PCV2.

Descripción de la Técnica Relacionada

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus de ADN no recubierto y
5 icosahédrico pequeño (17-22 nm de diámetro), que contiene un genoma circular
de hebra doble. El PCV2 comparte aproximadamente el 80% de la identidad de
secuencia con el circovirus porcino tipo 1 (PCV1). Sin embargo, en contraste con
el PCV1, que es generalmente no virulento, el cerdo infectado con PCV2 exhibe
un síndrome comúnmente denominado como Síndrome Progresivo Multisistémico
10 Post-destete (PMWS).

El PMWS se caracteriza clínicamente por debilitamiento, palidez de la piel,
retardo en crecimiento, dificultad respiratoria, diarrea, ictericia y hepatitis. En
algunos cerdos afectados, una combinación de todos los síntomas será evidente
15 mientras que en otros cerdos solo tendrán uno o dos de estos síntomas. Durante
la necropsia, las lesiones macroscópicas y microscópicas también aparecen sobre
tejidos y órganos múltiples, con órganos linfoides siendo el sitio más común para
las lesiones. Una fuerte correlación se ha observado entre la cantidad del ácido
nucleico o antígeno PCV2 y la severidad de las lesiones linfoides microscópicas.
20 Las tasas de mortalidad para cerdos infectados con PCV2 se pueden aproximar al
80%. Además del PMWS, el PCV2 se ha asociado con varias otras infecciones
que incluyenseudorabias, síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), y
enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis post
destete, hepatosis dietética, y bronconeumonía supurativa.

25

La proteína de estructura de lectura abierta 2 (ORF2) del PCV2, tiene un
peso molecular aproximado de 30 kDa cuando corre sobre un gel SDS-PAGE, se

ha utilizado en el pasado como un componente antigénico en vacunas para PCV2. Los métodos típicos para obtener ORF2 para uso en tales vacunas generalmente consisten de amplificar la codificación de ADN PCV2 para ORF2, transfectando el vector vírico con ADN ORF2, infectando las células con el vector vírico que
5 contiene el ADN ORF2 permitiéndole al virus expresar la proteína ORF2 dentro de la célula, y extrayendo la proteína ORF2 proveniente de la célula por vía de lisis celular. Estos procedimientos generalmente toman aproximadamente 4 días después de la infección de las células por el vector vírico. Sin embargo, estos procedimientos tienen una desventaja por que los procedimientos de extracción
10 son ambos costosos y consumen tiempo. Adicionalmente, la cantidad de ORF2 recuperado de las células no es muy alta; consecuentemente, el gran número de células necesita ser infectado por un gran número de vectores virales con el fin de obtener cantidades suficientes de la proteína recombinante expresada para uso en vacunas y similares.

15 Aproximaciones habituales a la inmunización PCV2 incluyen vacunas basadas en ADN, tal como aquellas descritas en la patente U.S. No. 6,703,023. Sin embargo, tales vacunas han sido inefectivas de conferir inmunidad protectora contra la infección PCV2 y los signos clínicos asociados con esta.

20 De acuerdo con esto, lo que se requiere en la técnica es un método para obtener proteína ORF2, que no requiera la extracción de la proteína ORF2 desde dentro de las células infectadas. Lo que se requiere además son métodos para obtener proteína ORF2 recombinante en cantidades suficientes para preparar de
25 manera eficiente las composiciones de vacuna. Lo que es aún necesario de manera adicional son métodos para obtener proteína ORF2 que no requieran los métodos complicados y de trabajo intensivo requeridos por los protocolos de

extracción de la proteína ORF2 habituales. Finalmente, con respecto a las composiciones, lo que se requiere en la técnica es una composición inmunogénica que no confiera inmunidad protectora contra la infección PCV2 y disminuya la severidad o evite los signos clínicos asociados con esta.

5

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención soluciona los problemas inherentes a la técnica anterior y suministra un avance diferente en el estado de la técnica.

- 10 Específicamente, un aspecto de la presente invención suministra métodos mejorados para producir y/o recuperar proteína ORF2 de PCV2 recombinante, i) al permitir la infección de células susceptibles en cultivo con un vector vírico recombinante que contiene las secuencias codificantes de ADN ORF2 de PCV2, en donde la proteína ORF2 se expresa mediante el vector vírico recombinante, y
- 15 ii) recuperar posteriormente el ORF2 en el sobrenadante. Se ha descubierto inesperadamente que el ORF2 es liberado en el sobrenadante en cantidades grandes si la infección y la incubación subsecuente de las células infectadas se les permite progresar pasando el proceso de recuperación ORF2 de PCV2 previo típico, que el cual extrae el ORF2 de PCV2 desde dentro de las células. Se ha
- 20 encontrado además de manera sorprendente, que la proteína ORF2 de PCV2 es fuerte contra la degradación prototípica por fuera de las células de producción. Ambos hallazgos permiten una recuperación de altas cantidades de proteína ORF2 de PCV2 proveniente del sobrenadante de los cultivos de células infectados con los vectores virales recombinantes que contienen un ADN ORF2 de
- 25 PCV2 y expresan la proteína ORF2 de PCV2. Altas cantidades de proteína ORF2 de PCV2 significan más de aproximadamente 20 µg/ml sobrenadante, preferiblemente más de aproximadamente 25 µg/ml, aún más preferido más de

aproximadamente 30 µg/ml, aún más preferido más de aproximadamente 40 µg/ml, aún más preferido más de aproximadamente 50 µg/ml, aún más preferido más de aproximadamente 60 µg/ml, aún más preferido más de aproximadamente 80 µg/ml, aún más preferido más de aproximadamente 100 µg/ml, aún más preferido que aproximadamente 150 µg/ml, más preferido que aproximadamente 190 µg/ml. Aquellas tasas de expresión también se pueden lograr por ejemplo mediante los métodos como se describieron en los ejemplos 1 a 3.

Los cultivos de células preferidos tienen un conteo de célula entre aproximadamente $0.3 - 2.0 \times 10^6$ células/ml, más preferiblemente desde aproximadamente $0.35 - 1.9$ por 10^6 células/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente $0.4 - 1.8$ por 10^6 células/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente $0.45 - 1.7$ por 10^6 células/ml, y más preferiblemente desde aproximadamente $0.5 - 1.5$ por 10^6 células/ml. Las células preferidas son determinables por aquellos expertos en la técnica. Las células preferidas son aquellas susceptibles para la infección con un vector vírico recombinante apropiado, que contiene un ADN ORF2 de PCV2 y expresa la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente las células son células de insecto, y más preferiblemente, ellas incluyen las células de insecto vendidas bajo la marca Sf+ insect cells (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT).

El medio de crecimiento apropiado también será determinable por aquellos expertos en la técnica con un medio de crecimiento preferido siendo el medio de célula de insecto libre de suero tal como en Exell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) y similares. Los vectores virales preferidos incluyen baculovirus tales como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), en particular si las células de producción son células de insecto. Aunque el sistema de expresión

de baculovirus es el preferido, se entiende por aquellos expertos en la técnica que otros sistemas de expresión trabajarán para los propósitos de la presente invención, a saber la expresión del ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de un cultivo de célula. Tales otros sistemas de expresión pueden requerir el uso de una

5 secuencia de señal con el fin de originar la expresión del ORF2 en el medio. Se ha descubierto de manera sorprendente que el ORF2 se produce mediante un sistema de expresión de baculovirus, este no requiere ninguna secuencia de señal o modificación adicional que origine la expresión del ORF2 en el medio. Se cree que esta proteína puede independientemente formar partículas similares a virus

10 (Journal General Virology Vol. 81, pp. 2281-2287 (2000) y ser secretadas en el sobrenadante del cultivo. El vector vírico recombinante que contiene las secuencias ADN ORF2 de PCV2 tiene una multiplicidad preferida de infección (MOI) de entre aproximadamente 0.03 – 1.5, más preferiblemente desde aproximadamente 0.5 -1.3, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.09

15 -1.1, y más preferiblemente desde aproximadamente 0.1 -1.0, cuando se utiliza para la infección de las células susceptibles. Preferiblemente los MOI mencionados anteriormente se relacionan con el ml de del fluido del cultivo celular. Preferiblemente, el método descrito aquí comprende la infección de $0.35 - 1.9 \times 10^6$ células/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente $0.4 - 1.8 \times 10^6$

20 células/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente $0.45 - 1.7 \times 10^6$ células/ml, y más preferiblemente de aproximadamente $0.5 - 1.5 \times 10^6$ células/ml, con un vector vírico recombinante que contiene un ADN ORF2 de PCV2 y expresa la proteína PCV2 ORF que tiene un MOI (multiplicidad de infección) de entre aproximadamente 0.03 - 1.5, más preferiblemente desde aproximadamente 0.05 –

25 1.3, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.09 –1.12, y más preferiblemente desde aproximadamente 0.1 – 1.0.

Las células infectadas son entonces incubadas durante un período de hasta 10 días, más preferiblemente desde aproximadamente 2 días a aproximadamente 10 días, aún más preferiblemente desde aproximadamente 4 días a aproximadamente 9 días, y más preferiblemente desde aproximadamente 5 días a 5 aproximadamente 8 días. Las condiciones de incubación preferidas incluyen una temperatura entre aproximadamente 22- 32°C, más preferiblemente desde aproximadamente 24-30°C, aún más preferiblemente desde aproximadamente 25-29°C, aún más preferiblemente desde aproximadamente 26-28°C, más preferiblemente desde aproximadamente 27°C. Preferiblemente, las células Sf+ 10 son observadas luego de la inoculación para los cambios inducidos por baculovirus característicos. Tal observación puede incluir monitorear las tendencias de densidad de las células y disminuir la viabilidad durante el periodo post infección. Se ha encontrado que el título viral pico es observado 3 -5 días después de la infección y la liberación ORF2 pico proveniente de las células en el 15 sobrenadante se obtiene entre los días 5 y 8, y/o cuando la viabilidad de la célula disminuye a menos del 10%.

Así, un aspecto de la presente invención suministra un método mejorado para producir y/o recuperar la proteína ORF2 de PCV2 recombinante, 20 preferiblemente en las cantidades descritas anteriormente, mediante i) permitir la infección de un número de células susceptibles (ver anteriormente) en cultivo con un vector vírico recombinante con un MOI como se definió anteriormente, ii) expresar la proteína ORF2 de PCV2 mediante el vector vírico recombinante, y iii) recuperar posteriormente el ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de las células 25 obtenidas entre los días 5 y 8 después de infección y/o la viabilidad de la célula disminuye a menos del 10%. Preferiblemente, el vector vírico recombinante es un baculovirus recombinante que contiene las secuencias codificantes de ADN ORF2

de PCV2 y las células son células Sf+. Adicionalmente, se prefiere que el cultivo sea periódicamente examinado para evidencia macroscópica y microscópica de contaminación y para cambios atípicos en la morfología celular durante el periodo post infección. Cualquier cultivo cualquier contaminación debe ser descartado.

- 5 Preferiblemente, la proteína recombinante ORF2 expresada se secreta mediante las células en el medio de crecimiento circundante que mantiene la viabilidad de la célula. El ORF2 es luego recuperado en sobrenadante que circunda las células en lugar de desde las células mismas. El proceso de recuperación inicia preferiblemente con la separación de los desechos de las células provenientes del
- 10 ORF2 expresado en medio por vía de una etapa de separación. Las etapas de separación preferidas incluyen filtración, centrifugación a velocidades de hasta aproximadamente 20000 xg, centrifugación de flujo continuo, separación cromatográfica utilizando intercambio de ión o filtración de gel, y métodos de inmunoafinidad convencionales. Aquellos métodos son conocidos para personas
- 15 expertas en la técnica por ejemplo por (Harris y Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL press Oxford 1995). Los métodos de separación más preferidos incluyen centrifugación a velocidades hasta de aproximadamente 20,000 xg y filtración. Los métodos de filtración preferidos incluyen microfiltración de extremo muerto y filtración de flujo tangencial (o flujo
- 20 cruzado) que incluye filtración microfiltración de extremo muerto filtración de fibra hueca. De estos, se prefiere la microfiltración de extremo muerto. Los tamaños de poro preferidos para la microfiltración de extremo muerto están entre 0.30 – 1.35 μm , más preferiblemente entre aproximadamente 0.35 – 1.25 μm , más preferiblemente entre aproximadamente 0.40 – 1.10 μm , y más preferiblemente
- 25 entre aproximadamente 0.45 – 1.0 μm . Se cree que cualquier membrana de filtración convencional trabajará para los propósitos de la presente invención y se

prefiere las membranas de polietersulfona. Cualquiera especies de ácido nucleico de peso bajo son removidas durante la etapa de filtración.

Así, un aspecto adicional de la presente invención suministra un método
5 mejorado de producir y/o recuperar proteína ORF2 de PCV2 recombinante, preferiblemente en las cantidades descritas anteriormente, i) permitir la infección de un número de células susceptibles, (ver anteriormente) en cultivo con un vector vírico recombinante con un MOI como se definió anteriormente ii) expresar la proteína PCV ORF2 por el vector vírico recombinante, iii) recuperar el ORF2 de
10 PCV2 en el sobrenadante de las células obtenido entre los días 5 y 8 después de la infección y/o disminuir la viabilidad a menos del 10%, y, iv) separar los desechos de las células provenientes de el ORF2 de PCV2 expresado por vía de una etapa de separación. Preferiblemente, el vector vírico recombinante es un baculovirus que contiene las secuencias codificantes de AADN ORF2 y las
15 células son células Sf+. Las etapas de separación preferidas son aquellas descritas anteriormente. Más preferida es la microfiltración de extremo muerto utilizando una membrana que tiene un tamaño de poro entre aproximadamente 0.30 – 1.35 μm , más preferiblemente entre aproximadamente 0.35 – 1.25 μm , aún más preferiblemente entre aproximadamente 0.40 – 1.10 μm , y más
20 preferiblemente entre aproximadamente 0.45 – 1.0 μm .

Para la recuperación del ORF2 de PCV2 que se utilizará en la composición inmunogénica o inmunológica tal como una vacuna, la inclusión de una etapa en activación se prefiere con el fin de inactivar el vector vírico. Una “composición
25 inmunogénica o inmunológica” se refiere a una composición de materia que comprende al menos un antígeno que elicitara una respuesta inmunológica en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpo a la

composición o vacuna de interés. Usualmente, una "respuesta inmunológica" incluye pero no esta limitada a una o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T, ayudantes, células T supresoras y/o células T citotóxicas y/o células T yd, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o la vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped desplegará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de tal forma que la resistencia a la nueva infección se mejorará y/o la severidad clínica de la enfermedad se reducirá. Tal protección se demostrará mediante una reducción o falta de los síntomas normalmente desplegados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado. Así, la presente invención también se relaciona con un método para producir/recuperar proteína ORF2 de PCV2 recombinante, preferiblemente en las cantidades descritas anteriormente, al i) permitir la infección de un número de células susceptibles (ver anteriormente) en cultivo con un vector vírico recombinante con un MOI como se definió anteriormente, ii) expresar la proteína PCV ORF2 por el vector vírico recombinante, iii) recuperar el ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de las células obtenidas entre los días 5 y 8 después de la infección y/o disminuir la viabilidad de las células a menos del 10%, iv) separar los desechos de las células provenientes de el ORF2 de PCV2 expresado por vía de la etapa de separación, v) inactivar el vector vírico recombinante.

Preferiblemente, esta inactivación se hace justo antes o justo después de la etapa de filtración, siendo la etapa de filtración posterior el tiempo preferido para la inactivación. Cualquier método de inactivación convencional se puede utilizar para los propósitos de la presente invención. Así, la inactivación se puede desarrollar mediante los tratamientos químicos y/o físico. Las formas preferidas, el volumen de los fluidos cosechados se determina y la temperatura se lleva entre

aproximadamente 32 – 42°C, más preferiblemente entre aproximadamente 34 – 40°C, y más preferiblemente entre aproximadamente 35 – 39°C. Los métodos de inactivación preferidos incluyen la etilenimina binaria ciclizada de adición (BEI), preferiblemente en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, aún más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, aún más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM. Por ejemplo la inactivación incluye la adición de una solución de bromohidrato de 2-bromoetileno amina, preferiblemente de aproximadamente 0.4M, que se ha ciclizado a etilenimina binaria 0.2M (BEI) en 0.3 N NaOH, a los fluidos para dar una concentración final de aproximadamente 5 mM de BEI. Preferiblemente, los fluidos son entonces agitados continuamente durante 72-96 horas y los fluidos cosechados inactivados se pueden almacenar congelados a -40°C o por debajo o entre aproximadamente 1 – 7°C. Después de que se completa la inactivación una solución de tiosulfato de sodio, preferiblemente a 1.0M se agrega para neutralizar cualquier BEI residual. Preferiblemente, el tiosulfato de sodio se agrega en cantidad equivalente comparada con el BEI agregado antes para inactivación. Por ejemplo, el evento BEI se agrega a la concentración final de 5 mM, una solución de tiosulfato de sodio 1.0M se agrega para dar una concentración mínima final de 5 mM para neutralizar cualquier BEI residual.

Así, un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con un método para producir proteína ORF2 de PCV2 recombinante preferiblemente en las cantidades descritas anteriormente, al i) permitir la infección de un número de células susceptibles (ver anteriormente) en cultivo con un vector vírico recombinante con un MOI como se definió anteriormente, ii) expresar la proteína

PCV ORF2 por el vector vírico recombinante, iii) recuperar el ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de las células obtenidas entre los días 5 y 8 después de la infección y/o disminuir la viabilidad de las células a menos del 10%, iv) separar los desechos de las células provenientes de el ORF2 de PCV2 expresado por vía de la etapa de separación, y v) inactivar el vector vírico recombinante. Preferiblemente, el vector vírico recombinante es un baculovirus que contiene las secuencias codificantes de ADN ORF2 y las células son células Sf+. Las etapas de separación preferidas son aquellas descritas anteriormente, la más preferida es la etapa de filtración. Las etapas de inactivación preferidas son aquellas descritas anteriormente. Preferiblemente la inactivación se desarrolla entre aproximadamente 35-39°C y en la presencia de 2 a 8 mM de BEI, aún más preferida es la presencia de aproximadamente 5 mM de BEI. Se ha encontrado de manera sorprendente, que las concentraciones mayores de BEI afectan negativamente la proteína ORF2 de PCV2.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el método descrito anteriormente también incluye una etapa de neutralización después de la etapa v). Esta etapa vi) comprende agregar de una cantidad equivalente de un agente que neutraliza el agente de inactivación dentro de la solución. Preferiblemente, si el agente de inactivación es BEI, se prefiere la adición de tiosulfato de sodio a una cantidad equivalente. Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la etapa vi) comprende agregar una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, aún más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, aún más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM, cuando el gen de inactivación es BEI.

En las formas preferidas y especialmente las formas que utilizará la proteína ORF2 de PCV2 recombinante en una composición inmunogénica tal como una vacuna, cada lote de ORF2 cosechado será ensayado para inactivación

5 mediante el paso en las células Sf+ susceptibles de baculovirus dependiente de anclaje. En una forma preferida de este ensayo, 150 cm² de la monocapa de cultivo de célula apropiada se inocula con 1.0 ml de fluido PCV2 inactivados y mantenidos a 25-29°C durante 14 días con al menos dos pasos. Al final del periodo de mantenimiento, las monocapas de célula se examinan para efecto

10 citopatógeno (CPE) típico de los baculovirus ORF2 de PCV2. Preferiblemente, los controles de virus positivo también se utilizan. Tales controles pueden consistir de un cultivo de células Sf+ inoculadas con un baculovirus ORF2 de PCV2 de referencia no inactivado y un recipiente de células Sf+ que permanece no inoculado. Después de la incubación y el paso, la ausencia de células infectadas

15 con virus en los fluidos virales tratados con BEI constituiría un ensayo de inactivación satisfactorio. Las células de control inoculadas en el virus de referencia deben exhibir un CPE típico de baculovirus ORF2 de PCV2 y un recipiente no inoculado no debe exhibir ninguna evidencia de CPE de baculovirus ORF2 de PCV2. Alternativamente, al final del periodo de mantenimiento, las

20 muestras de sobrenadante se podrían recolectar e inocular sobre la placa de pozo Sf+ 96, la cual se ha cargado con células Sf+, y luego se mantuvieron a 25-29°C durante 5-6 días. Esta placa se fijó entonces y se tiñó con un anticuerpo anti-ORF2 de PCV2 conjugado a FITC. La ausencia de la expresión de CPE y ORF2, detectada mediante microscopia IFA, en los fluidos virales tratados con BEI

25 constituye un ensayo de inactivación satisfactorio. Las células de control inoculadas con el virus de referencia deben exhibir actividad CPE e IFA y el

recipiente no inoculado no debe exhibir ninguna evidencia del CPE del
baculovirus ORF2 de PCV2 y no contener la actividad IFA.

Así un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con la prueba de
5 inactivación para determinar la efectividad de la inactivación del vector vírico
recombinante, comprende las etapas de: i) poner en contacto al menos una
porción del fluido de cultivo que contiene el vector vírico recombinante con un
agente inactivante preferiblemente, preferiblemente, como se describió
anteriormente, ii) agregar un agente de neutralización para neutralizar el agente de
10 inactivación, preferiblemente como se describió anteriormente, y iii) determinar la
infectividad residual mediante los ensayos como se describió anteriormente.

Después de la inactivación, la cantidad relativa de proteína ORF2 de PCV2
recombinante en una muestra se puede determinar de numerosas maneras. Los
15 métodos preferidos de cuantificación incluyen densitometría SDS-PAGE, ELISA, y
estudios de vacunación animal que correlacionan cantidades conocidas de vacuna
con resultados clínicos (serología, etc.). Cuando el SDS-PAGE se utiliza para
cuantificación, el material de muestra que contiene la cantidad desconocida de la
proteína ORF2 de PCV2 recombinante es corrida sobre un gel, junto con las
20 muestras que contienen las diferentes cantidades conocidas de proteína ORF2 de
PCV2 recombinante. Una curva estándar puede ser entonces producida con base
en las muestras conocidas y la cantidad de ORF2 de PCV2 recombinante en la
muestra desconocida se puede determinar mediante comparación con esta curva
estándar. En razón a que los ELISA son generalmente reconocidos como el
25 estándar de la industria para la cuantificación de antígenos, ellas se prefieren para
cuantificación.

Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención también se relaciona con un ELISA para la cuantificación de proteína ORF2 de PCV2 recombinante. El ELISA preferido como se suministra con esta generalmente iniciará al diluir el anticuerpo de captura 1:6000 o una dilución de trabajo apropiada en el amortiguador de recubrimiento. Un anticuerpo de captura preferido es la Prot. G PAb anti-PCV2 de cerdo purificada, y el amortiguador de recubrimiento preferido es amortiguador de carbonato 0.05 M que se puede hacer al combinar 2.93 g NaHCO_3 (Sigma Cat, No. S-6014, o equivalente) 1.59 g NaHCO_3 (Sigma Cat, No. S-6139, o equivalente). La mezcla se combina con agua destilada, o equivalente, para hacer un litro a un pH de 9.6 ± 0.1 . Luego, el anticuerpo de captura se diluye 1:6000, o cualquier otra dilución de trabajo apropiada, el amortiguador de recubrimiento. Por ejemplo, para cuatro placas, uno necesitaría 42 mLs de amortiguador de recubrimiento y 7 C de anticuerpo de captura. Utilizando el método de pipeteo inverso, 100 μl de anticuerpo de captura diluido se agregan a todos los pozos. Con el fin de obtener un recubrimiento homogéneo, los lados de cada placa se deben puncionar suavemente. Las placas son luego selladas con selladores de placa, antes del apilamiento de las placas y tapar la pila con una placa de 96 pozos vacía. Las placas son incubadas durante toda la noche (14-24 hora) a $35-39^\circ\text{C}$. Cada placa es luego lavada tres veces con amortiguador de lavado utilizando un lavador de placa ultra lavado más microtítulo acostado a 250 μl /lavado con tres lavados y sin tiempo de remojo. Después del último lavado, las placas se deben puncionar sobre una toalla de papel. De nuevo, utilizando la técnica de pipeteo inversa, 250 μl de solución de bloqueo se deben agregar a todos los pozos. Las placas de ensayo se deben sellar e incubar durante aproximadamente 1 hora (más o menos 5 minutos) a $35-37^\circ\text{C}$. Preferiblemente, las placas no serán apiladas después de esta etapa. Durante la etapa de bloqueo, todas las muestras de ensayo se deben sacar y descongelar a

temperatura ambiente. Luego, cuatro placas de dilución separadas se deben preparar al agregar 200 µl de solución diluyente a todos los pozos restantes excepto para la hilera A y la hilera H, columna 1-3. Luego, seis tubos de ensayo se

- 5 (1:240), inactivado/filtrado (1: 480), y control interno. En los tubos designados se debe preparar la dilución apropiada para las siguientes muestras de ensayo. Las muestras de ensayo descongeladas se deben mezclar antes de uso. Para las cuatro placas, se hacen la siguientes diluciones: A) el título bajo no se ha prediluido: 3.0 mLs de título bajo; B) control negativo a una dilución 1:30 (células Sf+): 3.77 mLs de diluyente + 130 µl de control negativo; C) título medio a una
- 10 dilución 1:30 (8 µg/ml): 3.77 mLs de diluyente + 130 µl de título medio; D) título alto a una dilución 1:90 (16 µg/ml): 2.967 mLs de diluyente + 33 µl de título alto; E) inactivado/filtrado a una dilución 1:240: 2.39 mLs de diluyente + 10 ml de muestra inactivada/filtrada; F) inactivado/filtrado a una dilución 1:480: 1.0 ml de diluyente +
- 15 1.0 ml de impacto/filtrado (1:240) muestra preparada de E anterior; G) control interno a una dilución 1:30 : 3.77 mLs de diluyente + 130 µl de control interno. Luego, agregar 300 µl de la muestra preparada a los pozos vacíos correspondientes en las placas de dilución para las placas 1 a 4. El pipeteador multicanal es luego ajustado a 100 µl, y los contenidos en la hilera A se mezclan al
- 20 pipetear arriba y abajo durante al menos 5 veces y luego 100 µl se transfieren a la hilera B utilizando la técnica de pipeteo inversa. Las puntas se deben cambiar y este mismo procedimiento se sigue hacia debajo de la placa a la hilera G. Las muestras de estas placas de dilución están ahora listas para transferir a las placas de ensayo una vez que las placas de ensayo se han lavado tres veces con
- 25 amortiguador de lavado utilizando un lavador de placa ultra lavado más micro título (ajustados a 250 µl /lavado, 3 lavados, sin tiempo de remojo). Después del último lavado, las placas se deben puncionar sobre una toalla de papel. Luego, los

contenidos de la placa de dilución se transfieren a la placa de ensayo utilizando un procedimiento de transferencia simple. Más específicamente, partiendo de la hilera H, 100 µl/pozo se transfieren desde el o las placas de dilución a los pozos correspondientes de las placas de ensayo utilizando una técnica de pipeteo inversa. Después de cada transferencia, las puntas de las pipetas se deben cambiar. Desde la hilera H, 100 µl /pozo las placas de dilución se transfieren a los pozos correspondientes de las placas de ensayo utilizando la técnica de pipeteo inversa. El mismo ajuste de las puntas de la pipeta se puede utilizar para el resto de la transferencia. Para asegurar una solución homogénea para la transferencia, la solución se debe pipetear arriba y abajo al menos tres veces antes de transferencia. Luego, las placas de ensayo son selladas e incubadas durante 1.0 horas $\pm$ 5 minutos a 37°C, $\pm$ 2.0°C. De nuevo, es preferible no apilar las placas. Las placas son entonces lavadas tres veces con amortiguador de lavado utilizando un lavador de placa ultra lavado más micro título (ajustados a 250 µl/lavados, 3 lavados, y sin tiempo de remojo). Después de último lavado, las placas son punccionadas sobre una toalla de papel. Utilizando la técnica de pipeteo inversa, 100 µl de anticuerpo de detección diluida 1:300, o la dilución de trabajo apropiada, en la solución diluyente se agrega a todos los pozos de de el o las placas de ensayo. Por ejemplo, para las cuatro placas, uno necesitará 42 mLs de solución diluyente con 140 ml de anticuerpo de captura. Las placas de ensayo son entonces selladas e incubadas durante 1.0 hora $\pm$ 5 minutos a 37°C $\pm$ 2.0°C. De nuevo las placas son lavadas 3 veces con amortiguador de lavado utilizando un lavador de placa ultra lavado más micro título (ajustados a 250 v/lavado, 3 lavados, y sin tiempo de remojo). Después de último lavado, las placas son punzonada sobre una toalla de papel. Luego, el diluyente conjugado se preparar al agregar 1% de suero de conejo normal al diluyente. Por ejemplo, para cuatro placas, 420 µl del suero de conejo normal se agrega a 42 µl de diluyente. El

anticuerpo conjugado se diluye a 1:10000, o cualquier otra dilución de trabajo apropiada, en una solución diluyente conjugada preparada recientemente a todos los pozos de el o las placas de ensayo. Utilizando la técnica de pipeteo inversa, 100 µl de anticuerpo conjugado diluido se agregan a todos los pozos. El o las

5 placas de ensayo son entonces selladas o incubadas durante 45 ± 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$. Preferiblemente, las placas no son apiladas. Las placas son entonces lavadas 3 veces con un amortiguador de lavado utilizando el lavador de placa ultra lavado más micro título (ajustado 250 µl/lavado, 3 lavados, y sin tiempo de remojo). Después del último lavado, las placas son punzonadas sobre una

10 toalla de papel. Luego, volúmenes iguales de sustrato de Peroxidasa TMB (Reactivo A) con Solución de Peroxidasa B (Reactivo B) se mezclan inmediatamente antes de uso. La cantidad mezclada variará dependiendo de la cantidad de placas pero cada placa requerirá 10 ml/placa + 2mLs. Por lo tanto, para 4 placas está será de 21 ml de reactivo A + 21 ml de reactivo B. Utilizando

15 una técnica de pipeteo inversa, 100 µl de sustrato se agregan a todas los pozos de el o las placas de ensayo. Las placas son entonces encubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos $\pm$ 15 segundos. La reacción se detiene mediante la adición de 100µl de una solución 1N de HCL a todos los pozos utilizando la técnica de pipeteo inversa. El lector de placa ELISA es luego prendido y se le

20 permite proceder a través de su diagnostico y las fases de ensayo de manera convencional.

Un aspecto adicional de la invención se relaciona con un método para construir un vector vírico recombinante que contiene ADN ORF2 de PCV2 que se

25 expresa la proteína ORF2 de PCV2 en cantidades altas, cuando se enfrenta en células susceptibles. Se ha encontrado sorprendentemente que el vector vírico recombinante como se suministra con este expresa altas cantidades, como se

definió anteriormente, del ORF2 de PCV2 después de infectar las células susceptibles. Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con un método mejorado para producir y/o recuperar la proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente comprende la etapa: construir un vector vírico recombinante que

5 contiene ADN ORF2 de PCV2 y que expresa una proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, el vector vírico es un baculovirus recombinante. Los detalles del método para construir los vectores virales recombinantes que contienen ADN ORF2 de PCV2 y que expresan la proteína ORF2 de PCV2, como se suministran con este, se describen como sigue: en las formas preferidas del vector vírico

10 recombinante que contiene ADN ORF2 de PCV2 y que expresa la proteína ORF2 de PCV2 utilizada para infectar las células se genera al transferir un vector de transferencia que ha tenido un gen ORF2 clonado en este en un vector vírico. Preferiblemente, solo la porción del vector de transferencia se transfecta en el vector vírico, que contiene el ADN ORF. El término "transfectado en vector vírico"

15 significa, y se utiliza como un sinónimo de "introducir" o "clonar" un ADN heterólogo en un vector vírico, tal como por ejemplo en un vector de baculovirus. El vector vírico es preferiblemente pero no necesariamente un baculovirus.

Así, de acuerdo a un aspecto adicional de la presente invención, el vector

20 vírico recombinante se genera mediante la recombinación entre el vector de transferencia que contiene el ADN ORF2 de PCV2 heterólogo, y un vector vírico, preferiblemente un baculovirus, aún más preferiblemente un baculovirus deficiente en replicación linearizado (tal como el ADN Baculo Gold). Un "vector de transferencia" significa una molécula de ADN, que incluye al menos un origen de

25 replicación, el gen heterólogo, en el caso presente ORF2 de PCV2, y la secuencia de ADN que permite la clonación de dicho gen heterólogo en el vector vírico. Preferiblemente las secuencias que permiten la clonación del gen heterólogo en el

vector vírico están flanqueando el gen heterólogo. Aún más preferiblemente aquellas secuencias de flaqueo son al menos homólogas en parte consecuentes del vector vírico. La homología de secuencia permite entonces la recombinación de ambas moléculas, el vector vírico y el vector de transferencia para generar un
5 vector vírico recombinante que contiene el gen heterólogo. Un vector de transferencia preferido es el vector pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen), que es diseñado para co-transfección con el ADN BaculoGold en la línea celular Sf+ preferida. Preferiblemente, dicho vector de transferencia comprende un ADN ORF2 de PCV2. La construcción co-transfectada tiene aproximadamente 10,387
10 para bases de longitud.

En las formas más preferidas, los métodos de la presente invención iniciarán con un aislamiento del ADN ORF2 de PCV2. En general, este puede ser de una sepa conocida o desconocida en la medida en que el ADN o el ORF22
15 parezca ser altamente conservado con al menos 95% de la identidad de secuencia entre diferentes aislados. Cualquier gen ORF2 de PCV2 conocido en la técnica se puede utilizar para los propósitos de la presente invención en la medida en que cada uno sería expresado en el sobrenadante. El ADN ORF2 de PCV2 es preferiblemente amplificado utilizando los métodos PCR, aún más preferidos
20 juntos con la introducción de una secuencia de consenso de Kozak que plantea el 5' (CCGCCAUG) (SEQ ID NO: 1) y/o el sitio EcoR1 de flaqueo (GAATTC) (SEQ ID NO:2). Tal introducción del consenso de Kozak 5' remueve preferiblemente el codón de inicio de ocurrencia natural AUG del ORF2 de PCV2. El sitio EcoR1 3'es preferiblemente introducido corriente abajo del codón de parada del ORF2 de
25 PCV2. Más preferiblemente se introduce corriente debajo de una secuencia de terminación de transcripción poli A, que en si misma está localizada corriente abajo del codon de parada ORF2 de PCV2. Se ha encontrado, que el uso de la

secuencia de consenso Kozak, en particular como se describió anteriormente, incrementa el nivel de expresión de la proteína ORF2 de PCV2 subsecuente. El ADN ORF2 de PCV2 amplificado, con estas secuencias adicionales, se clona en un vector. Un vector preferido para esta etapa de clonación inicial es el Vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). El ADN ORF2 de PCV2 incluye algunas secuencias del vector pGEM (SEQ ID NO:7) es preferiblemente escindido del vector en el sitio de restricción Not1. El ADN resultante es luego clonado en el vector de transferencia.

Así, en un aspecto de la presente invención, un método para construir un vector vírico recombinante que contiene ADN de ORF2 de PCV2 se suministra. Este método comprende las etapas de: i) clonar un ORF2 de PCV2 recombinante en un vector de transferencia; ii) transfectar la porción del vector de transferencia que contiene ORF2 de PCV2 recombinante en un vector vírico, para generar el vector vírico recombinante. Preferiblemente, el vector de transferencia es aquel descrito anteriormente o se construye como se describió anteriormente como un ejemplo mostrado en la Figura 1. Así de acuerdo a un aspecto adicional, el vector de transferencia, utilizado para la construcción del vector vírico recombinante como se describió aquí, contiene la secuencia de la SEQ ID NO: 7.

De acuerdo con un aspecto adicional, este método comprende además antes de la etapa i) la siguiente etapa. Amplificar el ADN ORF2 de PCV2 *in Vitro*, en donde las secuencias de flaqueo de el ADN ORF2 de PCV2 se modifican como se describió anteriormente. Los métodos *in Vitro* para amplificar el ADN ORF2 de PCV2 y modificar las secuencias de flaqueo, clonar *in Vitro* el ADN ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia y los vectores de transferencia adecuados son descritos anteriormente, mostrado el ejemplo en la

Figura 1, o conocidos para una persona experta en la técnica. Así de acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método para construir un vector vírico recombinante que contiene un ADN ORF2 de PCV2 y expresa la proteína ORF2 de PCV2 que comprende las etapas de i) amplificar el ADN del ORF2 de PCV2 in Vitro, en donde las secuencias de flaqueo de dicho ADN ORF2 de PCV2 se modifican, ii) clonar el ADN ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia, iii) transfectar el vector De transferencia o una porción de este que contiene el ADN del ORF2 de PCV2 recombinante en un vector vírico para generar el vector vírico recombinante. Preferiblemente, la modificación de las secuencias de flaqueo del ADN ORF2 de PCV2 se desarrollan como se describió anteriormente, por ejemplo, al introducir una secuencia Kozak 5' y/o un sitio EcoR 1, preferiblemente como se describió anteriormente.

De acuerdo con un aspecto adicional, el método para producir y/o recuperar la proteína recombinante expresada mediante la estructura de lectura abierta 2 del PCV2 se suministra. El método comprende generalmente las etapas de: i) clonar un ORF2 de PCV2 recombinante en un vector de transferencia; ii) transfectar la porción del vector de transferencia que contiene el ORF2 de PCV2 recombinante en un virus; iii) transfectar las células en medio con el virus transfectado; iv) hacer que el virus transfectado exprese la proteína recombinante proveniente del ORF2 de PCV2; v) separar las células del sobrenadante; y vi) recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada del sobrenadante.

Los métodos de cómo clonar un ADN ORF2 de PCV2 recombinante en un vector de transferencia se describieron anteriormente. Preferiblemente, el vector de transferencia contiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4, SEQ ID

NO: 7. Sin embargo, el vector de transferencia puede contener cualquier ADN ORF2 de PCV2, no modificado o modificado, en tanto que el ADN ORF2 de PCV2, cuando se transfecta en un vector vírico recombinante, se expresa en un cultivo de célula. Preferiblemente, el vector vírico recombinante comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8. Más aún, los métodos de cómo infectar las células, preferiblemente como infectar las células de insecto con un número definido de baculovirus recombinante que contiene el ADN ORF2 de PCV2 y expresar la proteína ORF2 de PCV2 se describieron anteriormente en detalle. Más aún, las etapas de separar las células del sobrenadante así como también las etapas de recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada también se describieron anteriormente en detalle. Cualquiera de estas etapas de proceso específicas como se describieron aquí, son parte del método producir y/o recuperar la proteína recombinante expresada mediante estructura de lectura abierta 2 del V como se describió anteriormente. Preferiblemente las células son células Sf+. Aún más preferiblemente, los cultivos de células tienen un conteo de células desde aproximadamente $0.3-2.0 \times 10^6$ células/ml, más preferiblemente de aproximadamente $0.35-1.9 \times 10^6$ células/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente $0.4-1.8 \times 10^6$ células/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente $0.45-1.7 \times 10^6$ células/ml, y más preferiblemente desde aproximadamente $0.5-1.5 \times 10^6$ células/ml. Preferiblemente, el vector vírico recombinante que contiene el ADN ORF2 de PCV2 tiene una multiplicidad preferida de infección (MOI) de entre aproximadamente 0.03-1.5, más preferiblemente de aproximadamente 0.05-1.3, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.09 – 1.12, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.1-1.0. y más preferiblemente a aproximadamente 0.5, cuando se utilizan para la infección de las células susceptibles. Preferiblemente, la recuperación de la proteína ORF2 de PCV2 en el sobrenadante de la célula obtenido entre los días 5

y 8 después de la infección y/o la viabilidad de la célula disminuye a menos del 10%. Preferiblemente, para la producción de la proteína ORF2 de PCV2, las células son cultivadas a 25 a 29°C. Preferiblemente, la etapa de separación es una etapa de centrifugación o de filtración.

5

Opcionalmente, este método puede incluir la etapa de amplificar el ADN ORF2 de PCV2 desde una sepa de PCV2 antes de clonar el ADN ORF2 de PCV2 a un vector de transferencia. En las formas preferidas, una secuencia de Kozak 5', un sitio EcoR 1 3', y las combinaciones de estos se puede agregar a la secuencia

10 amplificada, preferiblemente antes o durante la amplificación. Una secuencia de Kozak 5' preferida comprende la SEQ ID NO: 1. Un sitio EcoR1 3' comprende la SEQ ID NO: 2. El ADN ORF2 de PCV2 preferido comprende una secuencia de nucleótido número de acceso Genbank Acceso No. AF086834 (SEQ ID NO: 3) y la SEQ ID NO: 4. La proteína ORF2 de PCV2 recombinante preferida comprende

15 la secuencia aminoácido de la SEQ ID NO: 5, que es la proteína codificada por la SEQ ID NO: 3 (Genbank Acceso No. AF086834) y la SEQ ID NO: 6, que es la proteína codificada por la SEQ ID NO: 4. Un medio preferido comprende un medio de célula de insecto libre de suero, aún más preferiblemente un medio de Excel 420. Cuando la etapa de amplificación opcional se desarrolla, es preferible primero

20 clonar la estructura de lectura abierta amplificada 2 en un primer vector, escindir la estructura de lectura abierta 2 del primer vector, y utilizar la estructura de lectura abierta escindida para clonarla en el vector de transferencia. Una línea celular preferida para cotransfección es la línea celular Sf+. Un virus preferido para cotransfección es el baculovirus. En formas preferidas de este método, la porción

25 transfectada del vector de transferencia comprende SEQ ID NO: 8. Finalmente, para este método, se prefiere recuperar las estructuras de lectura abierta 2

(ORF2) en el sobrenadante del cultivo de célula al menos 5 días después de infectar las células con el virus.

Así, un aspecto adicional de la invención se relaciona con un método para producir y/o recuperar la estructura de lectura abierta 2 PCV2, que comprende las etapas de: i) amplificar el ADN del ORF2 de PCV2 in Vitro, especialmente al agregar la secuencia Kozak 5' y/o al agregar el sitio de restricción EcoR 1 3', ii) clonar la ORF2 de PCV2 amplificada en un vector de transferencia, iii) transfectar la porción del vector de transferencia que contiene el ORF2 de PCV2 recombinante en un virus; iv) infectar las células en el medio con el virus transfectado; v) hacer que el virus transfectado exprese la proteína recombinante del ORF2 de PCV2; vi) separar las células del sobrenadante, y vii) recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada del sobrenadante.

Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con un método para preparar una composición que comprende proteínas ORF2 de PCV2 y un vector vírico inactivado. Este método comprende las etapas de: i) clonar el ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia; ii) transfectar la porción del vector de transferencia que contiene el ORF2 de PCV2 recombinante en un virus; 3) infectar las células en medio con el vector vírico transfectada; iv) hacer que el vector vírico transfectado exprese la proteína recombinante del ORF2 de PCV2; v) separar las células del sobrenadante; vi) recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada del sobrenadante; y vii) inactivar el vector vírico recombinante. Preferiblemente, el vector vírico recombinante es un baculovirus que contiene las secuencias codificantes de ADN ORF2 y las células son células SF+. Las etapas de separación preferidas son aquellas descritas anteriormente, la más preferida es la etapa de filtración. Las etapas de inactivación preferidas son aquellas descritas

anteriormente. Preferiblemente, la inactivación se desarrolla entre aproximadamente 35-39°C y en la presencia de 2 a 8 mM DE BEI, aún más preferida en la presencia de aproximadamente 5 Mm de EBI. Se ha encontrado de manera sorprendente, que las concentraciones mayores de EBI afectan negativamente la proteína ORF2 de PCV2, y las menores concentraciones no son efectivas para inactivar el vector vírico dentro de las 24 a las 72 horas de inactivación. Preferiblemente, la inactivación se desarrolla durante al menos 24 horas, aún más preferido durante 24 a 72 horas.

De acuerdo con un aspecto adicional, el método para preparar una composición que comprende la proteína ORF2 de PCV2, y el vector vírico inactivado, como se describió anteriormente, también incluye una etapa de neutralización después de la etapa 7. Esta etapa 7 comprende agregar una cantidad equivalente de un agente que neutraliza el agente de inactivación dentro de la solución. Preferiblemente, si el agente de inactivación es BEI, se prefiere agregar tiosulfato de sodio a una cantidad equivalente. Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la etapa 8 comprende agregar una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM, preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, aún más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, aún más preferiblemente aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente de activación es BEI.

De acuerdo con un aspecto adicional, el método para preparar la composición que comprende la proteína ORF2 de PCV2, y el vector vírico inactivado, es como se describió anteriormente, comprende antes de la etapa 1 la

siguiente etapa: i) amplificar el ADN del ORF2 de PCV2 *in Vitro*, en donde las secuencias de flaqueo del ADN ORF2 de PCV2 se modifican como se describió anteriormente. Los métodos *in Vitro* para amplificar el ADN ORF2 de PCV2 sin modificar las secuencias de flaqueo, clonar *in Vitro* el ADN ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia y vectores de transferencia adecuados se describieron anteriormente, los ejemplos mostrados en la Figura 1, o conocidos por una persona experta en la técnica. Así de acuerdo a un aspecto adicional este método comprende las etapas de: i) amplificar el ADN del ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde las secuencias de flaqueo de dicho ADN ORF2 de PCV2 se modifican, ii) clonar al ADN ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia; y iii) transfectar el vector de transferencia o una porción de este que contiene el ADN ORF2 de PCV2 recombinante en un vector vírico para generar el vector vírico recombinante; iv) infectar las células en el medio con el virus transfectado; v) hacer que el virus transfectado exprese la proteína recombinante del ORF2 de PCV2; vi) separar las células del sobrenadante; vii) recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada del sobrenadante; viii) inactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente, en la presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM de BEI, más preferida en la presencia de aproximadamente 5 mM BEI, y ix) agregar una cantidad equivalente de un agente que neutralice el agente de inactivación dentro de la solución, preferiblemente, agregar una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 Mm, preferiblemente de aproximadamente 5 mM, cuando el agente en activación es BEI.

En otro aspecto de la presente invención, un método para preparar una composición, preferiblemente una composición antigénica, tal como por ejemplo una vacuna, para invocar una respuesta inmune contra PCV2. En general, este

método incluye las etapas de transfectar una construcción en un virus, donde la construcción comprende i) el ADN recombinante del ORF2 del PCV2, ii) infectar las células en medio del crecimiento con virus transfectado, iii) hacer que el virus exprese la proteína recombinante del ORF2 de PCV2, iv) recuperar la proteína ORF2 expresada proveniente del sobrenadante, v) y preparar la composición al combinar la proteína recuperada con un adyuvante adecuado y/o otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los "adyuvantes" como se utilizan aquí, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc. Cambridge MA), GPI-0100 (galenita Pharmaceuticals, Inc, Birmingham, Al), emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede estar basada en particular en aceite de parafina líquido ligero (tipo Pharmacopea European) aceite isoprenoide tal como escualano o escualeno, el aceite resultante de la teoligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o decenos; ésteres de ácidos de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, etil oleato, propilenglicol di-(caprilato/caprato), gliceril tri-(caprilato/caprato) o propilenglicol dioleato; Los ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsificantes para formar la emulsión. Los emulsificadores son preferiblemente tensoactivos no iónicos en particular ésteres de sorbitan, de manido (por ejemplo oleato de anhidro manitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol o de ácido oleico, isosteárico, ricinoleico o hidroxí esteárico, que son opcionalmente etoxilados, y bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, especialmente L121. Ver Hunter et al., The Theory and

Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) and Todd et al., Vaccine 15: 564-570 (1997).

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

Un caso adicional de un adyuvante es un compuesto escogido de los polímeros de ácido acrílico y metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alquenilo. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que son reticulados, especialmente con éteres de polialquenilo de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, No. 2, Junio 1996). Las personas expertas en la técnica también pueden hacer referencia a la patente U.S. No. 2,909,462 que describe tales polímeros acrílicos reticulados con compuesto polihidroxiado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, los átomos de hidrógeno de al menos 3 hidroxilos son reemplazados por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilo, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden ellos mismos contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol; (BF Goodrich Ohio, USA) son particularmente apropiados. Ellos son reticulados con una anil sucrosa o con alil pentaeritritol. Entre ellos, se puede mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Más preferido es el uso de Carbopol 971P. Entre los copolímeros del anhídrido maleico el derivado de alquenilo, los copolímeros EMA (Monsanto) que son copolímeros

de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que se neutralizará, preferiblemente hasta pH fisiológico, con el fin de dar una solución adyuvante en la cual la composición inmunogénica, inmunológica o vacuna misma se incorporará.

5

Los adyuvantes adecuados adicionales incluyen, pero no están limitados a, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), el copolímero en bloque (CytRx, Atlanta, GA) SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lípido A, el adyuvante de lípido-amina Avridina, la enterotoxina lábil al calor de E. coli (recombinante o de otra forma), la toxina del cólera, el IMS 1314 o el dipéptido muramil entre muchos otros.

10

Preferiblemente el adyuvante se agrega en una cantidad aproximadamente 100 µg a aproximadamente 100 mg por dosis. Aún más preferido el adyuvante se agrega en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferido el adyuvante se agrega en una cantidad de 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. Aún más preferido el adyuvante se agrega en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2.5 mg por dosis. Más preferido el adyuvante se agrega en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

15

20

Así, de acuerdo con un aspecto adicional, el método para preparar la composición antigénica, tal como por ejemplo una vacuna, para invocar una respuesta inmune contra PCV2 comprende i) preparar y recuperar la proteína ORF2 de PCV2, y ii) mezclar con un adyuvante adecuado. Preferiblemente, el adyuvante es Carbopol 971P. Aún más preferido, el Carbopol 971P se agrega en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, aún más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg a

25

aproximadamente 2.5 mg por dosis y más preferida en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis. Preferiblemente, el proceso de la etapa 1 incluye las etapas de proceso como se describieron para la preparación y recuperación del ORF2 de PCV2. Por ejemplo, en formas preferidas de este método, la construcción que comprende ADN de ORF2 de PCV2 se obtiene en un vector de transferencia. Los vectores de transferencia adecuados y los métodos para prepararlos se describieron anteriormente. Opcionalmente, el método puede incluir una etapa de amplificar el ORF2 de una cepa de PCV2 a través de PCR antes de clonar el ORF2 en el vector de transferencia. Las secuencias de estructura de lectura abierta preferidas, las secuencias de Kozak, las secuencias del sitio EcoR1 3', las secuencias de proteína recombinante, las secuencias de construcción transfectada, los medios, células, y los virus son como se describieron en los métodos previos. Otra etapa opcional para este método incluye clonar el ADN ORF2 de PCV2 amplificado en un primer vector escindiendo el ADN ORF2 de PCV2 de este primer vector y utilizando este ADN ORF2 de PCV2 para clonar el vector de transferencia. Como con otros, se prefiere esperar durante al menos 5 días después de la infección de las células mediante el baculovirus transfectado antes de la recuperación de la proteína ORF2 recombinante del sobrenadante. Preferiblemente, la etapa de recuperación de este método también incluye la etapa de separar el medio de las células y los desechos de célula. Esto también se puede hacer de una variedad de formas pero para facilidad y conveniencia se prefiere filtrar las células, los desechos de células, el medio de crecimiento a través de un filtro que tiene poros que varían en tamaño desde aproximadamente 0.45 μm a aproximadamente 1.0 μm . Finalmente, para este método se prefiere incluir una etapa de inactivación de virus antes de combinar la proteína ORF2 de PCV2 recombinante recuperada en una composición. Esto se

puede hacer en una variedad de formas, pero se prefiere la práctica de la presente invención utilizar BEI.

Así de acuerdo a un aspecto adicional, este método comprende las etapas

5 de: i) amplificar el ADN ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde las secuencias de flaqueo de dicho ADN ORF2 de PCV2 se modifican, ii) clonar el ADN ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia, y iii) transfectar el vector de transferencia a una porción de éste que contiene el ADN ORF2 de PCV2 en un vector vírico para generar el vector vírico recombinante, iv) infectar las células en

10 medio con el virus transfectado; v) hacer que el virus transfectado exprese la proteína recombinante de ORF2 de PCV2, iv) separar las células del sobrenadante; vii) recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada del sobrenadante; viii) inactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente en la presencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mm de BEI, más

15 preferido es la presencia de aproximadamente 5 mm de BEI; ix) agregar una cantidad equivalente de un agente que neutralice el agente de inactivación dentro de la solución, preferiblemente agregando una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mm, preferiblemente de aproximadamente 5 mm, cuando el agente de inactivación es

20 BEI, y x) agregar una cantidad adecuada de un adyuvante, preferiblemente agregar Carbopol, más preferiblemente Carbopol 971P, aún más preferido en cantidades como se describió anteriormente (por ejemplo de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, aún más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2.5 mg por dosis y más preferida en

25 una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más vehículos farmacéuticos aceptables. Como se utiliza aquí, "un vehículo farmacéutico aceptable incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, preservativos, agentes antibacteriales y antifungosos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción, y similares. Más preferido, la composición suministrada con éste la proteína ORF2 de PCV2 recuperada del sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, en donde dichas células fueron infectadas con un vector vírico recombinante que contiene ADN ORF2 de PCV2 y expresar la proteína ORF2 de PCV2, y en donde dicho cultivo de célula fue tratado con aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM de BEI, preferiblemente con aproximadamente 5 mM de BEI para inactivar el vector vírico y una concentración equivalente de un agente de neutralización, preferiblemente solución de tiosulfato de sodio a una concentración final de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM, Carbopol, más preferiblemente Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, aún más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2.5 mg por dosis y más preferido en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis y solución salina fisiológica preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 50 a aproximadamente 90% (v/v), más preferiblemente a aproximadamente 60 a 80% (v/v), aún más preferiblemente de aproximadamente 70% (v/v).

Así, un aspecto adicional se relaciona con un método para preparar una composición antigénica tal como por ejemplo una vacuna, para invocar una respuesta inmune contra PCV2 que comprende las etapas: i) amplificar ADN ORF2 de PCV2 *in vitro*, en donde las secuencias de flaqueo de dicho ADN ORF2

de PCV2 se modifican, **ii)** clonar el ADN ORF2 de PCV2 amplificado en un vector de transferencia, y **iii)** transfectar el vector de transferencia o una porción de éste que contiene el ADN ORF2 de PCV2 recombinante en un vector vírico para generar el vector vírico recombinante, **iv)** infectar las células en el medio con el virus transfectado; **v)** hacer que el virus afectado exprese en la proteína recombinante de ORF2 de PCV2; **vi)** separar las células de sobrenadante; **vii)** recuperar la proteína ORF2 de PCV2 expresada del sobrenadante; **viii)** inactivar el vector vírico recombinante, preferiblemente, en la presencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 mM de BEI, más preferido en la presencia de aproximadamente 5 mM de BEI; **ix)** agregar una cantidad equivalente de un agente que neutralice el agente de inactivación dentro de la solución, preferiblemente agregando una solución de tiosulfato de sodio a una concentración final de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 20 mM, preferiblemente 5 mM cuando el agente de inactivación es BEI, **x)** agregar una cantidad adecuada de unos adyuvantes, preferiblemente agregando Carbopol, más preferiblemente Carbopol 971P, aún más preferido en cantidades como se describió anteriormente (por ejemplo de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 µg por dosis, aún más preferible en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2.5 mg por dosis y más preferido en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis); y **xi)** agregar solución salina fisiológica, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 50 a aproximadamente 90% (v/v), más preferiblemente a aproximadamente 60 a 80% (v/v), aún más preferiblemente de aproximadamente 70% (v/v). Opcionalmente, este método también puede incluir la visión de un protector. Un protector como se utiliza aquí se refiere a un agente activo antimicrobiológico, tal como Gentamicina, Mertiolate, y similar. En particular agregar un protector es más preferido para la preparación de una composición multidosis. Aquellos agentes activos

antimicrobiológicos se agregan en concentraciones efectivas para evitar la composición de interés para cualquier contaminación microbiológica o para la inhibición de cualquier crecimiento microbiológico dentro de la composición de interés.

5

Más aún, este método también puede comprender la adición de cualquier agente estabilizante, tal como por ejemplo sacáridos, trehalosa, manitol, sacarosa y similares, para incrementar y/o mantener la vida media del producto. Sin embargo, se ha encontrado de manera sorprendente que la formulación resultante es inmunológicamente efectiva durante un periodo de al menos 24 meses sin agregar un ningún agente estabilizante adicional.

10

Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con el resultado de los productos de los métodos como se describió anteriormente. En particular, la presente invención se relaciona con una composición de materia que comprende proteína ORF2 de PCV2 recombinantemente expresada. Más aún, la presente invención también se relaciona con una composición de materia que comprende proteína ORF2 de PCV2 recombinantemente expresada, recuperada del sobrenadante de un cultivo de célula de insecto. Más aún, la presente invención también se relaciona con una composición de materia que comprende proteína ORF2 de PCV2 recombinantemente expresada, recuperada del sobrenadante de un cultivo de célula de insecto. Preferiblemente, esta composición de materia también comprende un agente adecuado para la inactivación de vectores virales. Preferiblemente, dicho agente de inactivación es BEI. Más aún, la presente invención también se relaciona con una composición de materia que comprende la proteína ORF2 de PCV2 recombinantemente expresada recuperada del sobrenadante de un cultivo de célula de insecto, y comprende un agente,

15

20

25

adecuado para la inactivación de vectores virales, preferiblemente BEI y un agente de neutralización para neutralización del agente de inactivación. Preferiblemente, ese agente de neutralización es tiosulfato de sodio cuando el BEI se utiliza como un agente de inactivación.

5

En aún otro aspecto de la presente invención, se suministra una composición inmunológica que induce una respuesta inmune y, más preferiblemente, confiere inmunidad protectora contra los signos clínicos de la infección PCV2. La composición generalmente comprende el polipéptido, o un
10 fragmento de éste, expresado mediante la Estructura de Lectura Abierta 2 (ORF2) de PCV2, como el componente antigénico de la composición.

El ADN ORF2 de PCV2 y la proteína, como se utiliza aquí para la preparación de las composiciones y también como se utiliza dentro de los
15 procesos suministrados aquí es un dominio altamente conservado dentro de los aislados PCV2 y de esta manera, cualquier ORF2 de PCV2 sería efectivo como la fuente de ADN ORF2 de PCV2 y/o polipéptido como se utiliza aquí. Una proteína ORF2 de PCV2 preferida es aquella de la SEQ ID NO. 11. Un polipéptido ORF2 de PCV2 preferido se suministra aquí como la SEQ ID NO. 5, pero se entiende por
20 aquellos expertos en la técnica que esta secuencia se podría variar tanto como 6-10% en homología de secuencia y aún retener las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden ser, estimadas por el experimento de exposición como se suministró en el ejemplo 4. Más aún, la característica
25 antigénica de un antígeno modificado es aún retenida, cuando el antígeno modificado confiere al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% de la inmunidad protectora comparada con la proteína ORF2 de PCV2,

codificada mediante la secuencia de polinucleótido de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 4. Una "composición inmunogénica" como se utiliza aquí, significa una proteína ORF2 de PCV2 que elicitaba una "respuesta inmunológica" en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpo a la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, esta composición inmunogénica es capaz de conferir inmunidad protectora contra la infección PCV2 y los signos clínicos asociados con ésta. En algunas formas, las porciones inmunogénicas de la proteína ORF2 de PCV2 son utilizadas como el componente antigénico en la composición. El término "porción inmunogénica" como se utiliza aquí se refiere a formas truncadas y/o sustituidas, o fragmentos de la proteína ORF2 de PCV2 y/o polinucleótido, respectivamente. Preferiblemente, tales formas truncadas y/o sustituidas o fragmentos comprenderán al menos 6 aminoácidos contiguos del polipéptido ORF2 de longitud completa. Más preferiblemente, las formas truncada o sustituida, o los fragmentos tendrán al menos 10, más preferiblemente al menos 15, y aún más preferiblemente al menos 19 aminoácidos contiguos del polipéptido ORF2 de longitud completa. Dos secuencias preferidas a este respecto se suministran aquí como la SEQ ID NO: 9 y 10. Se entiende además que tales secuencias pueden ser partes de fragmentos mayores o formas truncadas. Un polipéptido ORF2 de PCV2 preferido adicional suministrado aquí se codifica mediante las secuencias de nucleótido de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4. Pero se entiende por aquellos expertos en la técnica que esta secuencia podría variar tanto como 6-20% en la homología de secuencia y aún retendrá las características antigénicas que la hacen útil en composiciones inmunogénicas. En algunas formas, una forma truncada o sustituida, o fragmento de ORF2 se utiliza como el componente antigénico en la composición. Preferiblemente, tales formas truncada o sustituida, o fragmentos comprenderán al menos 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótido ORF2 de longitud completa, por ejemplo,

la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, las formas truncada o sustituida, o fragmentos tendrán al menos 30, más preferiblemente al menos 45, y aún más preferiblemente al menos 57 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótido ORF2 de longitud completa, por ejemplo, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.

"Identidad de secuencia" como es conocida en la técnica se refiere a la relación entre dos o más secuencias de polipéptido o dos o más secuencias de polinucleótido, a saber una secuencia de referencia y una secuencia dada para ser comparada con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina al comparar la secuencia dada a la secuencia de referencia después de que las secuencias se han alineado para producir el grado más alto de similitud de secuencia, como se determinó mediante la coincidencia entre cuerdas de tales secuencias. Luego del alineamiento, la identidad de secuencia se descubre sobre una base posición por posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" a una posición particular si en esa posición, los nucleótidos o los residuos de aminoácido son idénticos. El número total de tales identidades de posición es luego dividido por el número total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para dar la identidad de secuencia porcentual. La identidad de secuencia puede ser fácilmente calculada mediante métodos conocidos, incluyendo pero no limitados a, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987) Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM

J. Applied Math., 48: 1073 (1988), cuyas enseñanzas se encontraron aquí como referencia. Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia se designan para dar la coincidencia mayor entre las frecuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia se codifican en programas de computadora públicamente disponibles que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Ejemplos de tales programas incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programa GCG (Devereux, J., et. al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTM y FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990). El programa BLASTX está públicamente disponible de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S.F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia). Estos programas alinean de manera óptima las secuencias los pesos de los espacios por defecto con el fin de producir el nivel más alto de la identidad de secuencia entre las secuencias dadas y de referencia. Como una ilustración, mediante un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido que tiene al menos, por ejemplo, 85%, preferiblemente 90%, o más preferiblemente 95% "de identidad de secuencia", a la secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótido del polinucleótido dado sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido dada pueda incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, aún más preferiblemente hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótido de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tiene una secuencia que tiene una secuencia de nucleótido que tiene al menos 85%, preferiblemente 90%, aún más preferiblemente 95% de identidad con relación a la secuencia de nucleótido de referencia, hasta el 15%, preferiblemente 10%, o más preferiblemente 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir con otro nucleótido, o con un número de nucleótidos de hasta 15%, preferiblemente 10%,

aún más preferiblemente 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótido de referencia o en cualquier otra parte entre aquellas

5 posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos con la secuencia de referencia. De manera análoga, mediante un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido dada que tiene al menos, por ejemplo, 85%, preferiblemente 90%, aún más preferiblemente 95% de identidad de secuencia con una secuencia de

10 aminoácido de referencia, se pretende que la secuencia de aminoácido dada del polipéptido sea idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia del polipéptido dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, aún más preferiblemente hasta 5 alteraciones de aminoácido por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácido de referencia. En otras palabras, para obtener una

15 secuencia de polipéptido dada que tenga al menos 85%, preferiblemente 90%, aún más preferiblemente 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de referencia, hasta 15%, preferiblemente hasta 10%, aún más preferiblemente hasta 5% de los residuos de aminoácido en la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir con otro aminoácido o con un número de

20 aminoácido de hasta 15%, preferiblemente hasta 10%, aún más preferiblemente hasta 5% del número total del número total de residuos de aminoácido en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales amino o carboxi de la secuencia de aminoácido de referencia o en

25 cualquier otra parte en donde aquellas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente, las

posiciones del residuo que no son idénticas difieren mediante las sustituciones de aminoácido conservador. Sin embargo, las constituciones conservadoras no están incluidas como una coincidencia cuando se determina la identidad de secuencia.

5 "Homología de secuencia", como se utiliza aquí, se refiere a un método para determinar las relaciones de las dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, dos o más secuencias son óptimamente alineadas, y los espacios son introducidos si es necesario. Sin embargo, como contraste con la "identidad de secuencia", las sustituciones de aminoácido conservadoras se

10 cuentan como una coincidencia cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o un polinucleótido que tiene 95% de homología de secuencia con una secuencia de referencia, 85%, preferiblemente 90%, aún más preferiblemente 95% de los residuos de aminoácido o los nucleótidos en la secuencia de referencia deben coincidir o

15 comprender una sustitución conservadora con otro aminoácido o nucleótido, o un número de aminoácidos nucleótidos, hasta el 15%, preferiblemente hasta el 10%, aún más preferiblemente hasta el 5% de los residuos de aminoácido totales o nucleótidos, no incluyendo las sustituciones conservadoras en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Preferiblemente, la

20 secuencia homóloga comprende al menos un tramo de 50, aún más preferiblemente de 100, aún más preferiblemente de 250, aún más preferiblemente de 500 nucleótidos.

Una "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución de un residuo de

25 aminoácido o nucleótido con otro residuo de aminoácido o nucleótido que tiene características similares o propiedades que incluyen tamaño, hidrofobicidad, etc., de tal forma que la funcionalidad total no cambia significativamente.

“Aislado” significa alterado “por la mano del hombre” desde su estado natural, es decir, si ésta ocurre en la naturaleza, y se ha cambiado o removido desde su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido naturalmente presente en el organismo vivo no es “aislado”, sino el mismo polinucleótido o polipéptido separado del material coexistente de su estado natural es “aislado” como el término es empleado aquí.

Así, un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con una composición inmunogénica efectiva para disminuir la severidad de los síntomas clínicos asociados con la infección PCV2 que comprende la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, la proteína ORF2 de PCV2 es una cualquiera de aquellas, descrita anteriormente. Preferiblemente, dicha proteína ORF2 de PCV2 es:

i) Un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11;

ii) Cualquier polipéptido que es al menos 80% homologó con el polipéptido de i),

iii) Cualquier porción inmunogénica del polipéptido de i) y/o ii)

iv) La presión inmunogénica de iii), que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos incluidos en las secuencias de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

v) El polipéptido que es codificado por un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4,

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

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

viii) La porción inmunogénica de vii) en donde el polinucleótido codificado por dicha porción inmunogénica comprende al menos 30 nucleótidos contiguos incluidos en las secuencias de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.

Preferiblemente cualquiera de aquellas porciones inmunogénicas que tienen las características inmunogénicas de la proteína ORF2 de PCV2 que es codificada por la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con un aspecto adicional, la proteína ORF2 de PCV2 se suministra en la composición inmunológica a un nivel de inclusión de antígeno efectiva para inducir la respuesta inmune deseada, a saber reducir la incidencia de o la disminución de la severidad de los signos clínicos que resultan de la infección PCV2. Preferiblemente, el nivel de inclusión de la proteína ORF2 de PCV2 es al menos 0.2 µg de antígeno/ml de la composición inmunogénica final (µg/ml), más preferiblemente desde aproximadamente 0.2 a aproximadamente 400 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.3 a aproximadamente 200 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.35 a aproximadamente 100 µg/ml, aún más preferible desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 50 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.45 a aproximadamente 30 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.6 a aproximadamente 15 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente

0.75 a aproximadamente 8 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.0 a aproximadamente 6 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.3 a aproximadamente 3.0 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.4 a aproximadamente 2.5 µg/ml, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.0 µg/ml, y más preferiblemente 1.6 µg/ml.

De acuerdo con un aspecto adicional, el nivel de inclusión de antígeno ORF2 es al menos 0.2 µg de proteína ORF2 de PCV2 como se describió anteriormente por dosis de la composición antigénica final (µg/dosis), más preferiblemente desde aproximadamente 0.2 a aproximadamente 400 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.3 a aproximadamente 200 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.35 a aproximadamente 100 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 50 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.45 a aproximadamente 30 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.6 a aproximadamente 15 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.75 a aproximadamente 8 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.0 a aproximadamente 6 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.3 a aproximadamente 3.0 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.4 a aproximadamente 2.5 µg/dosis, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.0 µg/dosis, y más preferiblemente desde aproximadamente 1.6 µg/dosis.

25

El polipéptido ORF2 de PCV2 utilizado en una composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención se puede derivar de cualquier manera

incluyendo el aislamiento y la purificación del ORF2 de PCV2, la síntesis de proteína estándar, y la metodología recombinante. Los métodos preferidos para obtener el polipéptido ORF2 de PCV2 como se describió aquí anteriormente y son también suministrados en la Solicitud de Patente U.S. Serie No. 11/034,797, cuyo contenido y enseñanzas se incorporan aquí como referencia. En resumen, las células susceptibles son infectadas con un vector vírico recombinante que contiene las secuencias codificantes de ADN del ORF2 de PCV2, el polipéptido ORF2 de PCV2 se expresa mediante el virus recombinante, y el polipéptido ORF2 de PCV2 expresado se recupera del sobrenadante mediante filtración e inactivación mediante cualquier método convencional, preferiblemente utilizando etilenimina binaria, la cual es luego neutralizada para detener el proceso de inactivación.

Así, de acuerdo a aspecto adicional la composición inmunogénica comprende i) cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en concentraciones descritas anteriormente, y ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante. Más aún, de acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica comprende i) cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, y iii) una porción del sobrenadante de cultivo de célula.

De acuerdo con una modalidad específica del proceso de producción y recuperación para la proteína ORF2 de PCV2, el sobrenadante del cultivo de célula se filtra a través de una membrana que tiene un tamaño de poro,

preferiblemente entre aproximadamente 10.45 a 1 μ m. Así, un aspecto adicional se relaciona con una composición inmunogénica que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente de un baculovirus recombinante, y iii) una porción del cultivo de célula, en donde aproximadamente el 90% del componente tiene un tamaño más pequeño de 1 μ m.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición inmunogénica que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, iii) una porción del cultivo de célula, iv) y un agente inactivante para inactivar el vector vírico recombinante preferiblemente BEI, en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tiene un tamaño más pequeño de 1 μ m. Preferiblemente, el BEI está presente en concentraciones efectivas para inactivar el baculovirus. Las concentraciones efectivas se describieron anteriormente.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición inmunogénica que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, iii) una porción del cultivo de célula, iv) un agente inactivante para inactivar el vector vírico recombinante preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la inactivación mediada mediante el agente inactivante, en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii)

tienen un tamaño más pequeño de 1 μ m, preferiblemente, si el agente inactivante es BEI, dicha composición comprende tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI.

5 El polipéptido se incorpora en una composición que se puede administrar a un animal susceptible a infección PCV2. En formas preferidas, la composición también puede incluir los componentes adicionales conocidos por aquellos expertos en la técnica (ver también Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18th e. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, la composición puede incluir uno o
10 más vehículos veterinariamente aceptables. Como se utiliza aquí, "un vehículo veterinariamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, preservativos, agentes antibacteriales y antifungosos, agentes isotónicos, agentes supresores de absorción y similares.

15

En una modalidad preferida, la composición inmunogénica comprende la proteína ORF2 de PCV2 como se suministra con ésta, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, como un componente antigénico, que se mezcla con un adyuvante, preferiblemente Carbopol, y solución salina fisiológica.

20

Aquellos expertos en la técnica entenderán que la composición aquí presente puede incorporar soluciones estériles fisiológicamente aceptables inyectables conocidas. Para preparar una solución lista para usar para inyección o infusión parenteral, las soluciones isotónicas acuosas, tales como por ejemplo las
25 soluciones salinas o las de proteína de plasma correspondiente están fácilmente disponibles. Además, las composiciones inmunogénicas y de vacuna de la presente invención pueden incluir diluyentes, agentes isotónicos, estabilizadores,

o adyuvantes. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol, y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiamintetracético, entre otros. Los adyuvantes adecuados, son aquellos descritos anteriormente. Más preferido es el uso de carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferiblemente en cantidades como se describieron anteriormente (por ejemplo de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 µg por dosis, aún más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2.5 mg por dosis, y más preferida en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

Así, la presente invención también se relaciona con una composición inmunogénica que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2 descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector vírico que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, iii) una porción del cultivo de célula, iv) un agente inactivante para inactivar el vector vírico recombinante preferiblemente BEI, y v) un agente de neutralización para detener la inactivación medida por el agente inactivante, preferiblemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; y vi) un adyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971 en las cantidades descritas anteriormente; en donde aproximadamente 90% de los componentes 1 a 3 tienen un tamaño más pequeño de 1 µm. De acuerdo a un aspecto adicional, esta composición inmunogénica comprende además una sal farmacéutica aceptable, preferiblemente una sal de fosfato en concentraciones fisiológicamente aceptables. Preferiblemente, el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a un pH fisiológico, significando desde aproximadamente 6.5 y 7.5.

Así, la presente invención también se relaciona con una composición inmunogénica que comprende por un ml i) al menos 1.6 µg de la proteína ORF2 de PCV2 descrita anteriormente, ii) al menos una porción del baculovirus que expresa dicha proteína ORF2 de PCV2, iii) una porción del cultivo de célula, iv) 5 aproximadamente 2 a 8 mM de BEI, v) tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI, y vi) aproximadamente 1 mg de Carbopol 971, y vii) sal de fosfato en una concentración fisiológicamente aceptable, en donde aproximadamente 90% de los componentes i) a iii) tienen un tamaño más pequeño de 1 µm y el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a aproximadamente 10 6.5 a 7.5.

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir adicionalmente uno o más agentes inmunomoduladores tal como, por ejemplo, interleuquinas, interferones, u otras citoquinas. Las composiciones inmunogénicas también 15 pueden incluir Gentamicina y Mertiolate. Mientras que las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención se pueden determinar fácilmente por el experto en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 2000 µg de adyuvante y 20 preferiblemente aproximadamente 250 µg/ml de dosis de la composición de vacuna. En otra modalidad preferida, la presente invención contempla composiciones de vacuna que comprenden de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibióticos.

25

Así, la presente invención también se relaciona con una composición inmunogénica que comprende i) cualquiera de las proteínas ORF2 de PCV2

descritas anteriormente, preferiblemente en las concentraciones descritas anteriormente, **ii)** al menos una porción de vector vírico que expresan dicha proteína ORF2 de PCV2, **iii)** una porción del cultivo celular, **iv)** un agente de inactivación para inactivar el vector vírico recombinante preferiblemente BEI, y **v)** un agente de neutralización para detener la inactivación mediada por el agente de inactivación, preferiblemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a BEI; **vi)** un adyuvante adecuado, preferiblemente Carbopol 971 en las cantidades descritas anteriormente; **vii)** una concentración farmacéuticamente aceptable de un amortiguador de salina, preferiblemente de una sal de fosfato, y **viii)** un agente activo anti-microbiológico; en donde aproximadamente el 90% de los componentes i) a iii) tienen a tamaño menor de 1 μ m.

Se ha encontrado sorprendentemente, que la composición inmunogénica suministrada aquí comprende una alta estabilidad durante un periodo de 24 meses. También se ha encontrado que las composiciones inmunogénicas suministradas aquí, comprenden proteína ORF2 de PCV2 expresada de baculovirus, recombinante como se suministra aquí es muy efectiva en reducción de los síntomas clínicos asociados con Infecciones PCV2. Se ha encontrado sorprendentemente, que las composiciones inmunogénicas que comprenden la proteína ORF2 de PCV2 expresada por baculovirus recombinante como se suministra aquí, es más efectiva que la composición inmunogénica que comprende el virus PCV2 completo en una forma inactiva, o antígeno ORF2 de PCV2 vírico aislado. En particular, se ha encontrado sorprendentemente, que la proteína ORF2 de PCV2 expresada por baculovirus recombinante es efectiva en muy bajas concentraciones, lo que significa en concentraciones hasta 0.25 μ g/dosis. Este alto potencial inmunogénico inesperado de la proteína ORF2 de PCV2 se puede incrementar adicionalmente al agregar Carbopol.

Un aspecto adicional se relaciona con un contenedor que comprende al menos una dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 de PCV2 como se suministra aquí, en donde una dosis comprende al menos 2 µg de la proteína ORF2 de PCV2, preferiblemente 2 a 16 µg de la proteína ORF2 de PCV2. Dicho contenedor puede comprender 1 a 250 dosis de la composición inmunogénica, preferiblemente contiene 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, o 250 dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente, cada uno de los contenedores que comprende más de una dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 de PCV2 comprende adicionalmente un agente activo anti-microbiológico. Aquellos agentes son por ejemplo antibióticos que incluyen Gentamicina y Mertiolate y similares. Así, un aspecto de la presente invención se relaciona con un contenedor que comprende 1 a 250 dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 de PCV2, en donde una dosis comprende al menos 2 µg de proteína ORF2 de PCV2, y Gentamicina y/o Mertiolate, preferiblemente de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml.

Un aspecto adicional se relaciona con un kit, que comprende cualquiera de los contenedores, descritos anteriormente, y un manual de instrucciones, que incluyen la información para la aplicación intramuscular de al menos una dosis de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 de PCV2 en cerditos para reducir la severidad de los síntomas clínicos asociados con la infección PCV2. Más aún, de acuerdo con un aspecto adicional, dicho manual de instrucciones comprende la información de una segunda administración adicional de al menos una dosis de la composición inmunogénica del ORF2 de PCV2, en donde en la

segunda administración o cualquier administración adicional va al menos 14 días más allá de la inicial o cualquier administración anterior. Preferiblemente, dicha manual de instrucciones también incluye la información, para administrar un inmunoestimulador. Preferiblemente, dicho inmunoestimulador se debe dar al menos dos veces. Preferiblemente, al menos 3, más preferiblemente al menos 5, aún más preferiblemente al menos 7 días están entre la primera y segunda de cualquier administración adicional del inmunoestimulador. Preferiblemente, el inmunoestimulador se da al menos 10 días, preferiblemente 15, aún más preferiblemente 20, aún más preferiblemente al menos 22 días más allá de la administración inicial de la composición inmunogénica de la proteína ORF2 de PCV2. Un inmunoestimulador preferido es por ejemplo la hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), todavía emulsificada preferiblemente con un adyuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA). Sin embargo, se entiende aquí, que cualquier otro inmunoestimulador conocido por una persona experta en la técnica puede también se puede utilizar. Como se utiliza aquí "Inmunoestimulador", significa cualquier agente o composición que puede accionar la respuesta inmune, preferiblemente sin iniciar o incrementar una respuesta inmune específica, por ejemplo la respuesta inmune contra un patógeno específico. Se dan instrucciones adicionales para administrar el inmunoestimulador en una dosis adecuada. Más aún, el kit también puede comprende un contenedor, que incluye al menos una dosis del inmunoestimulador, preferiblemente una dosis de KLH, o KLH/ICFA.

Más aún, también se ha encontrado sorprendentemente que el potencial inmunogénico de las composiciones inmunogénicas que comprenden la proteína ORF2 de PCV2 expresada de baculovirus recombinante, preferiblemente en combinación con Carbopol, se puede mejorar adicionalmente por la administración de la vacuna IngelVac PRRS MLV (ver Ejemplo 5). Los síntomas clínicos del

PCV2 y las manifestaciones de la enfermedad se magnifican grandemente cuando está presente la infección PRRS. Sin embargo, las composiciones inmunogénicas y las estrategias de vacunación como se suministran aquí reducen este efecto grandemente, y más de lo esperado. En otras palabras, se observa un efecto

5 sinérgico inesperado cuando se tratan animales, preferiblemente cerdos con cualquiera de las composiciones inmunogénicas ORF2 de PCV2, como se suministra aquí, y la vacuna Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Así, un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con un kit como se describió anteriormente, que comprende la composición inmunogénica del ORF2

10 de PCV2 como se suministra aquí y el manual de instrucción, en donde el manual de instrucción incluye adicionalmente la información para administrar la composición inmunogénica ORF2 de PCV2 junto con composiciones inmunogénicas que comprenden el antígeno PRRS, preferiblemente el antígeno PRRS adyuvante. Preferiblemente, el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV

15 (Boehringer Ingelheim).

Un aspecto adicional de la presente invención también se relaciona con un kit que comprende i) un contenedor que contiene al menos una dosis de una composición inmunogénica de ORF2 de PCV2 como se suministra aquí, y ii) un

20 contenedor que contiene una composición inmunogénica que comprende el antígeno PRRS, preferiblemente antígeno PRRS con adyuvante. Preferiblemente el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Más preferiblemente, el kit comprende adicionalmente un manual de instrucciones, que incluyen la información para administrar ambas composiciones farmacéuticas.

25 Preferiblemente, este contiene la información que la composición que contiene ORF2 de PCV2 se administra temporalmente antes de la composición que contiene PRRS.

Un aspecto adicional, se relaciona con el uso de cualquiera de las composiciones suministradas aquí como un medicamento, preferiblemente como a medicamento veterinario, aún más preferido como una vacuna. Más aún, la presente invención también se relaciona con el uso de cualquiera de las composiciones descritas aquí, para la preparación de un medicamento para reducir la severidad de síntomas clínicos asociados con Infección PCV2. Preferiblemente, el medicamento es para la prevención de una infección PCV2, aún más preferiblemente en cerditos.

Un aspecto adicional se relaciona con un método para (i) la prevención de una infección, o reinfección con PCV2 o (ii) la reducción o eliminación de síntomas clínicos originados por el PCV2 en un sujeto, que comprende administrar cualquiera de las composiciones inmunogénicas suministradas aquí a un sujeto en necesidad de este. Preferiblemente, el sujeto es un cerdo. Preferiblemente, la composición inmunogénica se administra intramuscular. Preferiblemente, una dosis o dos dosis de la composición inmunogénica es/son administradas, en donde una dosis preferiblemente comprende al menos aproximadamente 2 μ g de proteína ORF2 de PCV2, aún más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 16 μ g, y al menos aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 mg Carbopol, preferiblemente aproximadamente 1 mg Carbopol. Un aspecto adicional se relaciona con el método para tratamiento como se describió anteriormente, en donde una segunda aplicación de la composición inmunogénica se administra. Preferiblemente, la segunda administración se hace con la misma composición inmunogénica, preferiblemente que tiene la misma cantidad de la proteína ORF2 de PCV2. Preferiblemente la segunda administración también se da intramuscular. Preferiblemente, la segunda administración se hace al menos 14

días más allá de la administración inicial, aún más preferiblemente al menos 4 semanas más allá de la administración inicial.

De acuerdo con un aspecto adicional, el método de tratamiento también
5 comprende la administración de un inmunoestimulador. Preferiblemente, dicho inmunoestimulador es se administra al menos dos veces. Preferiblemente, al menos 3, más preferiblemente al menos 5 días, aún más preferiblemente al menos 7 días están entre la primera y la segunda administración del inmunoestimulador. Preferiblemente, el inmunoestimulador es se administra al menos 10 días,
10 preferiblemente 15, aún más preferiblemente 20, aún más preferiblemente al menos 22 días después de la administración inicial de la composición inmunogénica ORF2 de PCV2. Un inmunoestimulador preferido es por ejemplo la hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), todavía preferiblemente emulsificada con el adyuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA). Sin embargo, se entiende
15 aquí, que cualquier otro inmunoestimulador conocido por una persona experta en la técnica también se puede utilizar. Esta dentro del conocimiento general de una persona experta en la técnica administrar el inmunoestimulador en una dosis adecuada.

20 De acuerdo con un aspecto adicional, el método de tratamiento descrito anteriormente también comprende la administración del antígeno PRRS. Preferiblemente el antígeno PRRS es IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Preferiblemente, dicho antígeno PRRS se administra temporalmente después de la administración de la composición inmunogénica de la proteína
25 ORF2 de PCV2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama de flujo esquemático de una construcción preferida del baculovirus recombinante ORF2 de PCV2; y

5

La Fig. 2a y 2b son un diagrama de flujo esquemático de cómo producir una composición de acuerdo con la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

10

Los siguientes ejemplos establecen los procedimientos y materiales preferidos de acuerdo con la presente invención. Se entiende, sin embargo, que estos ejemplos solo se suministran por vía de ilustración, y no se deben considerar aquí como una limitación del alcance general de la invención.

15

EJEMPLO 1

20

25

Este ejemplo compara el rendimiento relativo del ORF2 utilizando los métodos de la presente invención con métodos que se conocen en la técnica anterior. Cuatro frascos de agitación de 1000 mL de cada uno se siembran con aproximadamente 1.0×10^6 Sf+ células/ml en 300 mL de medio libre de suero de insecto, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). El cultivo celular maestro se identifica como Linaje de Célula Maestra (*Spodoptera frugiperda*) SF+, pasaje 19, Lote#N112-095W. Las células utilizadas para generar el Linaje de Célula Maestra SF+ se obtiene de Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. La línea de células SF+ para este ejemplo se confina entre los pasajes 19 y 59. Otros pasajes trabajarán para propósitos de la presente invención, pero en con el fin de

aumentar proporcionalmente el proceso para producción a gran escala, al menos 19 pasajes probablemente serán necesarios y pasajes más allá de 59 pueden tienen un efecto sobre la expresión, aunque esto no se investigó. En más detalle, los cultivos de células SF+ iniciales a partir de almacenaje en nitrógeno líquido se hacen crecer en medio Excell 420 en suspensión en frascos de agitación estéril con agitación constante. Los cultivos se hacen crecer en 100 mL en frascos de agitación de 250 mL con 25 a 150 mL de medio libre de suero Excell 420. Cuando las células se han multiplicado a una densidad celular de $1.0 - 8.0 \times 10^6$ células/mL, ellas se dividen en nuevos frascos con densidad de $0.5 - 1.5 \times 10^6$ células/mL. Los cultivos de expansión posterior se hacen crecer en frascos de agitación de hasta 36 litros de tamaño o en bioreactores de acero inoxidable de hasta 300 litros durante un periodo de 2-7 días a $25 - 29^\circ \text{C}$.

Después de sembrar, los frascos se incuban a 27°C durante cuatro horas.

Posteriormente, cada frasco se siembra con un baculovirus recombinantes que contiene el gen ORF2 de PCV2 (SEQ ID NO: 4). El baculovirus recombinante que contienen el gen ORF2 de PCV2 se genera como sigue: el gen ORF2 de PCV2 de la cepa Norte Americana del PCV2 se amplifica con PCR para que contenga una secuencia de Kozak 5' (SEQ ID NO: 1) y un sitio EcoR1 3' (SEQ ID NO: 2), clonado en el vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Luego, se corta posteriormente y subclona en el vector de transferencia pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). La porción subclonada se representa aquí como SEQ ID NO: 7. El plásmido pVL1392 que contiene el gen ORF2 de PCV2 se designa N47-064Y y luego se co-transfecta con ADN del baculovirus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) dentro de células de infecto Sf+ (Protein Sciences, Meriden, CT) para generar el baculovirus recombinante que contiene el gen ORF2 de PCV2. La nueva construcción se suministra aquí como la SEQ ID NO: 8. El

5 baculovirus recombinante que contiene el gen ORF2 de PCV2 se purifica con placa y el Virus de Semilla Maestro (MSV) se propaga en la línea celular SF+, se divide en alícuotas, y se almacena a -70° C. El MSV se identifica positivamente como el ORF2 de PCV2 por PCR-RFLP utilizando cebadores específicos de baculovirus. Las células de insectos infectadas con el baculovirus ORF2 de PCV2 para generar MSV o Virus de Semilla de Trabajo (expresan el antígeno ORF2 de PCV2 como detectado por el suero policlonal o anticuerpos monoclonales en un ensayo de anticuerpo de fluorescencia indirecta. Adicionalmente, la identidad del baculovirus ORF2 de PCV2 se confirma mediante por secuenciamiento de amino

10 ácido N-terminal. El baculovirus ORF2 de PCV2 MSV también se prueba para pureza de acuerdo con el 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28, y 113.55. Cada baculovirus recombinante se siembra en frascos de agitación tienen multiplicidades variantes de infección (MOI). El frasco 1 se siembra con 7.52mL de .088 MOI; el frasco 2 se siembra con 3.01mL de 0.36 MOI; el frasco 3 se siembra con 1.5 mL de 0.18 MOI; y el frasco 4 se siembra con 0.75mL de 0.09 MOI. Un diagrama de flujo esquemático que ilustra las etapas básicas utilizadas para construir un baculovirus recombinante ORF2 de PCV2 se suministra aquí como en la Figura 1.

Después de ser sembrado con el baculovirus, los frascos se incuban luego

20 a $27 \pm 2^{\circ}$ C durante 7 días y también se agita a 100 rpm durante ese tiempo. Los frascos utilizan tapas ventiladas para permitir el flujo de aire. Las muestras de cada frasco se toman cada 24 horas durante los siguientes 7 días. Después de extracción, cada muestra se centrifuga, y los gránulos y el sobrenadante se separan y luego se microfiltra a través de una membrana de 0.45-1.0 μ m de

25 tamaño de poro.

Las muestras resultantes tienen luego la cantidad de ORF2 presente dentro de ellas cuantificada por vía de un ensayo ELISA. El ensayo ELISA se conduce con captura de anticuerpo de Porcino anti-PCV2 Pab IgG Prot. G purificad (diluida 1:250 en PBS) diluida a 1:6000 en 0.05M de amortiguador de Carbonato (pH 9.6).

- 5 Luego se coloca 100 μ L del anticuerpo en los pozos de la placa de microtítulo, se sella, e incuban durante la noche a 37° C. La placa se daba luego tres veces con una solución de lavado que comprende 0.5mL de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100mL de 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) y 899.5mL de agua destilada. Posteriormente, 250 μ L de una solución de bloqueo (5g de leche seca
- 10 baja en grasa Carnation (Nestle, Glendale, CA) en 10mL de D-PBS QS a 100mL con agua destilada) se agrega a cada uno de los pozos. La siguiente etapa es lavar la placa de prueba y luego agregar antígeno pre-diluido. El antígeno pre-diluido se produce al agregar 200 μ L de solución diluyente (0.5mL Tween 20 en 999.5mL D-PBS) a cada uno de los pozos en una placa de dilución. La muestra
- 15 luego se diluye en una proporción 1:240 y una proporción 1:480, y 100 μ L de cada una de estas muestras diluidas se agrega luego a uno de los pozos superiores en la placa de dilución (es decir un pozo superior recibe 100 μ L de dilución 1:240 y el otro recibe 100 μ L de dilución 1:480). Las diluciones en serie se hacen luego para el restante de la placa al remover 100 de cada pozo sucesivo y transferir al
- 20 siguiente pozo sobre la placa. Cada pozo se mezcla antes de hacer la siguiente transferencia. El lavado de la placa de ensayo incluye lavar la placa tres veces con el amortiguador de lavado. La placa luego se sella e incuba durante una hora a 37° C antes de ser lavado tres veces más con el amortiguador de lavado. El anticuerpo de detección utilizado es anticuerpo monoclonal para PCV ORF2. Este
- 25 se diluye a 1:300 en solución diluyente, y 100 μ L del anticuerpo de detección diluido se agrega luego a los pozos, La placa luego se sella e incuba durante una hora a 37° C antes de ser lavada con el amortiguador de lavado. Luego se prepara

#A
65.

diluyente conjugado al agregar suero de conejo normal (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a la solución diluyente a concentración del 1%. Se diluye anticuerpo conjugado anti-ratón de Cabra (H+1)-HRP (Jackson ImmunoResearch) en el diluyente conjugado a 1:10,000. 100 µL del anticuerpo conjugado diluido se
5 agrega luego a cada uno de los pozos. La placa luego se sella e incuba durante 45 minutos a 37° C antes de ser lavada tres veces con el amortiguador de lavado. 100 µL del sustrato (Sustrato de Peroxidasa TMB, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), se mezcla con volumen igual de Sustrato de Peroxidasa B (KPL) se agrega a cada uno de los pozos. La placa se incuba a
10 temperatura ambiente durante 15 minutos. 100 µL de solución HCL 1N se agrega luego a todos los pozos para detener la reacción. La placa se corre luego a través de un lector ELISA. Los resultados de este ensayo se suministran en la Tabla 1 adelante:

15

Tabla 1

Día	Frasco	ORF2 en glóbulo (µg)	ORF2 en sobrenadante (µg)
3	1	47.53	12
3	2	57.46	22
3	3	53.44	14
3	4	58.64	12
4	1	43.01	44
4	2	65.61	62
4	3	70.56	32
4	4	64.97	24
5	1	31.74	100
5	2	34.93	142
5	3	47.84	90
5	4	55.14	86
6	1	14.7	158
6	2	18.13	182

6	3	34.78	140
6	4	36.88	146
7	1	6.54	176
7	2	12.09	190
7	3	15.84	158
7	4	15.19	152

Esos resultados indican que cuando el tiempo de incubaciones extiende, la expresión del OPRF2 dentro del sobrenadante de las células centrifugadas y el medio es mayor que la expresión en el glóbulo de las células centrifugadas y el medio. De acuerdo con esto, permitir la expresión ORF2 para proceder durante al menos 5 días y recuperarlo en el sobrenadante a diferencia de permitir la expresión para proceder durante menos de 5 días y recuperar el ORF2 de las células, suministra un mayor incremento en la producción de ORF2, y una mejora significativa sobre los métodos anteriores.

EJEMPLO 2

Este ejemplo suministra datos para la eficacia de la invención reivindicada aquí. Se siembra un frasco de agitación de 1000 mL con aproximadamente 1.0×10^6 Sf+ células/ml en 300 mL de medio Excell 420. El frasco luego se incuba a 27° C y se agita a 100 rpm. Posteriormente, el frasco se siembra con 10 mL de ORF2 de PCV2/Bac p+6 (el baculovirus recombinante que contiene el gen ORF2 de PCV2 que pasa 6 veces adicionales en las células de insecto Sf9) semilla de virus con un MOI de 0.1 después de 24 horas de incubación.

El frasco luego se incuba a 27° C durante un total de 6 días. Después de incubación, el frasco se centrifuga luego y tres muestras del sobrenadante

28
67.

resultante se cosechan e inactivan. El sobrenadante se inactiva al llevar su temperatura a $37 \pm 2^\circ \text{C}$. Para la primer muestra, una solución de 0.4M de bromohidrato de 2-bromoetileneamina que se ha ciclizado a etilenimina binaria 0.2M (BEI) en 0.3N de NaOH se agrega al sobrenadante para dar una

5 concentración final de BEI de 5mM. Para la segunda muestra, se agrega 10mM de BEI al sobrenadante. Para la tercera muestra, no se agrega BEI al sobrenadante. Las muestras se agitan luego continuamente durante 48 hrs. Una solución de tiosulfato de sodio 1.0 M para dar una concentración mínima final de 5 mM se agrega para neutralizar cualquier BEI residual. La cantidad de ORF2 en cada

10 muestra se cuantifica luego utilizando el mismo procedimiento de ensayo ELISA como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados de esto se pueden ver en la Tabla 2 adelante:

Tabla 2

Muestra	ORF2 en sobrenadante (µg)
1	78.71
2	68.75
3	83.33

Este ejemplo demuestra que la neutralización BEI no remueve o degrada cantidades significativas del producto de proteína ORF2 de PCV2 recombinante. Esto se evidencia por el hecho de que no hay pérdida mayor de ORF2 en el

20 sobrenadante del BEI o temperaturas elevadas. Aquellos expertos en la técnica reconocerán que el ORF2 recuperado es un producto de proteína estable.

80
68

EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra que la presente invención es escalable a partir de producción a pequeña escala de ORF2 de PCV2 recombinante para producción a gran escala ORF2 de PCV2 recombinante. 5.0 x 10⁵ células/ml de SF+ células/ml en 7000mL de medio ExCell 420 se colocan en un Bioreactor Applikon 20000 mL. El medio y las células se incuban luego a 27° C y se agitan a 100RPM por las siguientes 68 horas. En la hora 68, 41.3mL de baculovirus ORF2 de PCV2 MSV+3 se agrega a 7000mL de medio ExCell 420. La mezcla resultante se agrega luego al bioreactor. Para los siguientes siete días, la mezcla se incuba a 27° C y se agita a 100RPM. Las muestras del bioreactor se extraen cada 24 horas iniciando en el Día 4, post-infección, y cada muestra se centrifuga. El sobrenadante de las muestras se preserva y luego la cantidad de ORF2 se cuantifica luego utilizando densitometría SDS-PAGE. Los resultados de estos se pueden ver en la Tabla 3 adelante.

Tabla 3

Día después de la infección:	ORF2 en sobrenadante (µg/mL)
4	29.33
5	41.33
6	31.33
7	60.67

EJEMPLO 4

Este ejemplo prueba la eficacia de siete vacunas candidato PCV2 y define adicionalmente los parámetros de eficacia siguiendo la exposición a una cepa

84
69

virulenta del PCV2. Ciento ocho (108) cerditos desprovistos de calostro derivado de cesárea (CDCD), de 9-14 días de edad, se dividen aleatoriamente en 9 grupos de igual tamaño. La tabla 4 establece el diseño de estudio general para este ejemplo.

5

TABLA 4 Diseño de Estudio General

Grupo	Número de cerdos	Tratamiento	Día de tratamiento	KLH/ICF En el Día 21 y Día 27	Inoculado con PVC2 en el Día 24	Necropsia en el Día 49
1	12	Vacuna PCV2 No. 1 (vORF2 16 mg)	0	+	+	+
2	12	PCV2 –vacuna –No. 2 (vORF2 8 mg)	0	+	+	+
3	12	PCV2 No. 3 (vORF2 4 mg)	0	+	+	+
4	12	PCV2 vacuna No. 4 (vORF2 16 mg)	0	+	+	+
5	12	PCV2 vacuna No. 5 (vORF2 8 mg)	0	+	+	+
6	12	PCV2 vacuna No. 6 (vORF2 4 mg)	0	+	+	+
7	12	PCV2 vacuna No. 7 (célula completamente muerta por virus)	0	+	+	+
8	12	Sin controles de inoculación	N/A	+	+	+
9	12	Son grupo de control negativo estricto	N/A	+	-	+

vORF2= ORF2 vírico aislado; rORF2 expresado por báculo virus recombinante; célula completamente muerta por virus = PCV2 virus que crece en cultivo celular adecuado.

10

Siete de los grupos (grupos 1-7) reciben de dosis de polipéptido ORF2 de PCV2, uno de los grupos actúa como un control de inoculación y no recibe ORF2 de PCV2, y el otro grupo actúa como el grupo de control negativo estricto y

tampoco recibe PCV2 u ORF2. En el día cero los grupos 1 a 7 se tratan con vacunas asignadas. Los cerditos en el Grupo 7 se les da un tratamiento de refuerzo en el Día 14. Los cerditos se observan para eventos adversos y reacciones en el sitio de inyección luego de vacunación en el Día 19, los cerditos se mueven al segundo sitio de estudio. En el segundo sitio de estudio, los grupos 1-8 se alojan en un edificio mientras el grupo 9 se aloja en un edificio separado. Todos los cerdos reciben adyuvante de Freund incompleto (ICFA)/hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) en el Día 21 y 27 y en el Día 24, los grupos 1 y 8 se inoculan con PCV2 virulento.

Se recolectan muestras sanguíneas pre y post-inoculación para serología PCV2. Post-inoculación, los datos de peso corporal para determinación del promedio diario de peso ganado (ADEG), y los síntomas clínicos, así como también muestras de exudado nasal para determinar el desprendimiento nasal de PCV2, se recolecta. En el Día 49 todos los cerdos sobrevivientes se les practica necropsia, los pulmones se clasifican por lesión y el tejido se preserva en formalina para ensayo de inmunohistoquímica (IHC) en una fecha posterior.

Métodos y Materiales

Este es un estudio de factibilidad de inoculación - vacunación parcialmente cegada conducida en cerdos CDCD, de 9 a 14 días de edad en el día 0. Para ser incluido en el estudio, los títulos PCV2 IFA de cerdas es $\leq 1:1000$. Adicionalmente, el estado serológico de las cerdas es de una manda PRRS- negativa conocida. Veintiocho (28) cerdas se prueban para ensayo serológico PCV2. Catorce (14) cerdas tienen un título PCV2 de ≤ 1000 y se transfieren al primer sitio de estudio. Ciento diez (110) cerditos se suministran por cirugía en sección de cesárea y

están disponibles para este estudio en el Día 4. En el Día 3, 108 cerditos CDCD en el primer sitio de estudios se pesan, se identifican con etiquetas de oreja, y se bloquea el peso y se asigna aleatoriamente a los grupos 1 de 9, como se estableció anteriormente en la Tabla 4. Si cualquier animal de ensayo que cumpla en criterio de inclusión se enrola en el estudio y se excluye después por cualquier razón, se consulta al investigador y monitor con el fin de determinar el uso de los datos recolectados del animal en el análisis final. Los datos de que cerditos enrolados se excluyen y la razón para la exclusión se documenta. Inicialmente, no se excluyen cerdas. Un total de 108 de 110 cerdos disponibles de se asignan aleatoriamente a 1 de 9 grupos en el Día 3. Los 2 cerditos más pequeños (Número 17 y 19) no se asigna a un grupo y son disponibles como extras, si es necesario. Durante el curso del estudio, se remueven varios animales. El cerdo 82 (Grupo 9) en el Día 1, cerdo 56 (Grupo 6) en el Día 3, cerdo 53 (Grupo 9) en el Día 4, cerdo 28 (Grupo 8), cerdo 69 (Grupo 8) en el Día 7, y cerdo 93 (Grupo 4) en el día 9, se encuentran muertos antes de inoculación. Estos 6 cerdos no se incluyen en los resultados del estudio final. El cerdo número 17 (uno de los cerdos extras) se asigna al grupo 9. El restante cerdo extra numero 19 se excluye del estudio.

Las formulaciones dadas para cada uno de los grupos es como sigue: el

Grupo 1 se diseña para administrar 1ml de ORF2 vírico (vORF2) que contiene 16 μg ORF2/ml. Esto se hace al mezclar 10.24 ml de ORF2 vírico ($256 \mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 10.24 \text{ ml VORF2}$) con 3.2 ml de 0.5% Carbopol y 2.56 ml de salina amortiguada con fosfato en un pH de 7.4. Esto produce 16 ml de la formulación para el Grupo 1. El Grupo 2 se diseña para administrar un ml de vORF2 que contiene 8 μg de vORF2/ml. Esto se hace al mezclar 5.12 ml de vORF2 ($128 \mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 5.12 \text{ ml vORF2}$) con 3.2 ml de 0.5 Carbopol y 7.68 ml de salina amortiguada con fosfato en un pH de 7.4. Esto produce 16 ml de formulación para el Grupo 2. El Grupo 3 se

diseña para administrar 1 ml de vORF2 que contiene 4 µg vORF2/ml. Esto se hace la mezclar 2.56 ml de vORF2 ($64 \mu\text{g}/25 \mu\text{g/ml} = 2.56 \text{ ml vORF2}$) con 3.2 ml de 0.5% Carbopol y 10.24 ml de salina amortiguada con fosfato en un pH de 7.4. Esto produce 16 ml de de formulación para el Grupo 3. El Grupo 4 se diseña para

5 administrar 1 ml de ORF2 recombinante (rORF2) que contiene 16 µg de rORF2/ml. Esto se hace al mezclar 2.23ml de rORF2 ($512 \text{ grupo } \mu\text{g}/230 \mu\text{g/ml} = 2.23 \text{ ml rORF2}$) con 6.4 ml de 0.5% Carbopol y 23.37 ml de salina amortiguada con fosfato en un pH de 7.4. Esto produce 32 ml de formulación para cada grupo. El Grupo 5 se diseña para administrar 1ml de rORF2 que contiene 8 µg de rORF2/ml. Esto se

10 hace al mezclar 1.11ml de rORF2 ($256 \mu\text{g}/230 \mu\text{g/ml} = 1.11 \text{ ml de rORF2}$) con 6.4 ml de 0.5% Carbopol y 24, 49 ml de salina amortiguada con fosfato en un pH de 7.4. Esto produce 32 ml de formulación para el Grupo 5. El Grupo 6 se diseña para administrar 1ml de rORF2 que contiene 8 µg de rORF2/ml. Esto se hace al mezclar 0.56 ml de rORF2 ($128 \mu\text{g}/230 \mu\text{g/ml} = 0.56 \text{ ml rORF2}$) con 6.4 ml de 0.5

15 % Carbopol y 25.04 ml de salina amortiguada con fosfato en un pH de 7.4. Esto produce 32 ml de formulación para el Grupo 6. El Grupo 7 se diseña para administrar 2 ml de vacuna de célula muerta PCV2 completa (PCV2 KV) que contiene el PCV2 KV MAX. Esto se hace al mezclar 56ml de PCV2KV con 14 ml de 0.5% Carbopol. Esto produce 70 ml de formulación para el Grupo 7. finalmente

20 el Grupo 8 se diseña para administrar KLH en 0.5 µg /ml o 1.0µg/ml por dosis de 2 ml. Esto se hace al mezclar 40.71ml KLH ($7.0 \mu\text{g proteina/ml a } 0.5 \mu\text{g /ml} = 570 \text{ ml } (7.0 \mu\text{g /ml}) (x) = (0.5(570))$), 244.29 ml de salina amortiguada con fosfato en un pH de 7.4, y 285 ml de adyuvante de Freund. La Tabla 5 describe los cuadros de tiempo para las actividades claves de este ejemplo.

Tabla 5 actividades de estudio

Día de estudio	Actividad de estudio
-4.0 a 49	Observaciones generales para síntomas clínicos y de salud general
-3	Pesado; aleatorizado para los grupos;
0	Muestras sanguíneas recolectadas de todos los cerdos
0-7	Examen de salud; IVP administrada Números 1-7 a grupos 1-7, respectivamente
14	Cerdos observados para reacciones de sitios de inyección Grupo 7 reforzado con vacuna PCV2 Número 7, muestras sanguíneas de todos los cerdos
14-21	Grupo 7 observado para reacciones ne sitio de inyección
16-19	Todos los cerdos tratados con antibióticos (datos perdidos)
19	Cerdos transportados del primer sitio de ensayo al segundo sitio de ensayo
21	Grupo 1-9 tratados con KLH/IFCA
24	muestras de exudado nasal y sangre recolectadas de todos los cerdos; todos los cerdos pesados; grupos 1-8 inoculados con material de inoculación PCV2
27,27,29,31,33,35,37,39,41,43,45,47	Muestras de exudado nasal recolectado de todos los cerdos
27	Grupos 1-9 tratados con KLH/ICFA
31	Muestras sanguíneas recolectadas de todos los cerdos
49	Muestras de exudado nasal y sangre de recolectadse de todos los cerdos; todos los cerdos pesados; se practica

	necropsia a todos los cerdos; lesiones brutas notadas con énfasis en úlceras gástricas e ictericia; se evalúan los pulmones para lesiones; se conservan muestras de tejido fresco y se fijan en formalina; fase en vivo del estudio del estudio terminada
--	---

Luego de la terminación de la fase en vivo del estudio, los tejidos fijos en formalina se examinan mediante inmunohistoquímica (IHC) para detección del antígeno PCV2 por un patólogo, las muestras sanguíneas se evalúan para serología PCV2, muestras de exudado nasal para desprendimiento PCV2, y ganancia de peso promedio diario (ADWG) se determina del Día 24 al Día 49.

Los animales se alojan en el primer sitio de estudio en jaula individuales en cuartos desde el nacimiento a aproximadamente 11 días de edad (aproximadamente día 0 del estudio). Cada habitación es idéntica en diseño y consiste de jaulas de acero inoxidable individuales apiladas con suministro de aire filtrado y calentado por separado por cada unidad de aislamiento. Cada habitación tiene ventilación y calefacción separada, evitando por lo tanto la contaminación cruzada de aire entre cuartos. Los animales se alojan en 2 construcciones diferentes en el segundo sitios de estudio. El grupo 9 (Grupo de control negativo Estricto) se aloja de forma separada en un edificio de terminado convertido y los grupos 1 y 8 se alojan en un edificio convertido en criadero. Cada grupo se aloja en un corral separado (11- 12 cerdos por corral) y cada corral provisto aproximadamente de 3.0 pies cuadrados por cerdo. Cada corral esta en una cubierta elevada con pisos de rejilla. Un hoyo por debajo de los corrales sirve como un tanque de almacenamiento para excremento y desperdicios. Cada

construcción tiene su propio sistema de ventilación y calefacción separado, con probablemente poca contaminación cruzada de aire entre construcciones.

En el primer sitio de estudio, los cerditos se alimentan con una ración de
5 leche especialmente formulada desde el nacimiento hasta aproximadamente 3
semanas de edad. Todos los cerditos, consumen sólidos, especialmente la ración
mezclada al Día 19 (aproximadamente 4 semanas y media de edad). En el
segundo sitio de estudio todos los cerditos se alimentan de una ración de mezcla
comercial no medicada habitual, apropiada para su edad y peso, *ad libitum*. El
10 agua en ambos sitios de estudio también estuvo disponible *ad libitum*.

Todos los cerdos del ensayo se tratan con vitamina E en el Día 2, con
inyecciones de hierro en el Día 1 y con NAXCEL® (1.0 ml. IM, en miembros
alternos) en los días 16, 17, 18 y 19. en adicción, el cerdo numero 52 (Grupo 9) se
15 trata con una inyección de hierro en el Día 3, el cerdo 45 (del Grupo 6) se trata con
una inyección de hierro en el Día 11, el cerdo numero 69 (grupo 8) se trata con
NAXCEL® en el día 6, el cerdo numero 74 (Grupo 3) se trata con dexametasona y
penicilina en el Día 14, y el cerdo 51 (Grupo 1) se trata con dexametasona y
penicilina en el Día 13 y con NAXCEL® en el Día 14 por varias razones de salud.

20

Mientras en ambos sitios de estudio, los cerdos están bajo cuidado
veterinario. Los exámenes de salud animal se conducen en el día 0 y se registran
en el Formulario de Registro de Examen de Salud. Todos los animales están en
buen estado nutricional y de salud antes de la vacunación, según se determina por
25 la observación en el día 0. Todos los animales de ensayo se observan por estar en
buena salud y nutricional antes de inoculación. Las carcasas y tejidos se desechan
por representación.

La disposición final de los animales de estudio se registra en el Registro de Desechos Animales.

- 5 En el día 0 los cerdos asignados los grupos 1,-6, reciben 1.0 ml de vacunas PCV2 1-6, respectivamente, y M en la región de la nuca izquierda utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 ml estéril y una aguja de 20g x ½ ".los cerdos asignados al Grupo 7 reciben 2.0 ml de vacuna PCV2 numero 7 IM, en la región de la nuca izquierda utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 m y una aguja estéril de 20g X ½".
- 10 En el Día 14, los cerdos asignados al grupo asignado 7 reciben 2.0 ml de vacuna PCV2 número 7 IM en la región derecha de la nuca utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 ml estéril y una aguja 20g x 1/2" estéril.

- En el Día 21 todos los cerdos de ensayo reciben 2.0 ml de KLH/ICFA IM, en
- 15 la región de la extremidad derecha utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 ml estéril y una aguja de 20g x 1" estéril. En el Día 27 todos los cerdos de ensayo reciben 2.0 ml de KLH/ ICFA en la región del miembro izquierdo utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 ml estero y una aguja de 20g x1" estéril.

- 20 En el Día 24, los cerdos asignados a los grupos 1 y 8 reciben 1.0 ml de material de inoculación PCV2 ISUDVDL (5.11 log₁₀ TCID₅₀ / mL) IM en la región izquierda de la nuca utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 mL estéril y una aguja 20 g x 1" estéril. 1.0 mL adicional del mismo material se administra IN a cada cerdo (0.5 MI por fosa nasal) utilizando una jeringa Luer-lok de 3.0 mL estéril y
- 25 cánula nasal.

Los cerdos de ensayo se observan diariamente durante los eventos adversos y de salud general en el Día 4 y del día 0 al Día 19. se registra observaciones en el Registro de Observaciones Clínico. Todos los cerdos de ensayo se observan del día 0 al Día 7, y del Grupo 7 se observa adicionalmente del Día 14 al Día 21, para reacciones de sitio de inyección. La ganancia promedio de peso diario se determina al pesar cada cerdo en una escala calibrada en días - 3.24 y 49, o en el día en que se encuentra un cerdo muerto después de inoculación. El peso corporal registra en el Formulario de Peso Corporal. Se utilizan los pesos corporales del Día 3 para bloquear cerdos antes de aleatorización. El Día 24 y Día 49 los datos de peso se utilizan para determinar la ganancia de peso promedio diario (ADWG) para cada cerdo durante estos puntos de tiempo. Para los cerdos que mueren después de inoculación y antes del Día 49, se ajusta el ADWG para representar el ADWG del Día 24 al día de la muerte.

Con el fin de determinar la serología PCV2, se recolecta sangre completa venosa de cada cerdito del seno de la vena orbital, en el Día 3 y 14. para cada cerdito se recolecta sangre del seno de la vena orbital al insertar un tubo capilar estéril dentro en el lagrimal medio de uno de los ojos y drenar aproximadamente 3.0mL de sangre completa dentro de un tubo Separador de Suero de 4.0 mL (SST). En los días 24, 31, 49, la sangre completa venosa de cada cerdo se recolectada de la vena cava anterior utilizando una aguja Vacutainer de 18g x 1/2" (Becton Dickinson and company, Franklon Lakes, New Jersey), un soporte para aguja Vacutainer y un SST de 13 mL. Las recolecciones de sangre en cada punto de tiempo se registran en el Registro de Recolección de Muestras. La sangre en cada SST se le permite coagular, cada SST se hace girar hacia abajo y se cosecha el suero. El suero cosechado se transfiere a un tubo estéril y se almacena

a $-70 \pm 10^{\circ}$ C hasta que se prueba en una fecha posterior. Las muestras de suero se prueban para la presencia de anticuerpos PCV2 por personal BIVI-R&D.

Se observan los cerdos una vez al día del Día 20 al 49 para síntomas
5 clínicos y se registran las observaciones clínicas en el Registro de Observaciones
Clínicas para ensayar el desprendimiento nasal PCV2, los días , 24, 25, y luego
cada numero impar de día de estudio hasta e incluyendo el Día 49, se inserta un
hisopo de dacrón estéril intranasalmente dentro de la fosa nasal izquierda o
derecha de cada cerdo (un hisopo o por cerdo) tan asépticamente como sea
10 posible, movido durante unos pocos segundos y luego removido. Cada hisopo se
coloca dentro de un tubo con tapa estéril que contiene 1.0 mL de medio EMEM
con 2% IFBS, 500 unidades/ mL de penicilina, 500 μ g /mL de estreptomicina y 2.5
 μ g/mL de fungizona. El hisopo se rompe en el tubo y el tubo se sella y se marca
apropiadamente con el número del animal, en número de estudio, fecha de
15 recolección, día de estudio e "hisopo nasal". Los tubos sellados se almacenan a -
 $40 \pm 10^{\circ}$ C hasta que se transporta durante la noche en hielo a BIVI-st Joseph. Las
recolecciones de hisopo nasal se registran en el Formulario de Recolección de
Muestra de Hisopo Nasal. BIVI-R&D conduce ensayo de aislamiento de virus (VI)
cuantitativo para PCV2, en muestras de hisopo nasal. Los resultados se expresan
20 en valores $\log_{10}$. Un valor de 1.3 log o menos se considera negativo y cualquier
valor mayor de 1.3 log se considera positivo.

Los cerdos que mueren (Números 28, 52, 56, 69, 82, y 93) en el primer sitio
de estudio se les practica necropsia al nivel necesario para determinar un
25 diagnóstico. Las lesiones brutas se registran y no se retiene tejido de esos cerdos.
En el segundo sitio de estudio, los cerdos que mueren antes del Día 49 (45, 23,
58, 35), los cerdos que se encuentran muertos en el Día 49 antes de eutanasia (2,

43) y los cerdos que se les practica eutanasia en el Día 49 se les practica necropsia. Cualquier lesión bruta se anota y los porcentajes de lóbulos pulmonares con lesiones se registran en el Formulario de Reporte de Necropsia.

5 Para cada uno de los 103 cerdos que se les practica necropsia en el segundo sitio de estudio, una muestra de tejido de amígdala, pulmón, corazón, hígado nodo linfático mesentérico, riñón y nodo linfático inguinal se coloca en un contenedor sencillo con 10% de formalina amortiguada; mientras otra mezcla de
10 tejido de los mismo órganos mencionados anterior mente se coloca en un whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., thelwall, UK) y cada Whirl-pak se coloca en hielo. Cada recipiente se etiqueta apropiadamente. Se registra las recolecciones de muestra en el Formulario de Reporte de Necropsia. Después de eso, las muestras de tejido fijas en formalina y el formulario de solicitud de diagnostico se presentan para prueba IHC. La prueba IHC se conduce de acuerdo con los procedimientos
15 de laboratorio ISU estándar para recepción de muestra, la muestra y la preparación de porta objetos, y técnicas de teñido. Los tejidos frescos en Whirl-paks se empacan con paquetes de hielo para el Estudio de Monitoreo Para almacenamiento ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ}$ 10) posible uso futuro. Los tejidos fijos en formalina se examinan por un patólogo para detección de PCV2 por IHC y se clasifican
20 utilizando el siguiente sistema de clasificación: 0=1; 1= teñido positivo Scant, pocos sitios; 2= teñido positivo moderado, múltiple sitios; y 3= teñido positivo abundante, difuso a través del tejido. Debido al hecho de que el patólogo no puede diferenciare positivamente el LN inguinal del LN mesentérico, los resultados de estos tejidos se etiquetan simplemente como nodo linfático y la clasificación dio la
25 clasificación más alta para cada uno de los 2 tejidos por animal.

98
80

Resultados

Los resultados para este ejemplo se dan adelante. Es de notar que un cerdo del grupo 9 muere antes del día 0 y 5 cinco cerdos más mueren post-vacunación (un cerdo del Grupo 4; un cerdo del Grupo 6; dos cerdos del Grupo 8; y un cerdo del grupo 9). El examen post-mortem, indica que todos los 6 murieron debido a infecciones subyacentes que no se asociaron con la vacunación o PMWS. Adicionalmente, no se notaron eventos adversos o reacciones al sitio de inyección con ningún grupo.

10

Los resultados de ganancia de peso promedio diario (ADWG) se presentan adelante y en la tabla 6. el Grupo 6, el grupo de control negativo estricto, tiene el ADWG mayor (1.06 ± 0.17 lbs/día) , seguido por el Grupo 5 (0.94 ± 0.22 lbs/día), que recibe una dosis de 8 mg de rORF2. El Grupo 3, que recibe una dosis de 4 mg vORF2, tiene el ADWG más bajo (0.49 ± 0.21 lbs/día), seguido por el Grupo 7 (0.50 ± 0.15 lbs/día), que recibe 2 dosis de vacuna muerta.

15

Tabla 6. Resumen de ganancia de peso diaria promedio de grupo (ADWG)

Grupo	Tratamiento	N	ADWG – lbs/día (del día 24 al día 49) o ajustado para cerdos muertos antes del día 29
1	vORF-16mg (1 dosis)	12	0.87 ± 0.29 lbs/día
2	vORF-8 mg (1 dosis)	12	0.70 ± 0.32 lbs/día
3	vORF- 4mg (1 dosis)	12	0.49 ± 0.21 lbs/día
4	rORF- 16mg (1 dosis)	11	0.84 ± 0.30 lbs/día
5	rORF- 8 mg (1 dosis)	12	0.94 ± 0.22 lbs/ día
6	rORF- 4 mg(1 dosis)	11	0.72 ± 0.25 lbs/día
7	KV (2 dosis)	12	0.50 ± 0.15 lbs/día

8	Controles de inoculación	10	0.76±0.19 lbs/día
9	Controles Negativos Estrictos	11	1.06±0.17 lbs/día

vORF-2= ORF-2 vírico aislado; rORF2=expresado por baculovirus recombinante;
virus de célula completa muerto= virus PCV2 que crece en cultivo celular
adecuado.

5 Los resultados de la serología PCV2 se presentan adelante en la tabla 7.
Todos los 9 grupos son cero negativos para PCV2 en el Día 3, en el Día 14, los
grupos reciben vacunas vORF-2 que tienen los mayores títulos que varían de
187.5 a 529.2. Los cerdos que reciben vacuna viral muerta tienen los siguientes
títulos más altos, seguidos por los grupos que reciben vacunas rORF-2. Los
10 grupos 8 y 9 permanecen cero negativos en este tiempo. En el Día 24 y el Día 31
los cerdos reciben vacunas vORF-2 que continúan demostrando una fuerte
respuesta serológica, seguido cercanamente por el grupo que recibe 2 dosis de
una vacuna viral muerta. Los cerdos que reciben vacuas rORF-2 son más lentos
para responder serológicamente y los grupos 8 y 9 continúan permaneciendo cero
15 negativos. En el Día 49 los cerdos que reciben vacuna vORF-2, 2 dosis de vacuna
vírica muerta y la dosis más baja de rORF-2 demuestran las respuestas
serológicas más fuertes. Los cerdos que reciben 16 mg y 18 mg de vacunas
rORF-2 tiene títulos IFA ligeramente mayor que los controles de inoculación. El
grupo 9 en el Día 49 demuestra una respuesta serológica fuerte.

20

Tabla 7. Resumen de títulos PCV2 IFA de grupo

PROMEDIO DE TÍTULO IFA

Grupo	Tratamiento	Día-3	Día 14	Día 24	Día 31	Día 49
1	vORF- 16mg (1 dosis)	50.0	529.2	4400.0	7866.7	11054.5
2	vORF- 8mg(1 dosis)	50.0	500.0	3466.7	6800.0	10181.8

3	vORF-4mg(1 dosis)	50.0	187.5	1133.3	5733.3	9333.3
4	rORF-16mg(1 dosis)	50.0	95.5	1550.0	3090.9	8000.0
5	rORF-8mg(1 dosis)8mg(1 dosis)	50.0	75.0	887.5	2266.7	7416.7
6	rORF-4mg (1 dosis)	50.0	50.0	550.0	3118.2	10570.0
7	KV (2 dosis)	50.0	204.2	3087.5	4620.8	8680.0
8	Controles de inoculación	50.0	55.0	50.0	50.0	5433.3
9	Controles negativos estrictos	50.0	59.1	59.1	54.5	6136.4

vORF-2= ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; virus de célula completa muerta = virus PCV”2 que crece en cultivo celular adecuado.

* para propósitos de calculo, un título IFA símbolo ≤ 100 se designa como un título de “50”; un título IFA $\geq$ de 6400 se designa como un título de “12800”.

* * Día de inoculación

*** Día de Necropsia.

Los resultados de las observaciones clínicas post-inoculación, representan adelante en la tabla 8. Este resumen de resultados incluye observaciones para Comportamiento Anormal, Respiración anormal, Tos y Diarrea. La tabla 9 incluye los resultados del resumen de incidencia general de grupo de Síntomas Clínicos y la tabla 10 incluye los resultados del resumen de tasa de mortalidad de grupo post-inoculación. El síntoma clínico más común anotado en este estudio es el comportamiento anormal, que se clasifica como letargia suave a severa. Los cerdos que reciben las 2 dosis más bajas de vORF2, cerdos que reciben 16 mg de rORF2 y cerdos que reciben 2 dosis vacuna KV tiene tasas de incidencia de $\geq 27.3\%$. Los cerdos que reciben 8 mg de rORF2 y el grupo de control negativo estricto no tienen comportamiento anormal. Ninguno de los cerdos en este estudio demostró ninguna respiración anormal. La tos se notó en todos los grupos (0 a

25%), la diarrea (0-20%). Ninguno de los síntomas clínicos anotados fueron patogenómicos para PMWS.

La incidencia para los síntomas clínicos varían en 3 grupos. Los grupos que reciben cualquiera de las vacunas vORF2, el grupo que recibe 16 µg de rORF2, el grupo que recibe 2 dosis de vacuna KV y el grupo de control de inoculación tienen la incidencia más alta de síntomas clínicos generales, (≥36.4%). El grupo de control negativo estricto, el grupo que recibe 8 µg de rORF2 y el grupo que recibe 4 µg de rORF2 tienen tasas de incidencia general de síntomas clínicos de 0%, 8.3% y 9.1%, respectivamente.

Las tasas de mortalidad general entre grupos también varían. El grupo que recibe 2 dosis de vacuna KV tiene la tasa de mortalidad más alta (16.7%); mientras que los grupos que reciben 4 µg de vORF2, 16 µg rORF2, u 8 µg de rORF2 y el grupo de control negativo estricto todos tienen 0% de tasa de mortalidad.

Tabla 8. Resumen de observaciones de grupo para comportamiento anormal, respiración anormal, tos y diarrea

- Grupo	Tratamiento	N	Comportamiento anormal ¹	Comportamiento anormal ²	Tos ³	Diarrea ⁴
1	vORF2- 16µg (1 dosis)	12	2/12 (16.7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16.7%)
2	vORF2- 8 µg (1 dosis)	12	4/12 (33.3%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	1/12 (8.3%)
3	vORF2- 4µg (1 dosis)	12	4/12 (33.3%)	0/12 (0%)	2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)
4	rORF2- 16µg (1 dosis)	11	3/11 (27.3%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2/11 (18.2%)
5	rORF2- 8µg (1 dosis)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	0/12 (0%)

86
84

6	rORF- 4µg (1 dosis)	11	1/11 (9.1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 dosis)	12	7/12 (58.3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)
8	Controles de inoculación	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	Controles estrictos negativos	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 virico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; virus de célula completa muerto = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado

5 ¹ Número total de cerdos en cada grupo que demuestra cualquier comportamiento anormal durante al menos 1 día

² Número total de cerdos en cada grupo que demuestra cualquier respiración anormal durante al menos un día

10

³ Número total de cerdos en cada grupo que demuestra una tos durante al menos un día

⁴ Número total de cerdos en cada grupo que demuestra diarrea durante al menos 1
15 día

Tabla 9. Resumen de incidencia general de grupo de síntomas clínicos

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con síntomas clínicos	Tasa de incidencia
1	vORF2-16µg (1 dosis)	12	5	41.7%
2	vORF2-8 µg (1 dosis)	12	5	41.7%
3	vORF2-4µg (1 dosis)	12	8	66.7%
4	rORF2 16µg (1	11	4	36.4%

	dosis)			
5	rORF2 8µg (1 dosis)	12	1	8.3%
6	rORF2 4µg (1 dosis)	11	1	9.1%
7	KV (2 dosis)	12	7	58.3%
8	Controles de inoculación	10	4	40%
9	Controles estrictos negativos	11	0	0%

vORF2= ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; virus de célula completa muerto = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

5 ¹ Numero total de cerdos en cada grupo que demuestra cualquier síntoma clínico durante al menos un día

Tabla 10 resumen de tasa de Mortalidad de Grupo Post-Inoculación

Grupo	Tratamiento	N	Muerte post-inoculación	Tasa de mortalidad
1	vORF2—16 µg (1 dosis)	12	1	8.3%
2	vORF2—8µg (1 dosis)	12	1	8.3%
3	vORF2- 4µg (1 dosis)	12	0	0%
4	rORF2 16 µg (1 dosis)	11	0	0%
5	rORF2 8µg (1 dosis)	12	0	0%
6	rORF2-4µg (1 dosis)	11	1	9.1%
7	KV (2 dosis)	12	2	16.7%
8	controles de inecuación	10	1	10%
9	controles estrictos negativos	11	0	0%

10 vORF2- = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

Los resultados de desprendimiento nasal se presentan adelante en la tabla 11. Luego de inoculación en el Día 24, un cerdo en el Grupo 7 empieza a desprender PCV2 en el Día 27. Ninguno de los otros grupos experimenta desprendimiento hasta el Día 33. La masa de desprendimiento nasal se nota del Día 35 al 45. los grupo que reciben cualquiera de las 3 vacunas vORF2- y los grupos que reciben 4 u 8 µg de rORF2 tienen la incidencia más baja de desprendimiento nasal de PCV2 ($\leq 9.1\%$). El grupo de control de inoculación (Grupo 8) tiene la tasa de desprendimiento más alta (80%), seguido por el grupo de control negativo o estricto (Grupo 9), que tiene una tasa de incidencia de 63.6%.

Tabla 11 resumen de incidencia de grupo de desprendimiento nasal de PCV2

Grupo	Tratamiento	N	Número de cerdos que desprenden por lo menos durante un día	Tasa de incidencia
1	vORF2—16 µg (1 dosis)	12	1	8.3%
2	vORF2—8µg (1 dosis)	12	1	8.3%
3	vORF2- 4µg (1 dosis)	12	1	8.3%
4	rORF2 16 µg (1 dosis)	11	2	18.2%
5	rORF2 8µg (1 dosis)	12	1	8.3%
6	rORF2 4µg (1 dosis)	11	1	9.1%
7	KV (2 dosis)	12	5	41.7%
8	controles de inoculación	10	8	80%
9	Controles Negativos	11	7	63.6%

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

El Resumen de Incidencia de Ictericia de Grupo, Incidencia de Úlceras Gástricas de Grupo, Clasificación de Lesiones de Pulmón Medio de Grupo, y Incidencia de Lesiones de Pulmón de Grupo se muestran adelante en la Tabla 12.

5 Seis cerdos mueren en el primer sitio de ensayo durante la fase de post-vacunación del estudio (Grupo 4, N=1; Grupo 6, N=1; Grupo 8, N=2; Grupo 9, N=2). Cuatro de los seis cerdos tienen lesiones fibrinales en una o más cavidades corporales, un cerdo (Grupo 6) tiene lesiones consistentes con enfermedad de clostridios, y un cerdo (Grupo 9) no tiene lesiones brutas. Ninguno de los cerdos
10 que murieron durante la fase post-vacunación del estudio tuvo lesiones consistentes con PMWS

Los cerdos que mueren post-inoculación y los cerdos que e les practica eutanasia en el Día 49 se necropsian. En la necroscopia las úlceras gástricas e
15 ictericia no están presentes en ningún grupo. Con respecto al % medio de lesiones pulmonares, el Grupo 9 tiene el % medio más bajo de lesiones pulmonares (0%), seguido por el Grupo 1 con $0.40 \pm 0.50\%$ y el Grupo 5 con $0.68 \pm 1.15\%$. Los Grupos 2, 3, 7 y 8 tienen el % medio más alto de lesiones de pulmonares ($\geq 7.27\%$). Cada uno de estos cuatro grupos contiene un cerdo con % de lesiones
20 pulmonares $\geq 71.5\%$, que sesga los resultados mayores de estos cuatro grupos. Con la excepción del Grupo 9 con 0% de lesiones pulmonares anotadas, los restantes 8 grupos tienen $\leq 36\%$ de lesiones pulmonares. Casi todas las lesiones pulmonares anotadas se describen como rojas/púrpuras y consolidadas.

25 **Tabla 12. Resumen de Incidencia de Ictericia de Grupo, Incidencia de Úlceras Gástricas de Grupo, % medio de Clasificación de Lesión Pulmonar de Grupo, e Incidencia de Lesiones Pulmonares de Grupo Anotadas**

Grupo	Tratamiento	Ictericia	Úlceras Gástricas	% Medio de Lesiones Pulmonares	Incidencia de Lesiones Pulmonares Anotadas
1	vORF2 - 16µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0.40 ± 0.50%	10/12 (83%)
2	vORF2 - 8µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7.41± 20.2%	10/12 (83%)
3	vORF2 - 4µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	9.20± 20.9%	10/12 (83%)
4	rORF2 - 16µg (1 dosis)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	1.5 ± 4.74%	4/11 (36%)
5	rORF2 - 8µg (1 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0.68 ± 1.15%	9/12 (75%)
6	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2.95± 5.12%	7/11 (64%)
7	KV (2 dosis)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7.27 ± 22.9%	9/12 (75%)
8	Controles de Inoculación	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9.88± 29.2%	8/10 (80%)
9	Controles Negativos Estrictos	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

5

El Resumen de los Resultados de Incidencia Positivos de Grupo IHC se muestra en la Tabla 13. El Grupo 1 (vORF2 - 16 µg) y el Grupo 5 (rORF2 - 8 µg) tiene la tasa más baja de resultados IHC positivos (16.7%). El Grupo 8 (Controles de Inoculación) y el Grupo 9 (Controles Negativos Estrictos) tiene la tasa más alta de resultados positivos IHC, 90% y 90.9%, respectivamente.

10

Tabla 13. Resumen de tasa de Incidencia Positiva IHC de Grupo

Grupo	Tratamiento	N	No. de cerdos que tienen al menos un tejido positivo para PCV2	Tasa de Incidencia
1	vORF2 - 16µg (1 dosis)	12	2	16.7%
2	vORF2 - 8µg (1 dosis)	12	3	25.0%
3	vORF2 - 4µg (1 dosis)	12	8	66.7%
4	rORF2 - 16µg (1 dosis)	11	4	36.3%
5	rORF2 - 8µg (1 dosis)	12	2	16.7%
6	rORF2 - 4µg (1 dosis)	11	4	36.4%
7	KV (2 dosis)	12	5	41.7%
8	Controles de Inoculación	10	9	90.0%
9	Controles Negativos Estrictos	11	10	90.9%

1418
89.

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

5 Post-inoculación, el Grupo 5, que recibe una dosis de 8 µg de antígeno rORF2, desarrolla los otros 6 grupos de vacuna. El Grupo 5 tiene el ADWG más alto (0.94 ± 0.22 lbs/día), la incidencia más baja de comportamiento anormal (0%), la segunda incidencia más baja de tos (8.3%), la incidencia más baja de síntomas clínicos generales (8.3%), la tasa de mortalidad más baja (0%), la tasa de desprendimiento nasal de PCV2 (8.3%), la segunda tasa más baja para % medio de lesiones pulmonares ($0.68 \pm 1.15\%$) y la tasa de incidencia más baja para tejidos positivos (16.7%). Los Grupos que reciben varios niveles de antígeno rORF2 sobre los grupos que reciben varios niveles de vORF2 y el grupo que recibe dos dosis de vacunas PCV2 de célula completa muerta desarrollan tienen el

10

15 peor desempeño. Las Tablas 14 y 15 contienen resúmenes de los datos de post-inoculación de grupo.

Tabla 14. Resumen Datos de Post-Inoculación por Grupo - Parte 1

Grupo	N	Tratamiento	ADWG (lbs/día)	Comportamiento Anormal	Tos	Incidencia General de Síntomas Clínicos
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	0.87 ± 0.29	2/12 (16.7%)	3/12 (25%)	41.7%
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	0.70 ± 0.32	4/12 (33.3%)	1/12 (8.3%)	41.7%
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	0.49 ± 0.21	8/12 (66.7%)	2/12 (16.7%)	66.7%
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dosis)	0.84 ± 0.30	3/11 (27.3%)	0/11 (0%)	36.4%
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	0.94 ± 0.22	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	8.3%
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	0.72 ± 0.25	1/11 (9.1%)	0/11 (0%)	9.1%
7	12	KV (2 dosis)	$0.50 \pm$	7/12 (58.3)	0/12	58.3%

182
90

			0.15		(0%)	
8	10	Controles de Inoculación	0.76± 0.19	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40%
9	11	Controles Negativos Estrictos	1.06 ± 0.17	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0%

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

5 **Tabla 15. Resumen Datos Post-Inoculación por Grupo - Parte 2**

Grupo	N	Tratamiento	Tasa de Mortalidad	Desprendimiento Nasal	% Medio de Lesiones Pulmonares	Tasa de Incidencia de al menos un tejido IHC positivo para PCV2
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dosis)	8.3%	8.3%	0.40 ± 0.50%	16.7%
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dosis)	8.3%	8.3%	7.41 ± 20.2%	25.0%
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dosis)	0%	8.3%	9.20 ± 20.9%	66.7%
4.	11	rORF2 -16 µg (1 dosis)	0%	18.2%	1.50 ± 4.74%	36.3%
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dosis)	0%	8.3%	0.68 ± 1.15%	16.7%
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dosis)	9.1%	9.1%	2.95 ± 5.12%	36.4%
7	12	KV (2 dosis)	16.7%	41. 7%	7.27 ± 22.9%	41. 7%
8	10	Controles de Inoculación	10%	80%	9.88 ± 29.2%	90.0%
9	11	Controles Negativos Estrictos	0%	63.6%	0/11 (0%)	90.9%

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

10

Los resultados de este estudio indican que todos los esfuerzos de vacuna adicionales se deben enfocar en una vacuna rORF2. En general, el desprendimiento nasal de PCV2 se detecta post-inoculación y la vacunación con una vacuna PCV2 resulta en una reducción de desprendimiento. La

inmunohistoquímica de tejido linfoide seleccionado también sirve como un buen parámetro para la eficacia de vacuna, mientras que no se detectan grandes diferencias en ADWG, síntomas clínicos, y lesiones brutas. Entre los grupos este estudio se complica por el hecho de que el PCV2 extraño se introduce en algún punto durante el estudio, como evidencia del desprendimiento nasal de PCV2, seroconversión PCV2 y tejido IHC positivo en el Grupo 9, el grupo de control negativo estricto.

Discusión

Se evalúan siete vacunas PCV2 en este estudio, que incluyen tres niveles de dosis diferentes del antígeno vORF2 administrado una vez en el día 0, tres niveles de dosis diferentes del antígeno rORF2 administrados una vez en el día 0 y un nivel de dosis de vacuna PCV2 de célula completa muerta administrada en el día 0 y en el Día 14. En general, el Grupo 5, que recibe 1 dosis de la vacuna que contiene 8 µg del antígeno rORF2, tiene los mejores resultados. El Grupo 5 tiene el ADWG mayor, la incidencia más baja de comportamiento anormal, la incidencia más baja de respiración anormal, la segunda incidencia más baja de tos, la incidencia más baja de síntomas clínicos generales, la tasa de mortalidad más baja, la tasa más baja de desprendimiento nasal de PCV2, la segunda tasa más baja de % medio de lesiones pulmonares y la tasa de incidencia más baja para tejidos IHC positivos. De forma interesante, el Grupo 4, que recibe una dosis mayor de antígeno rORF2 que el Grupo 5, no se desarrolla también o mejor que el Grupo 5. El Grupo 4 tiene un ADWG ligeramente menor, una mayor incidencia de comportamiento anormal, una mayor incidencia de síntomas clínicos generales, una mayor tasa de desprendimiento nasal de PCV2, un mayor % medio de lesiones pulmonares, y una tasa mayor de tejido IHC positivo que el Grupo 5. Los

análisis estadísticos, que pueden haber indicado que las diferencias dentro de estos dos Grupos no es significativamente estadístico no se conduce sobre estos datos, pero se observa una tendencia que el Grupo 4 no desarrolla también como el Grupo 5.

5

En la post-vacunación, 6 cerdos mueren en el primer sitio de estudio. Cuatro de los seis cerdos son del Grupo 8 o Grupo 9 que no reciben vacuna. Ninguno de los seis cerdos demuestran lesiones consistentes con PMWS, sin eventos adversos se reportan y en general, todas las siete vacunas parecen ser seguras cuando se administran a los cerdos aproximadamente a 11 días de edad. Durante la fase de post-vacunación del estudio, los cerdos que reciben cualquiera de los tres niveles e dosis de la vacuna vORF2 o vacuna celular completa muerta tienen los más altos niveles IFAT, mientras el Grupo 5 tiene los niveles IFAT más bajos justo antes de inoculación, de los grupos de vacuna.

10

15

Aunque no se ha probado formalmente, la ruta predominante de transmisión del PCV2 para porcinos jóvenes brevemente después de destete se cree que es por contacto directo oronasal y una vacuna eficaz que reduce el desprendimiento nasal de PCV2 en un ajuste de producción que podría ayudar a controlar el esparcimiento de la infección. Los grupos que reciben uno de los tres niveles de antígeno vORF2 y el Grupo que recibe 8µg de rORF2 tienen la tasa de incidencia más baja de desprendimiento nasal de PCV2 (8.3%). Es de esperar, que el grupo de control de inoculación tiene la tasa de incidencia más alta de desprendimiento nasal (80%).

20

25

Las lesiones brutas en cerdos con PMWS secundario a la infección PCV2 consiste típicamente de linfadenopatía generalizada en combinación con uno o

un múltiple de los siguientes: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) ictericia o palidez cutánea, (3) hígados atróficos abigarrados, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis. En necropsia, se notan ictericia, hepatitis, nefritis, y úlceras gástricas en cualquier grupo y no se examina específicamente para linfadenopatía. El %

5 medio de clasificación de lesiones pulmonares varía entre grupos. El grupo que recibe 16 µg de antígeno vORF2 tiene el % medio más bajo de clasificación de lesión pulmonar ($0.40 \pm 0.50\%$), seguido por el grupo que recibe 8 µg de rORF2 ($0.68 \pm 1.15\%$). Como se espera, el grupo de control de inoculación tiene el % medio más alto de clasificación de lesión pulmonar ($9.88 \pm 29.2\%$). En todos los

10 cuatro grupos, el % medio de clasificación de lesión pulmonar se eleva debido a un cerdo en cada uno de estos grupos que tiene clasificaciones de lesión pulmonares muy altas. La mayoría de las lesiones pulmonares se describen como rojo/púrpura y consolidadas. Típicamente, las lesiones pulmonares asociadas con PMWS se describen como morenas y no colapsibles con edema interlobular. Las

15 lesiones pulmonares notadas en este estudio no se asocian con infección PCV2 o un segundo agente infeccioso pulmonar puede haber estado presente. Dentro del contexto de este estudio, el % clasificación de lesión pulmonar probablemente no refleja una medida verdadera de la cantidad de infección pulmonar debido al PCV2.

20

Otras investigaciones han demostrado una correlación directa entre la presencia del antígeno PCV2 por IHC e histopatología. La histopatología en tejidos selectos no se conduce con este estudio. El Grupo 1 (16µg de vORF2) y el Grupo 5 (8µg de rORF2) tiene la tasa de incidencia más baja de cerdos positivos para el

25 antígeno PCV2 (8.3%), mientras que el Grupo 9 (el grupo de control negativo estricto - 90.9%) y el Grupo 8 (el grupo de control de inoculación - 90.0%) tiene las tasas de incidencias más altas para cerdos positivo para el antígeno PCV2.

Debido a la naturaleza no subjetiva de este ensayo, los resultados IHC son probablemente uno de los mejores parámetros para juzgar la eficacia de la vacuna.

Así, en un aspecto de la presente invención, la Dosis Protectora Mínima (MPD) de un producto recombinante de dosis 1ml/l con antígeno (rORF2) ORF2 de PCV2 en el modelo de cerdo CDCD en la faz de una inoculación PCV2 se determina. De los tres grupos que reciben los niveles variantes del antígeno rORF2, el Grupo 5 (8 µg de antígeno rORF2) tiene claramente el nivel más alto de protección. El Grupo 5 tiene los mejores resultados o se vinculan para la mayoría de resultados favorables con respecto a todos los parámetros examinados. Cuando el Grupo 5 se compara con los otros seis grupos de vacuna post-inoculación, el Grupo 5 tiene el ADWG más alto (0.94 ± 0.22 lbs/día), la incidencia más baja de comportamiento anormal (0%), la segunda incidencia más baja de tos (8.3%), la incidencia más baja de síntomas clínicos generales (8.3%), la tasa de mortalidad más baja (0%), la tasa más baja de desprendimiento nasal de PCV2 (8.3%), la segunda tasa más baja para el % medio de lesiones pulmonares ($0.68 \pm 1.15\%$) y la tasa de incidencia más baja para tejidos IHC positivos (16.7%).

En otro aspecto de la presente invención, el MPD de una dosis de 1 ml/l de producto convencional que es antígeno (vORF2) ORF2 de PCV2 parcialmente purificado en el modelo de cerdo CDCD en la faz de una inoculación PCV2 se determina. De los tres grupos que reciben niveles variantes de antígeno vORF2, el Grupo 1 (16 µg de vORF2) tiene el nivel más alto de protección. El Grupo 1 supera los Grupos 2 y 3 con respecto al ADWG, el % medio de lesiones pulmonares, e IHC. Los Grupos 1 y 2 (8 µg de antígeno vORF2) se desarrollan igualmente con respecto a la incidencia general de síntomas clínicos, el Grupo 3 (4 µg de antígeno vORF2) tiene la tasa de mortalidad más baja, y todos los tres grupos se

desarrollan igualmente con respecto al desprendimiento nasal. En general, todas las vacunas vORF no se desarrollan también como las vacunas rORF.

En aún otro aspecto de la presente invención, la eficacia de una dosis máxima de una dosis de 2ml/2 de vacuna PCV2 Muerta Convencional en el modelo de cerdo CDCD en la faz de una inoculación PCV2 se determina. De las siete vacunas evaluadas en este estudio, la vacuna PCV2 de célula completa muerta es la que peor se desarrolla. Los cerditos que reciben dos dosis de vacuna PCV2 de célula completa muerta tienen el ADWG más bajo, la segunda tasa más alta de comportamiento anormal (58.3%), la segunda incidencia general más alta de síntomas clínicos (58.3%), la tasa de mortalidad más alta (16.7%), la segunda incidencia más alta de desprendimiento nasal (41.7%), el % medio más alto de lesiones pulmonares ($9.88 \pm 29.2\%$), una alta incidencia de lesiones de pulmón presentadas (75%) y una tasa de incidencia IHC moderada en tejidos (41.7%). Sin embargo, es todavía efectivo en invocar una respuesta inmune.

En todavía otro aspecto de la presente invención, el desprendimiento nasal del PCV2 se evalúa como un parámetro de eficacia y los parámetros de eficacia PCV2 previos de estudios previos se reafirman. Los resultados de este estudio indican que el desprendimiento nasal de PCV2 ocurre luego de inoculación intranasal y que las vacunas PCV2 reducen el desprendimiento nasal de post-inoculación PCV2. Adicionalmente, los resultados de este estudio y los reportes en la literatura indican que el IHC se debe continuar evaluando en el futuro para ensayos de vacuna PCV2.

25

Algunas conclusiones adicionales surgen a partir de este estudio, son que la linfadenopatía es una de las principales marcas del PMWS. Otras de las

marcas principales del PMWS es el agotamiento de linfocitos y histiocitos multinucleados/gigantes. Adicionalmente, no se notan eventos adversos o reacciones al sitio de inyección para cualquiera de las siete vacunas PCV2 y todas las 7 vacunas PCV2 parecen ser seguras cuando se administran a cerdos jóvenes.

EJEMPLO 5

Este ejemplo prueba la eficacia de ocho vacunas candidato PCV2 y reconfirma los parámetro de inoculación PCV2 de estudios de inoculación anteriores siguiendo la exposición a una cepa de PCV2. Ciento cincuenta (150) de cerditos desprovisto de calostro derivados de cesárea (CDCD), de 6-16 días de edad, se bloquean por peso y se dividen aleatoriamente en diez grupos de tamaño igual. La Tabla 16 establece el Diseño de Estudio General para este Ejemplo

Tabla 16. Diseño de Estudio General

Grupo	No. de Cerdos	Tratamiento	Día de Tratamiento	KLH/ICFA en el Día 22 y Día 28	Inoculación con PCV2 Virulento en el Día 25	PRRSV MLV en el Día 46	Necropsia en el Día 50
1	15	Vacuna PVC2 1 16µg rORF2 -IMS 1314	0& 14	+	+	+	+
2	15	Vacuna PVC2 2 16µg vORF2 - Carbopol	0& 14	+	+	+	+
3	15	Vacuna PVC2 3 16µg IrORF2 - Carbopol	0& 14	+	+	+	+
4	15	Vacuna PVC2 2 16µg vORF2 - Carbopol	0	+	+	+	+
5	15	Vacuna PVC2 3 4µg ORF2 - Carbopol	0& 14	+	+	+	+
6	15	Vacuna PVC2 3 1µg rORF2 -	0& 14	+	+	+	+

109
97

		Carbopol					
7	15	Vacuna PVC2 3 0.25µg rORF2 - Carbopol	0& 14	+	+	+	+
8	15	Vacuna PVC2 4 > 8.0 log KV - Carbopol	0& 14	+	+	+	+
9	15	Controles de Inoculación	N/A	+	+	+	+
10	15	Ninguno-Grupo de Control Negativo Estricto	N/A	+	-	+	+

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

5 La formulación de vacuna dada para cada grupo es como sigue. Vacuna PCV2 No. 1, administrada en una dosis de 1 x 2 ml para el Grupo 1, es una dosis alta (dosis de 16 ug/2 ml) de antígeno ORF2 recombinante inactivo adyuvado con IMS 1314 (16 ug rORF2 - IMS 1314). La Vacuna PCV2 No. 2, administrada en una dosis de 1 x 2 ml para el Grupo 2, es una dosis alta (dosis de 16 ug/2 ml) de un

10 VIDO R-1 parcialmente purificado generado por antígeno ORF2 de PCV2 adyuvado con Carbopol (16 ug vORF2 - Carbopol). La Vacuna PCV2 No. 3, administrada en una dosis de 1 x 2 ml a el Grupo 3, es una dosis alta (dosis de 16 ug/2 ml) de antígeno ORF2 recombinante inactivo adyuvado con Carbopol (16 ug rORF2 - Carbopol). La Vacuna PCV2 No. 4, administrada en una dosis de 1 x 1 ml

15 al Grupo 4, es una alta dosis (dosis de 16 ug/ml) de antígeno ORF2 de PCV2 generado por VIDO R-1 parcialmente purificado adyuvado con Carbopol (16 ug vORF2 - Carbopol). La Vacuna No. 5, administrada en una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 5, es una dosis de 4 ug/2 ml de un antígeno ORF2 recombinante inactivo adyuvado con Carbopol (4 ug rORF2 - Carbopol). La Vacuna PCV2 No. 6,

20 administrada en una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 6, es una dosis de 1 ug/2 ml de un antígeno ORF2 recombinante inactivo adyuvado con Carbopol (1 ug rORF2 - Carbopol). La Vacuna PCV2 No. 7, administrada en una dosis de 1 x 2 ml al Grupo

7, es una dosis baja (dosis de 0.25 ug/2 ml) de antígeno ORF2 recombinante inactivo adyuvado con Carbopol (0.25 ug rORF2 - Carbopol). La Vacuna PCV2 No. 8, administrada en una dosis de 1 x 2 ml al Grupo 8, es una alta dosis (título de pre-inactivación > de dosis 8.0 log/2 ml) de Antígeno PCV2 Struve generado por VIDO R-1 Muerto convencional Inactivo adyuvado con Carbopol (>8.0 log KV - Carbopol). En el día 0, los Grupos 1-8 se tratan con sus vacunas asignadas. Los Grupos 1-3 y 5-8 reciben refuerzos de sus respectivas vacunas de nuevo en el Día 14. La efectividad de una dosis única de 16 µg de vORF2 - Carbopol se ensaya en el Grupo 4 que no recibe un refuerzo en el Día 14. Se observan los cerditos para eventos adversos y reacciones en el sitio de inyección luego de vacunación. En el Día 21 se mueven los cerditos a un segundo sitio de estudio en donde los grupos 1-9 son grupos alojados en una construcción y el Grupo 10 se aloja en una construcción separada. Todos los cerditos reciben hemocianina de lapa de ojo de cerradura con adyuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA) en los días 22 y 28. En el Día 25, los Grupos 1-9 se inoculan con aproximadamente 4 logs de virus PCV2 virulento. En el Día 46, han ocurrido muy pocas muertes en el grupo de control de inoculación. En un intento por inmunoestimular los cerdos e incrementar la virulencia del material de inoculación PCV2, se tratan todos los grupos con INGELVAC® PRRSV MLV (Vacuna Respiratoria y Reproductiva Porcina, Virus vivo Modificado) en el Día 46.

Se recolectan muestras de sangre pre y post-inoculación para serología PCV2. La post-inoculación, los datos de peso corporal para determinación de ganancia de peso diaria promedio (ADWG) y las observaciones de los signos clínicos se recolectan. En el día 50, se le practica necropsia a los cerdos sobrevivientes, se registran las lesiones brutas, se clasifican los pulmones para patología, y se seleccionan los tejidos preservados en formalina para examen de

inmunohistoquímica (IHC) para detección de antígeno PCV2 en una fecha posterior.

Materiales y Métodos

5

Este es un estudio de factibilidad de inoculación-vacunación parcialmente cegado conducido en cerdos CDCD de 6 a 16 días de edad en el día 0. Para ser incluidos en el estudio, títulos PCV2 IFA de porcinos es $\leq 1:1000$. De acuerdo con esto, el estado serológico de los porcinos es de una manada PRRS negativa conocida. Se prueban dieciséis porcinos (16) para estado serológico PCV2 y todos los dieciséis (16) tienen un título PCV2 ≤ 1000 y se transfieren al primer sitio de estudio. Ciento cincuenta (150) cerditos se suministran por cirugía de sección cesárea y están disponibles para este estudio en el Día 3. En el Día 3, 150 CDCD en el primer sitio de estudio se pesan, se identifican con etiquetas de oreja, se bloquean por peso y se asignan aleatoriamente a uno de los diez grupos, como se estableció anteriormente en la Tabla 16. Se recolectan muestras de sangre de todos los cerdos. Si cualquier animal de ensayo cumple con el criterio de inclusión se enrola en el estudio y se excluye después por cualquier razón, el Monitor e Investigador se consulta con el fin de determinar el uso de los datos recolectados a partir de los animales en el análisis final. La fecha en la que se excluyen los cerditos enrolados y la razón de la exclusión se documentan. No se excluyen cerdos que cumplen con el criterio de inclusión, seleccionados para el estudio y transportados al primer sitio de estudio. No se excluyen cerditos del estudio y ningún animal de prueba se remueve del estudio antes de terminación la Tabla 17 describe los cuadros de tiempo para las actividades claves de este ejemplo.

10
15
20
25

Tabla 17. Actividades de Estudio

Día de Estudio	Fecha Actual	Actividad de Estudio
-3	4-04-03	Cerdos pesados; examen de salud; aleatorizado a grupos; muestras sanguíneas recolectadas
-3, 0-21	4-04-03 4-07-03 a 5-27-03	Observado para salud general y para eventos adversos post-vacunación
0	4-07-03	IVP administrado respectivo para los Grupos 1-8
0-7	4-07-03 a 4-14-03	Cerdos observados para reacciones de sitio de inyección
14	4-21-03	Grupos de Refuerzo 1-3, 5-8 con IVP respectivos; muestras sanguíneas para todos los cerdos
14-21	4-21-03 a 4-28-03	Cerdos observados para reacciones de inyección
19-21	4-26-03 a 4-28-03	Todos los cerdos tratados con antibióticos
21	4-28-03	Cerdos transportados de Struve Labs, Inc. a Veterinary Resources, Inc.(VRI)
22-50	4-28-03 a 5-27-03	Cerdos observados para signos clínicos post-inoculación
22	4-29-03	Grupos Tratados 1-10 con KLH/ICF A
25	5-02-03	Muestras sanguíneas recolectadas de todos los cerdos; todos los cerdos pesados; Grupos inoculados 1-9 con material de inoculación PCV2
28	5-05-03	Grupos Tratados 1-10 con KLH/ICF A
32	5-09-03	Muestras sanguíneas recolectadas de todos los cerdos
46	5-23-03	INGELVAC®PRRS MLV administrado a todos los grupos
50	5-27-03	Muestras sanguíneas recolectadas, pesadas y se necropsian todos los cerdos; se registran lesiones brutas; se evalúan los pulmones para lesiones; se guardan muestras de tejido frescas y fijas en formalina; se completa el estudio de fase en vida.

Luego de la terminación de la fase en vida del estudio, se examinan los tejidos fijos en formalina por inmunohistoquímica (IHC) para detección de antígeno PCV2 mediante un patólogo, las muestras sanguíneas se evalúan para serología PCV2, y el promedio de ganancia de peso diaria (ADWG) se determina del Día 25 al Día 50.

Los animales se alojan en el primer sitio de estudio en jaulas individuales en siete cuartos de nacimiento de aproximadamente 11 días de edad (aproximadamente Día 0 del estudio). Cada cuarto es idéntico en diseño y

consiste de jaulas de acero inoxidable individuales apiladas con suministro de aire filtrado y calentado separadamente par cada unidad de aislamiento. Cada cuarto tiene ventilación y calefacción separada, evitando por lo tanto la contaminación cruzada del aire entre cuartos. Los animales se alojan en dos construcciones diferentes en el segundo sitio de estudio. El Grupo 10 (El grupo de control negativo Estricto) se aoja separadamente en un edificio convertido en criadero y las Grupos 1-9 se alojan en un edificio convertido en sal de partos. Cada grupo se aoja en un corral separado (14-15 cerdos por corral) y cada corral está provisto de aproximadamente 2.3 pies cuadrados por cerdo. Los Grupos 2, 4 se colocan en corrales en tres corrales adyacentes en un lado del callejón y los Grupos 1, 3, 5, 6, 7, y 9 se colocan en seis corrales adyacentes en el otro lado del callejón. La separación del Grupo se debe al monitoreo del estudio que las vacunas administradas a los Grupos 2, 4, y 8 no se han inactivado completamente. Cada corral está en una plataforma elevada con pisos de rejilla plástica. Un agujero por debajo del corral sirve como un tanque de depósito para excrementos y desperdicios. Cada construcción tiene su propio sistema de ventilación y calefacción separado, con probablemente poca contaminación cruzada de aire entre construcciones.

En el primer sitio de estudio, los cerditos se alimentan con una ración de leche especialmente formulada de nacimiento a aproximadamente tres semanas de edad. Todos los cerditos consumen ración mezcla especial sólida hasta el Día 21 (aproximadamente 4 semanas y media de edad). En el segundo sitio de estudio, todos los cerditos se alimentan con una ración de mezcla no medicada habitual apropiada para su edad y peso, *ad libitum*. El agua en ambos estudios también estuvo disponible *ad libitum*.

Todos los cerdos de ensayo se tratan con 1.0 mL de NAXCEL®, IM, en extremidades alternadas en los Días 19, 20, y 21. En adición, el Cerdo No. 11 (Grupo 1) se trata con 0.5 mL de NAXCEL® IM en el Día 10, el Cerdo No. 13 (Grupo 10) se trata con 1 mL de Penicilina y 1 mL de PREDEF® 2X en el Día 10, el Cerdo No. 4 (Grupo 9) se trata con 1.0 mL de NAXCEL® IM en el Día 11, y los Cerdos 1 (Grupo 1), 4 y 11 cada uno se trata con 1.0 mL de NAXCEL® en el Día 14 por varias razones de salud.

En ambos sitios de estudio los cerdos están bajo cuidado veterinario. Se conducen exámenes de salud animal en el Día 3 y se registran en el Formulario de Registro de Examen de Salud. Todos los animales están en buen estado nutricional y de salud antes de la vacunación según se determina por observación en el Día 0. Todos los animales de ensayo se observan por estar en buen estado nutricional y de salud antes inoculación. Las carcasas y tejidos se disponen mediante representación. La disposición final de los animales de estudio se registran en el Registro de Disposición Animal.

En los Días 0 y 14, los cerdos asignan a los Grupos 1-3 y 5-8 que reciben 0.0 mL de Vacunas PCV2 1-4 asignadas, respectivamente, IM en la región de nuca derecha e izquierda, respectivamente, utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 mL estéril y una aguja 20 g x 1/2" estéril. Los cerdos asignados al Grupo 4 reciben 1.0 mL de Vacuna PCV2 No. 2, IM en la región de nuca derecha utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 mL estéril y una aguja 20 g x 1/2" estéril solo en el Día 0.

En el Día 22 todos los cerdos de ensayo reciben 2.0 mL de KLH/ICFA IM en la región de nuca izquierda utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 mL estéril y una aguja de 20 g x 1/2" estéril. En el Día 28 todos los cerdos de ensayo reciben 2.0

mL de KLH/ICFA en la región de miembro derecho utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 mL estéril y una aguja de 20 g x 1/2" estéril.

En el Día 25, los cerdos asignados a los Grupos 1-9 reciben 1.0 mL de material de inoculación PCV2 ISUVDL ($3.98 \log_{10}$ TCID₅₀/mL) IM en la región de nuca derecha utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 mL estéril y una aguja de 20 g x 1/2" estéril. 1.0 mL adicional del mismo material se administra IN a cada cerdo (0.5 mL por fosa nasal) utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 mL estéril y cánula nasal.

En el Día 46, todos los cerdos de ensayo reciben 2.0 mL de INGELVAC® PRRS MLV, IM, en la región de nuca derecha utilizando una jeringa Luer-lock de 3.0 mL estéril y una aguja de 20 g x 1/2" estéril. Se administra PRRSV MLV en un intento por incrementar la virulencia en el material de inoculación PCV2.

Los cerdos de ensayo se observan diariamente para la salud general y los eventos adversos en el Día 3 y desde el Día 0 al Día 21. Cada uno de los cerdos se clasifica para comportamiento normal o anormal, respiración o tos. Se registran las observaciones en el Registro de Observación Clínico. Todos los cerdos de ensayo se observan desde el Día 0 al Día 7, y el Grupo 7 se observa adicionalmente del Día 14 al 21, para reacciones del sitio de inyección. Se determina la ganancia de peso diaria promedio al pesar cada cerdo en una escala calibrada en los Días -3, 25 y 50, o en el Día en que se encuentra un cerdo muerto después de inoculación. Los pesos corporales se registran en el Formulario de Peso Corporal. Se utilizan los pesos corporales del Día 3 para bloquear cerdos antes de aleatorización. En el Día 25 y el Día 50 los datos de peso se utilizan para determinar la ganancia de peso diaria promedio (ADWG) para cada cerdo durante

estos puntos de tiempo. Para los cerdos que mueren después de inoculación y antes del Día 50, se ajusta el ADWG para representar el ADWG del Día 25 al Día de la muerte.

5 Con el fin de determinar la serología PCV2, se recolecta sangre venosa completa de cada cerdito a partir del seno venoso orbital en los Días -3 y 14. Para cada cerdito, se recolecta la sangre del seno de vena orbital al insertar un tubo capilar estéril dentro del canto medio de uno de los ojos y drenar aproximadamente 3.0 mL de la sangre completa dentro de un Tubo Separador de Suero de 4.0 mL (SST). En los Días 25, 32, y 50, la sangre venosa completa de cada cerdo se recolecta en la vena cava anterior utilizando una aguja Vacutainer® de 20 g x 1 1/2" estéril (Becton Dickinson y Company, Franklin Lakes, New Jersey), un soporte para aguja Vacutainer® y un SST de 13 mL. Las recolecciones de sangre en cada punto de tiempo se registran en el registro de

10

15 Recolección de Muestras. La sangre en cada SST se le permite coagularse, cada SST se gira hacia abajo luego y se cosecha el suero. El suero cosechado se transfiere a un tubo estéril y se almacena a $-70 \pm 10^{\circ}$ C hasta que se prueba en una fecha posterior. Las muestras de suero se prueban para la presencia de anticuerpos PCV2 por personal del BIVI-R&D

20

Los cerdos se observan una vez al día desde el Día 22 al Día 50 para síntomas clínicos y se clasifican para comportamiento normal o anormal, respiración o tos. Se registran las observaciones clínicas en el Registro de Observación Clínico.

25

Los Cerdos Nos. 46 (Grupo 1) y 98 (Grupo 9) mueren en el primer sitio de estudio. Ambas muertes se categorizan como muerte por sangrado y no se

practica necropsia a estos dos cerdos. En el segundo sitio de estudio, los cerdos que mueren después de inoculación y antes del Día 50, y los cerdos que se les practica eutanasia en el Día 50, se les practica necropsia. Se anota cualquier lesión gruesa y el porcentaje de lóbulos pulmonares con lesiones se registra en el

5 Formulario de Registro de Necropsia.

Cada uno de estos cerdos se les practica necropsia en el segundo sitio de estudio, se coloca una muestra de tejido de amígdala, pulmón, corazón, y nodo linfático mesentérico en un contenedor único con 10% de formalina amortiguada; mientras que otra muestra de tejido de los mismos órganos mencionados anteriormente se coloca en un Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK) y cada Whirl-pak® se coloca en hielo. Cada contenedor se marca apropiadamente. Se registran las recolecciones de muestra en el Formulario de Registro de Necropsia. Después de eso las muestras de tejido se fijan en formalina y el Formulario de Solicitud de Diagnóstico se presentan para prueba IHC. Se conduce una prueba IHC de acuerdo con los procedimientos de laboratorio estándar para recibir muestras, preparación de portaobjetos y muestra, y técnicas de teñido. Se empacan tejidos frescos en Whirl-paks® con paquetes de hielo al Study Monitor para almacenamiento ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ} \text{ C}$) y posible uso futuro.

20

Se examinan tejidos fijos en formalina por un patólogo para detección de PCV2 por IHC y se clasifican utilizando el siguiente sistema de clasificación: 0 = Ninguno; 1 = Teñido positivo Scant, pocos sitios; 2 = Teñido positivo moderado, múltiples sitios; y 3 = Teñido positivo abundante, difuso a través del tejido. Para propósitos analíticos una clasificación de 0 se considera "negativa" y una clasificación mayor de 0 se considera "positiva".

25

Resultados

Los resultados para este ejemplo se dan adelante. Es de notar que los Cerdos Nos. 46 y 98 mueren en los Días 14 y 25 respectivamente. Estas muertes se categorizar como muertes por sangrado. El Cerdo No. 11 (Grupo 1) jadea con respiración rápida en el Día 5. De otra forma, todos los cerdos tienen comportamiento normal para respiración y tos durante este periodo de observación y no se notan eventos adversos sistémicos con ningún grupo. No se notan reacciones en el sitio de inyección luego de la vacunación 0. Luego de la vacunación en el Día 14, siete (7) de catorce (14) de cerdos del Grupo 1 (50%) se han hinchado con una clasificación de "2" en el Día 15. Cuatro (4) de catorce (14) del Grupo 1 (28.6%) todavía tienen hinchamiento de "2" en el Día 16. Ninguno de los otros grupos experimentan reacciones en el sitio de inyección luego de vacunación.

Los resultados de ganancia de peso diario promedio (ADWG) se presentan adelante en la Tabla 18. Los Cerdos No. 46 y 98 que mueren de sangrado se excluyen de los resultados de grupo. El Grupo 4, que recibe una dosis de 16 ug vORF2 - Carbopol, tienen el ADWG más alto (1.16 ± 0.26 lbs/día), seguido por los Grupos 1, 2, 3, 5, 6, y 10 que tiene ADWGs que varía de 1.07 ± 0.23 lbs/día a 1.11 ± 0.26 lbs/día. El Grupo 9 tiene el ADWG más bajo (0.88 ± 0.29 lbs/día), seguido por los Grupos 8 y 7, que tienen ADWG de 0.93 ± 0.33 lbs/día y 0.99 ± 0.44 lbs/día, respectivamente.

107

Tabla 18. Resumen Ganancia de Peso Diaria Promedio de Grupo

Grupo	Tratamiento	N	ADWG- lbs/día (Día 25 a Día 50) o ajustado para muerte de cerdos antes del Día 50
1	2 dosis rORF2 – 16 µg - IMS 1314	14	1.08 ± 0.30 lbs/día
2	2 dosis vORF2 – 16 µg - Carbopol	15	1.11:± o.16 lbs/día
3	2 dosis rORF2 – 16 µg - Carbopol	15	1.07± 0.21 lbs/día
4	1 dosis vORF2 - 16 µg – Carbopol	15	1.16:± 0.26 lbs/día
5	1 dosis rORF2 - 4 µg – Carbopol	15	1.07 :± 0.26 lbs/día
6	2 dosis rORF2 - 1 µg – Carbopol	15	1.11 :± 0.26 lbs/día
7	2 dosis rORF2 - 0.25 µg – Carbopol	15	0.99 :± 0.44 lbs/día
8	2 Dosis KV > 8.0 log - Carbopol	15	0.93 ± 0.33 lbs/día
9	Controles de Inoculación	14	0.88 :± 0.29 lbs/día
10	Controles Negativos Estrictos	15	1.07 :± 0.23 lbs/día

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

Los resultados de la serología PVC2 se presentan adelante en la Tabla 19. Todos los diez (10) grupos son seronegativos para PCV2 en el Día 3. En el Día 14, los títulos PCV2 permanecen bajos para todos los diez (10) grupos (rango de 50-113). En el Día 25, el Grupo 8, que recibe la vacuna de virus muerto de célula completa, tienen el título PCV2 más alto (4617), seguido por el Grupo 2, que recibe 16 ug de vORF2 - Carbopol, Grupo 4, que recibe como dosis única de 16 ug de vORF2 - Carbopol, y el Grupo 3, que recibe 16 ug de rORF2 - Carbopol, que tiene títulos de 2507, 1920 y 1503 respectivamente. En el Día 32 (una semana post-inoculación), los títulos para los Grupos 1-6 y el Grupo 8 varían de 2360 a 7619; mientras los Grupos 7 (0.25 ug rORF2 - Carbopol), 9 (Control de Inoculación), y 10 (Control negativo estricto) tienen títulos de 382, 129 y 78 respectivamente. En el día 50 (día de necropsia), todos los diez (10) grupos demuestran altos títulos PCV2 (>1257).

En los Días 25, 32, y 50, el Grupo 3, que recibe dos dosis de 16 ug de rORF2 - Carbopol tienen mayores títulos de anticuerpo que el Grupo 1, que recibe dos dosis de 16 ug de rORF2 - MIS 1314. En los Días 25, 32 y 50, el Grupo 2, que recibe dos dosis de 16 ug de vORF2 y tiene títulos mayores que el Grupo 4, que solo recibe una dosis de la misma vacuna. Los Grupos 3, 5, 6, 7, que reciben niveles reducidos de rORF2 - Carbopol, de 16, 4, 1, y 0.25 ug respectivamente, demuestran títulos de anticuerpo correspondientemente reducidos en los Días 25 y 32.

Tabla 19. Resumen de Títulos PCV2 IFA de Grupo

Grupo	Tratamiento	Día -3	Día 14**	Día 25***	Día 32	Día 50****
1	2 dosis rORF2 - 16 µg-IMS 1314	50	64	646	3326	4314
2	2 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	50	110	2507	5627	4005
3	2 dosis rORF2 - 16 µg - Carbopol	50	80	1503	5120	6720
4	1 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	50	113	1920	3720	1257
5	1 dosis rORF2 - 4 µg- Carbopol	50	61	1867	3933	4533
6	2 dosis rORF2 - 1 µg- Carbopol	50	70	490	2360	5740
7	2 dosis rORF2 - 0.25 µg -Carbopol	50	73	63	382	5819
8	2 Dosis KV > 8.0 log - Carbopol	50	97	4617	7619	10817
9	Controles de Inoculación	50	53	50	129	4288
10	Controles Negativos Estrictos	50	50	50	78	11205

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerto = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

* Para propósitos de cálculo, se designa el título IFA ≤ 100 como un título de "50"; un título IFA ≥ 6400 se designa como un título de "12,800".

**Día de Inoculación

***Día de necropsia

5

Los resultados de las observaciones clínicas post-inoculación se presentan adelante. La Tabla 20 incluye observaciones para Comportamiento anormal, Respiración anormal, Tos y Diarrea. La Tabla 21 incluye los resultados del Resumen de la Incidencia general de Grupo de los Síntomas clínicos y la Tabla 22 incluye los resultados del Resumen de Tasas de Mortalidad de Grupo y Post-inoculación. La incidencia en el comportamiento anormal, la respiración y tos post-inoculación son bajos en cerdos que reciben 16 ug de rORF2-IMS 1314 (Grupo 1), 16 ug rORF2- Carbopol (Grupo 3), 1 ug rORF2-Carbopol (Grupo 6), 0.25 ug g rORF2-Carbopol (Grupo 7), y en cerdos en el grupo de control de inoculación (Grupo 9). La incidencia del comportamiento anormal respiración y tos post-inoculación es cero en cerdos que reciben 16 ug de vORF2-Carbopol (Grupo 2), una dosis única de 16ug vORF2-Carbopol (Grupo 4), 4 ug rORF2-Carbopol (Grupo 5), $>8 \log$ KV-Carbopol (Grupo 8), y en cerdos en el grupo de control negativo estricto (Grupo 10).

10
20

La incidencia general de los síntomas clínicos varía entre grupos. Los cerdos que reciben 6 ug de vORF2-Carbopol (Grupo 2), una dosis única de 16 ug vORF2-Carbopol (Grupo 4), y cerdos en el grupo de control negativo estricto (Grupo 10) tienen tasa de incidencia del 0%; los cerdos que reciben 16 de ug rORF2-Carbopol (Grupo 3), y 1 ug rORF2-Carbopol (Grupo 6) tienen tasas de incidencia de, 6.7%; los cerdos que reciben 16 ug de rORF2-IMS 1314 (Grupo 1) tienen una tasa de incidencia general de 7.1%; los cerdos que reciben 4 ug de

25

110

rORF2-Carbopol (Grupo 5), 0.25 ug de rORF2-Carbopol (Grupo 7), y >8 de log
vacuna KV tienen tasas de incidencia del 13.3%; y los cerdos en el grupo de
control de inoculación (Grupo 9) tienen una tasa de incidencia de 14.3%. Las tasas
de mortalidad general entre grupos también varía. El Grupo 8, que recibe 2 dosis
5 de vacuna KV tienen la tasa de mortalidad más alta de 20.0%; seguido por el
Grupo 9, el grupo de control de Inoculación, y el Grupo 7, que recibe 0.25 ug de
rORF2-Carbopol y tiene tasas de mortalidad de 14.3% y 13.3% respectivamente.
El Grupo 4, que recibe una dosis de 16 ug de vORF2-Carbopol tiene una tasa de
mortalidad del 6.7% todos los otros Grupos, 1, 2, 3, 5, 6, y 10 tienen una tasa de
10 mortalidad del 0%.

**Tabla 20. Resumen de las Observaciones de Grupo para Comportamiento
anormal, Respiración anormal, y Tos Post-inoculación**

Grupo	Tratamiento	N	Comportamiento Anormal ¹	Comportamiento Anormal ²	Tos ³
1	2 dosis rORF2 – 16 µg-IMS 1314	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7.1 %)
2	2 dosis vORF2 - 16 µg – Carbopol	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	2 dosis rORF2 - 16 µg – Carbopol	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)
4	1 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	1 dosis rORF2 - 4 µg- Carbopol	15	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)	0/15 (0%)
6	2 dosis rORF2 - 1 µg- Carbopol	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)
7	rORF2 - 0.25 µg - Carbopol 2 dosis	15	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)
8	2 Dosis KV > 8.0 log - Carbopol	15	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)	0/15 (0%)
9	Controles de Inoculación	14	1/14 (7.1 %)	1/14 (7.1 %)	2/14 (14/3%)
10	Controles Negativos Estrictos	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

15 ¹ Número Total de cerdos en cada grupo que demuestra cualquier comportamiento anormal durante al menos un día.

² Número total de cerdos en cada grupo que demuestran cualquier respiración anormal durante al menos un día

5 ³ Número total de cerdos en cada grupo que demuestran una tos durante al menos un día

Tabla 21. Resumen de la Incidencia general de Grupo de Síntomas clínicos
Post- Inoculación

10

Grupo	Tratamiento	N	Incidencia de cerdos con Síntomas Clínicos ¹	Tasa de Incidencia
1	2 dosis rORF2 - 16 µg- IMS 1314	14	1	7.1%
2	2 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	15	0	0.0%
3	2 dosis rORF2 - 16 µg - Carbopol	15	1	6.7%
4	1 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	15	0	0.0%
5	1 dosis rORF2 - 4 µg- Carbopol	15	2	13.3%
6	2 dosis rORF2 - 1 µg- Carbopol	15	1	6.7%
7	2 dosis rORF2 - 0.25 µg - Carbopol	15	2	13.3%
8	2 Dosis KV > 8.0 log - Carbopol	15	2	13.3%
9	Controles de Inoculación	14	2	14.3%
10	Controles Negativos Estrictos	15	0	0.0%

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerto = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

15 ¹ Número total de cerdos en cada grupo que demuestran cualquier síntoma clínico durante al menos un día

Tabla 22. Resumen de Tasas de Mortalidad de Grupo Post-Inoculación

Grupo	Tratamiento	N	Muerte post-inoculación	Tasa de Mortalidad
1	2 dosis rORF2 - 16 µg- IMS 1314	14	0	0.0%
2	2 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	15	0	0.0%
3	2 dosis rORF2 - 16 µg - Carbopol	15	0	0.0%
4	1 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	15	1	6.7%
5	1 dosis rORF2 - 4 µg - Carbopol	15	0	0.0%
6	2 dosis rORF2 - 1 µg - Carbopol	15	0	0.0%
7	2 dosis rORF2 - 0.25 µg - Carbopol	15	2	13.3%
8	2 Dosis KV > 8.0 log – Carbopol	15	3	20.0%
9	Controles de Inoculación	14	2	14.3%
10	Controles Negativos Estrictos	15	0	0.0%

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerto = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

El resumen de Porcentaje Medio de Grupo de Lesiones pulmonares y el Diagnóstico Tentativo se da adelante en la Tabla 23. El Grupo 9, el grupo de control de Inoculación, tiene el porcentaje más alto de lesiones pulmonares con una media de 10.81 ± 23.27%, seguido por el Grupo 7, que recibe 0.25 ug de rORF2-Carbopol y tiene una media de 6.57 ± 24.74%, el Grupo 5, que recibe 4 ug de rORF2- Carbopol y tiene una media de 2.88 ± 8.88%, y el Grupo 8, que recibe la vacuna KV y tiene una media de 2.01 ± 4.98%. Los seis grupos restantes (6) tienen una media de porcentaje menor de lesiones pulmonares que varía de 0.11 ± 0.38% a 0.90 ± 0.15%.

El diagnóstico tentativo de neumonía varía entre grupos. El Grupo 3, que recibe dos dosis de 16 ug de rORF2-Carbopol, tiene el diagnóstico tentativo más bajo de neumonía, con 13.3%. El Grupo 9, el grupo de control de Inoculación, tiene 50% de diagnóstico de grupo tentativamente con neumonía, seguido por el Grupo 10, el grupo de control negativo estricto y el Grupo 2, que recibe dos dosis de 16 ug vORF2-Carbopol, con 46.7% de 40% respectivamente, tentativamente diagnosticado con neumonía.

Los Grupos 1, 2, 3, 5, 9, y 10 tienen 0% del grupo diagnosticado tentativamente como PCV2 infectado, mientras el Grupo 8, que recibe dos dosis de vacuna KV, tiene la tasa más alta de grupo de dosis tentativa de infección PCV2, con 20%. El Grupo 7, que recibe dos dosis de 0.25 ug rORF2-Carbopol, y el Grupo 4, que recibe una dosis de 16 ug de vORF2-Carbopol tienen diagnóstico de grupo tentativo de infección PCV2 en 13.3% y 6.7% de cada grupo, respectivamente.

Las úlceras gástricas solo se diagnostican en un cerdo en el Grupo 7 (6.7%); mientras que los otros 9 grupos permanecen libres de úlceras gástricas.

Tabla 23. Resumen % Medio de Lesión Pulmonar de Grupo y Diagnóstico Tentativo

Grupo	Tratamiento	N	No. de cerdos que desprenden durante al menos un día	Tasa de Incidencia
1	2 dosis rORF2 - 16 µg-IMS 1314	15	0	0%
2	2 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	15	1	6.7%
3	2 dosis rORF2 - 16 µg - Carbopol	15	3	20.0%
4	1 dosis vORF2 - 16 µg -	15	2	13.3%

1286
114.

	Carbopol			
5	1 dosis rORF2 - 4 µg- Carbopol	15	3	20.0%
6	2 dosis rORF2 - 1 µg- Carbopol	15	6	40.0%
7	2 dosis rORF2 - 0.25 µg - Carbopol	15	7	46.7%
8	2 Dosis KV > 8.0 log - Carbopol	15	12	80%
9	Controles de Inoculación	14	14	100.0%
10	Controles Negativos Estrictos	15	14	93.3%

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

5 El Resumen de los Resultados de Incidencia Positiva IHC para Grupo se muestra en la Tabla 24 adelante. El Grupo 1 (16 ug rORF2 - IMS 1314) tiene la tasa de grupo más baja de resultados IHC positivos con 0% de los cerdos positivos para PCV2, seguido por el Grupo 2 (16 ug de vORF2 - Carbopol) y el Grupo 4 (dosis única 16 ug vORF2 - Carbopol), que tiene tasas IHC de grupo de 10 6.7% y 13.3% respectivamente. El Grupo 9, el grupo de control de Inoculación, tiene la incidencia IHC más alta positiva con 100% de los cerdos positivos para PCV2, seguido por el Grupo 10, el grupo de control negativo estricto, y el Grupo 8 (Vacuna KV), con 93.3% y 80% de los cerdos positivos para PCV2, respectivamente.

15

Tabla 24. Resumen de tasa de Incidencia Positiva IHC para el Grupo

Grupo	Tratamiento	N	No. de cerdos que desprenden durante al menos 1 día	Tasa de Incidencia
1	2 dosis rORF2 - 16 µg-IMS 1314	15	0	0%
2	2 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	15	1	6.7%

3	2 dosis rORF2 - 16 µg - Carbopol	15	3	20.0%
4	1 dosis vORF2 - 16 µg - Carbopol	15	2	13.3%
5	1 dosis rORF2 - 4 µg- Carbopol	15	3	20.0%
6	2 dosis rORF2 - 1 µg- Carbopol	15	6	40.0%
7	2 dosis rORF2 - 0.25 µg - Carbopol	15	7	46.7%
8	2 Dosis KV > 8.0 log - Carbopol	15	12	80%
9	Controles de Inoculación	14	14	100.0%
10	Controles Negativos Estrictos	15	14	93.3%

vORF2 = ORF2 vírico aislado; rORF2 = ORF2 expresado por baculovirus recombinante; KV o virus de célula completa muerta = virus PCV2 que crece en cultivo celular adecuado.

5 Discusión

Se evalúan siete vacunas PCV2 en este ejemplo, que incluyen una dosis alta (16µg) de antígeno rORF2 adyuvado con IMS 1314 administrado dos veces, una alta dosis (16 µg) de antígeno vORF2 adyuvado con Carbopol administrado una vez a un grupo de cerdos y dos veces a un segundo grupo de cerdos, una 10 dosis alta (16 µg) de antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol administrado dos veces, una dosis de 4 µg de antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol administrado dos veces, una dosis de 1µg de antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol administrado dos veces, una dosis baja (0.25 µg) de antígeno rORF2 adyuvado 15 con Carbopol administrado dos veces, y una alta dosis (> 8 log) de vacuna PCV2 de célula completa muerta adyuvado con Carbopol. En general, el Grupo 1, que recibe dos dosis de 16 µg de rORF2 - IMS 1314, se desarrolla ligeramente mejor que los Grupos 2 a 7, que reciben vacunas que contiene varios niveles de vORF2 o antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol y mucho mejor que el Grupo 8, que

recibe dos dosis de vacuna PCV2 de célula completa muerta. El Grupo 1 tiene el tercer ADWG (1.80 ± 0.30 lbs/día), la incidencia más baja de comportamiento anormal (0%), la incidencia más baja de respiración anormal (0%), una baja incidencia de tos (7.1%), una baja incidencia de síntomas clínicos generales (7.1%), se une con los otros tres grupos para la tasa de mortalidad más baja (0%), la segunda tasa más baja para el % medio de lesiones pulmonares ($0.15 \pm 0.34\%$), la segunda tasa más baja para neumonía (21.4%) y la tasa de incidencia más baja para tejidos IHC positivos (0%). El Grupo 1 es, sin embargo, el único Grupo en el que las reacciones del sitio de inyección se notan, que incluyen 50% de los vacunados un día después de la segunda vacunación. Las otras vacunas administradas a los Grupos 2 a 7 se desarrollan mejor que la vacuna muerta y casi también como la vacuna administrada al Grupo 1,

El Grupo 8, que recibe dos dosis de Vacuna PCV2 muerta adyuvada con Carbopol, tienen el peor conjunto de resultados para cualquier grupo de vacuna. El Grupo 8 tiene el ADWG más bajo (0.93 ± 0.33 lbs/día), la segunda tasa más alta de comportamiento anormal (6.7%), y la tasa más alta de respiración anormal (6.7%), se une con más de tres otros grupos para la tasa de incidencia general más alta de síntomas clínicos (13.3%), tiene la tasa de mortalidad más alta de todos los grupos (20%), y tiene la tasa IHC positiva más alta (80%) de cualquier grupo de vacuna. Hubo preocupación de que la vacuna PCV2 de célula completa muerta no se hubiera inactivado completamente antes de la administración al Grupo 8, que puede explicar estos pobres resultados de grupo. Desafortunadamente, los datos definitivos no estuvieron disponibles para confirmar esta preocupación. En general, en este contexto de este ejemplo, una vacuna PCV2 muerta convencional no ayuda en la reducción de la enfermedad asociada con PCV2.

Como se mencionó previamente, ningún evento adverso se asocia con las vacunas de ensayo con excepción de la vacuna adyuvada con IMS 1314. Las reacciones de sitios de inyección se notan en 50.0% de veros 1 día después de la segunda vacunación con la vacuna formulada con IMS 1314 y en 28.6% de los cerdos 2 días después de la segunda vacunación. No se notan reacciones en ningún cerdo vacunas adyuvadas con Carbopol. Cualquier estudio adicional que incluye cerdos vacunados con vacunas adyuvadas con IMS 1314 debe continuar monitorear cercanamente los cerdos para las reacciones del sitio de inyección.

10

Todos los cerdos son seronegativos para PCV2 en el día -3 y solo el Grupo 2 tiene un título sobre 100 en el Día 14. En el Día 25 (día de inoculación), el Grupo 8 tiene el título de anticuerpo PCV2 más alto (4619), seguido por el Grupo 2 (2507). Con la excepción de los grupos 7,9 y 10, todos los grupos demuestran una fuerte respuesta de anticuerpos en el Día 32. En el día 50, todos los grupos que incluyen todos los grupos 7, 9 y 10 demuestran una fuerte respuesta de anticuerpos.

Una de las marcas principales de la última etapa de infección PCV2 y desarrollo posterior PMWS es el fuerte retardo en cerdos destetados, y en casos severos se nota pérdida de peso. La ganancia de peso diario promedio de los grupos es un método cuantitativo de demostrar el retardo de crecimiento o pérdida de peso. En este ejemplo, no hubo una gran diferencia en ADWG entre grupos. El Grupo 8 tiene el ADWG más bajo de 0.88 ± 0.29 lbs/día, mientras el Grupo 4 tiene el ADWG más alto de 1.16 ± 0.26 lbs/día. Dentro del contexto de este estudio no hubo una diferencia suficiente entre los grupos para basar la eficacia futura de la vacuna en ADWG.

20

25

En adición de la pérdida de peso – disnea, letargia, palidez de la piel y algunas veces ictericia son síntomas clínicos asociados con PMWS. En este ejemplo el comportamiento anormal y la respiración anormal y la tos se notan infrecuentemente para cada grupo. Como se evidencia en este estudio, este modelo de inoculación y cepa de inoculación no resultan en síntomas clínicos arrolladores y este no es un parámetro fuerte sobre el que se basa la eficacia de la vacuna.

En general, las tasas de mortalidad no son altas en este ejemplo y la falta de una tasa alta de mortalidad en el grupo de control de inoculación limita este parámetro en el que se basa la eficacia de la vacuna. Antes del Día 46 los grupos 4 y 7 tienen cada uno 15 cerdos muertos, el grupo 9 tiene 2 de 14 cerdos muertos y el Grupo 8 tiene 3 de 15 cerdos muertos. Debido al hecho que el grupo 9, el grupo de control de inoculación no demuestra síntomas clínicos PCV2 y solo han ocurrido dos muertes en este grupo el Día 46, la vacuna MLV de virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) se administra a todos los cerdos en el Día 46. Los estudios anteriores han utilizado INGELVAC®PRRS MLV como un inmunoestimulador para exasperar la enfermedad PMWS asociada con PCV2 y la tasa de mortalidad en estos estudios anteriores. Han ocurrido 2 muertes brevemente después de administrar la vacuna PRRS en el Día 46- el Grupo 4 tiene una muerte en el Día 46 y el Grupo 7 tiene una muerte en el Día 47-que no se asocian probablemente con la administración de la vacuna PRRS. El día 50, el Grupo 8 que recibe dos dosis de vacuna muerta, tiene la tasa de mortalidad más alta (20%), seguida por el grupo 9 (Grupo de inoculación) y el Grupo 7 (0.25 ug rORF2 Carbopol), con tasa de mortalidad de 14.3% y 13.3% respectivamente. En general la administración de la vacuna PRRS al modelo de inoculación e la fase

de observación preinoculación de este ejemplo no incrementa significativamente las tasas de mortalidad.

Las lesiones brutas en cerdos con PMWS secundario para infección PCV2
5 consiste típicamente de linfadenopatía generalizada en combinación con uno o más de los siguientes: (1) neumonía intersticial con edema ínter ovular, (2) palidez cutáneo o ictericia, (3) hígado atrófico abigarrado, (4) úlceras gástricas y (5) nefritis. En la necropsia (día 50) no se nota ictericia, hepatitis y nefritis en ningún grupo. Una úlcera gástrica se nota en un cerdo del Grupo 7, pero no se examina
10 específica para linfadenopatía. Basados en la presencia de lesiones que son consistentes con infección PCV2, 3 grupos tienen al menos un cerdo diagnosticado tentativamente con PCV2 (PMWS). El Grupo 8, que recibe dos dosis de vacuna muerta, tiene 20% tentativamente diagnosticado con PCV2, mientras el Grupo 7 y el Grupo 4 tienen 13.3% y 6.7% respectivamente,
15 diagnosticado tentativamente con PCV2. La clasificación del porcentaje medio de lesiones pulmonares varía entre los grupos en necropsia. Los grupos 1, 2, 3, 4, 6 y 10 tienen baja clasificación de % de lesiones pulmonares que varían de $0.11 \pm 0.38\%$ a $0.90 \pm 0.15\%$. Como se espera, el grupo 9, grupo de control de inoculación tiene la más alta clasificación de % medio de lesión pulmonar ($10.81 \pm$
20 23.27%). En 4 grupos, la clasificación de % medio de lesión pulmonar se evalúa debido a uno de los 3 cerdos en cada uno de los grupos que tienen muy altas clasificaciones de lesión pulmonar. Las lesiones pulmonares son rojas/púrpuras y consolidadas. Típicamente, las lesiones pulmonares con PMWS se describen como morenas, no colapsibles con edema ínter lobular. Las lesiones de pulmón
25 notadas en este estudio no se asocian con infección PCV2 o un segundo agente infeccioso pulmonar puede haber estado presente. Dentro del contexto de este estudio, el % de clasificación de lesión pulmonar probablemente no refleja una

medida real de la cantidad de infección pulmonar debido al PCV2. De la misma forma el diagnóstico, tentativo de neumonía puede haber sido sobre utilizado también. Cualquier cerdo con lesiones pulmonares, algo tan pequeños como 0.10% se listan con un diagnóstico tentativo de neumonía. En este ejemplo, no
5 hubo diferencia significativa entre los grupos con respecto a las lesiones brutas y el % de lesiones pulmonares en las que se basa la eficacia de la vacuna.

Los resultados IHC muestran las mayores diferencias entre grupos. El Grupo 1 (16µg rORF2-IMS 1314) tiene los resultados IHC positivos más bajos
10 para antígeno PCV2 (0%); mientras los grupos 9 y 10 tienen los resultados IHC positivos más altos con tasas de incidencia de 100% y 93.3% respectivamente. Los grupos 3, 5, 6 y 7, que reciben 16, 4, 1 o 0.25µg de antígeno rORF2, respectivamente, adyuvado con Carbopol, tiene las tasa IHC positivas de 20%, 20%, 40% y 46.7%, respectivamente. El Grupo 2, que recibe dos dosis de 16µg
15 vORF2 adyuvado con Carbopol tiene una tasa IHC positiva de 6.7%, mientras el Grupo 4 que recibe una dosis de la misma vacuna, tiene una tasa IHC positiva de 13.3%. Debido a la naturaleza objetiva de esta prueba y el hecho de que los resultados IHC se correlacionan con los resultados esperados, la prueba IHC es probablemente uno de los mejores parámetros sobre el cual basar la eficacia de
20 la vacuna.

Así en un aspecto de la presente invención las dosis protectora mínima (MPD) del antígeno PCV2 rORF2 adyuvado con Carbopol en el modelo de cerdo CDCD en la faz de una inoculación PCV2 se determina. Los grupos 3, 5, 6 y 7
25 reciben cada uno dos dosis de antígeno rORF2 adyuvado con Carbopol, pero el nivel de antígeno rORF2 varía para cada grupo. Los grupos 3, 5, 6 y 7 cada uno reciben 16, 4, 1 o 0.25µg de antígeno respectivamente. En general la reducción

del nivel de antígeno rORF2 reduce los títulos de anticuerpos PCV2, e incrementa la tasa de mortalidad, el % de lesiones pulmonares medio y la incidencia de tejidos IHC positivos. De los 4 grupos que reciben niveles variantes de rORF2- Carbopol, los grupos 3 y 5, que reciben dos dosis de 16 o 4µg de rORF2, respectivamente, cada uno tiene una tasa IHC positiva de solo 20%, y cada uno tiene títulos de anticuerpos similares. En general, basados en los resultados IHC positivos, la dosis protectora mínima de antígeno rORF2 administrada dos veces es aproximadamente 4µg.

En otro aspecto de la presente invención, se evalúa la antigenicidad de los antígenos PCV2 VIDO R-1 (vORF2) y (rORF2) recombinante. El Grupo 2 recibe dos dosis de 16µg de rORF2 y el Grupo 3 recibe dos dosis de 16µg de rORF2. Ambas vacunas se adyuvan con Carbopol. Ambas vacuna se encuentran que son seguras y tienen una tasa de mortalidad del 0%. El Grupo 2 tiene un título de anticuerpo PCV2 de 2507 en el Día 25, mientras el Grupo 3 tiene un título de anticuerpo PCV2 de 1503. El Grupo 3 tiene un porcentaje medio de clasificación de lesión pulmonar diferente del Grupo 2 ($0.11 \pm 0.38\%$ vs. $0.90 \pm 0.15\%$), pero el grupo tiene una tasa de incidencia positiva IHC menor que el Grupo 3 (6.7% vs. 20%). En general .ambas vacunas tienen similar antigenicidad, pero el vORF2 se asocia con resultados IHC ligeramente mejores.

En aún otro aspecto de la presente invención, la adecuabilidad de 2 adyuvantes diferentes (Carbopol e IMS 1314) e determina. Los grupos 1 y 3 reciben dos dosis de vacuna que contiene 16 ug de antígeno rORF2, pero el Grupo 1 recibe el antígeno adyuvado con IMS 1314 mientras el Grupo 3 recibe el antígeno adyuvado con Carbopol. Ambos grupos tienen esencialmente el mismo ADWG, esencialmente la misma incidencia de síntomas clínicos post-inoculación,

la misma tasa de mortalidad, y esencialmente el mismo % medio de lesiones pulmonares; pero el Grupo 1 tiene una tasa de IHC positiva de 0% mientras el Grupo 3 tiene una tasa positiva IHC del 20%. Sin embargo, el Grupo 3 que recibe la vacuna adyuvada con Carbopol tiene titulo IFAT PCV2 mayores en los días 25, 32 y 50 que el Grupo 1, que recibe la vacuna adyuvada con IMS 1314. En general aunque la vacuna PCV2 adyuvada con IMS 1314 suministra mejores resultados IHC, no prueba una mejor protección de infección PCV2 e induce reacción en los sitios de inducción. Mientras que la vacuna PCV2 adyuvada con Carbopol casi también la vacuna adyuvada IMS 1314, pero no se asocia con ningún efecto adverso.

En todavía otro aspecto de la presente invención la viabilidad del ORF2 de PCV2 como un producto de una dosis de 1 ml se determina. Los grupos 2 y 4 reciben 16µg de vacuna vORF2 adyuvada con Carbopol en el día 0, pero el Grupo 2 recibe una segunda dosis en el Día 14. El Grupo 4 tiene un ADWG ligeramente mayor y un % medio menor de lesiones pulmonares que el Grupo 2, pero el Grupo 2, tiene mayores títulos IFAT PCV2 en el Día 25, 32 y 50, y tasa de incidencia ligeramente de títulos IHC positivos. Todos los otros resultados para estos 2 grupos son similares. En general, una dosis del vORF" adyuvado con Carbopol se desarrolla en forma similar a las dos dosis de la misma vacuna.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

- 5 1. Un método para recuperar una proteína recombinante expresada por
 estructura de lectura abierto 2 de PCV2 que comprende las etapas de:
- A) clonar dicho estructura de lectura abierto recombinante 2 de PCV2
 dentro de un vector de transferencia;
- 10 B) transfectar la porción de dicho vector de transferencia que contiene
 dicho estructura de lectura abierto recombinante 2 dentro de un virus;
- C) infectar las células en medio con dicho virus;
- 15 D) causar que dicho virus exprese la proteína a partir de dicho
 estructura de lectura abierto 2;
- E) separar las células de dicho vector del sobrenadante; y
- 20 F) recuperar dicha proteína de estructura de lectura abierto expresado 2
 en dicho sobrenadante.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método incluye
- 25 adicionalmente la etapa de amplificar dicho estructura de lectura abierto
 2 de una cepa de PCV2 antes de clonar dicho estructura de lectura
 abierto dentro de dicho vector de transferencia.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha estructura de lectura abierto recombinante 2 comprende adicionalmente una secuencia seleccionada del grupo que consiste de una secuencia 5' de Kozak, un sitio 3' ECOR1, y combinaciones de estos.
4. El método e la reivindicación 3, en donde dicha secuencia 5' prima de Kozac comprende la SEQ ID NO: 1.
5. El método de la reivindicación 3, en donde dicho sitio 3', ECOR1 comprende la SEQ ID NO: 2.
6. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho estructura de lectura abierto PCV2 comprende la SEQ ID NO: 4.
7. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha proteína recombinante comprende la SEQ ID NO: 6.
8. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho medio comprende medio de célula de insecto libre de suero.
9. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente las etapas de:
- i. antes de la etapa A, clonar dicho estructura de lectura abierto amplificado, 2 dentro de un primer vector;

ii. cortar dicho estructura de lectura abierto 2 de dicho primer vector; y

iii. utilizar dicho estructura de lectura abierto cortado 2 en la etapa A.

5 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dichas células comprenden células SF+.

11. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 10, dicho virus comprende baculovirus.

10

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha porción transfectada comprende la SEQ ID NO: 4.

15

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha proteína de estructura de lectura abierto 2 se recupera en dicho sobrenadante al menos 5 días después de infectar las células con dicho virus .

20

14. El método de preparar una composición para invocar una respuesta inmune contra PCV2, dicho método comprende las etapas de:

25

i. transfectar una construcción dentro de un virus, dicha construcción comprende ADN recombinante del estructura de lectura abierto 2 de PCV2;

ii. infectar células con dicho virus transfectado, dichas células están en un medio de crecimiento;

iii. originar que dicho virus exprese la proteína recombinante de dicho estructura de lectura abierto 2;

5 iv. recuperar dicho estructura de lectura abierto expresado 2 en el sobrenadante; y

v. combinar dicha proteína recuperada con un adyuvante adecuado u otro portador o excipiente farmacéuticamente aceptable

10

15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho método incluye adicionalmente la etapa de obtener dicha construcción a partir de un vector de transferencia.

15 16. El método de la reivindicación 14 – 15, en donde dicho método incluye adicionalmente la etapa de amplificar dicho estructura de lectura abierto 2 de una cepa de PCV2 antes de clonar dicho estructura de lectura abierto 2 dentro de dicho vector de transferencia.

20 17. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 14-16, en donde dicho estructura de lectura abierto recombinante 2 comprende adicionalmente una secuencia seleccionada del grupo que consiste de una secuencia 5' Kozac, un sitio 3' ECOR1 y combinaciones de estos.

25 18. El método de la reivindicaron 17, dicha secuencia 5' de Kozac comprende la SEQ ID NO: 1.

19. El método de la reivindicación 17, dicho sitio 3' ECOR1 comprende la SEQ ID NO: 2.

20. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 14 a 19, en donde dicho estructura de lectura abierto PCV2 2 comprende la SEQ ID NO: 4.

21. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 14 a 20, en donde dicha proteína recombinante comprende la SEQ ID NO: 6.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en donde dicho medio comprende medio de célula de insecto libre de suero.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, que comprende adicionalmente las etapas de:

i. clonar dicho estructura de lectura abierto amplificado 2 dentro de un primer vector

ii. cortar dicho estructura de lectura abierto 2 de dicho primer vector;

iii. utilizar dicho estructura de lectura abierto cortado 2 para clonación dentro de dicho vector de transferencia.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, en donde dichas células comprende células SF+.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, en donde dicho virus comprende báculo virus.
- 5 26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25, en donde dicha construcción transfectada comprende la SEQ ID NO: 4.
- 10 27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, en donde dicha proteína de estructura de lectura abierto 2 se recupera al menos 5 días después de infectar dichas células con dicho virus.
28. El método de una cualquiera de la reivindicaciones 14 a 27, en donde dicha etapa de recuperación adicional comprende la etapa de separar dicho medio de dichas células y residuos celulares.
- 15 29. El método de la reivindicaron 28, en donde dicha etapa de separación incluye la etapa de filtrar dicha células, residuos celulares, y medio de crecimiento a través de un filtro que tiene poros que varían en tamaño de aproximadamente 0.45 μ M a aproximadamente 1.0 μ M.
- 20 30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29, en donde dicho método incluye adicionalmente la etapa de inactivar dicho virus antes de combinar dicha proteína recuperada con un adyuvante adecuado.
- 25 31. Un método para recuperar la proteína expresada al a abrir el estructura de lectura 2 de PCV2, en donde dicho método incluye las etapas de aparte:

i. infectar las células en medio de crecimiento con un vector vírico recombinante que contiene dicha estructura de lectura abierto 2;

ii. originar que dicho vector exprese dicha proteína durante al menos 5 días; y

iii. recuperar dicha proteína expresada en el sobrenadante.

32. El método de la reivindicación 31, en donde dicha recuperación ocurre al menos 5 días después de la infección de las células con dicho vector vírico.

33. Una composición de la materia obtenida por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32.

34. El uso de la composición de la reivindicación 33 como un medicamento.

35. El uso de la composición de la reivindicación 33 para la preparación de un medicamento para la prevención de una infección PCV2.

36. Un método para producir un kit de diagnóstico para la detección de una infección PCV2 en una muestra que comprende

i) producir una proteína recombinante como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, y

- ii) empacar dicha proteína recombinante dentro de un contenedor adecuado.

37. El método de la reivindicación 36, que comprende adicionalmente la etapa de incluir un manual de instrucción con el contenedor que empaca la proteína recombinante.

38. Una composición inmunogénica efectiva para reducir la severidad de síntomas clínicos asociados con la infección PCV2 que comprenden la proteína ORF2 de PCV2, o una porción inmunogénica de esta, en donde dicha porción inmunogénica tiene al menos 10 aminoácidos contiguos de la proteína ORF2 de PCV2.

39. La composición inmunogénica de la reivindicación 38, en donde dicha proteína PCV2 PRF2 es

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

- ii) cualquier polipéptido que es al menos 80% homólogo al polipéptido de i),

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

- iv) la porción inmunogénica de iii), que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos incluidos en las secuencias de la SEQ ID

NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:
11,

v) un polipéptido que se codifica por un ADN que comprende la
5 secuencia la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

vi) cualquier polipéptido que se codifica por un polinucleótido que es al
menos 80% homólogo al polinucleótido de v),

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

viii) la porción inmunogénica de vii), en donde el polinucleótido que
codifica para dicha porción inmunogénica comprende al menos 30
15 nucleótidos contiguos incluidos en la secuencia de la SEQ ID NO:
3, o SEQ ID NO: 4.

40. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 38 o 39, en donde
dicha composición adicional comprende un vector vírico inactivo y
20 sobrenadante de cultivo celular.

41. La composición inmunogénica de la reivindicación 40, en donde dicho
vector vírico inactivo es un baculovirus recombinante que codifica para
la proteína ORF2 de PCV2.

42. La composición inmunogénica de la reivindicación 40 o 41, en donde
dicha composición comprende BEI.

43 La composición inmunogénica de la reivindicación 42, en donde dicha composición comprende tiosulfato de sodio.

5 44 La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 39 a 43, en donde dicha composición comprende un ingrediente adicional seleccionado del grupo que consiste de portadores, adyuvantes, medio, inactivadores víricos, diluyentes, agentes isotónicos, agentes inmunomoduladores, antibióticos y combinaciones de estos

10

45 La composición inmunogénica de la reivindicación 44, en donde dicha composición comprende un adyuvante, preferiblemente Carbopol.

15

46 La composición inmunogénica de la reivindicación 45, en donde dicha composición comprende una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente solución salina.

20

47 La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 46, en donde dicha composición comprende al menos 0.2 MCG/ML de proteína ORF2 de PCV2.

25

48. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 46, en donde dicha composición comprende al menos 2µg de proteína ORF2 de PCV2.

49. Un contenedor que comprende al menos una dosis de composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 47, en donde una dosis comprende al menos 2 μ g de proteína ORF2 de PCV2..
- 5 50. Un contenedor que comprende 10 a 250 dosis de la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 47, en donde una dosis comprende al menos 2 μ g de proteína ORF2 de PCV2.
- 10 51. El contenedor de las reivindicaciones 49 a 50 en donde dicho contenedor comprende adicionalmente un agente antimicrobiológico activo.
- 15 52. Un kit que comprende un contenedor de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51 y un manual de instrucciones, que incluyen la información para la aplicación intramuscular de al menos una dosis de la composición inmunogénica en cerditos para reducir la severidad de síntomas clínicos asociados con la infección PCV2
- 20 53. El kit de la reivindicación 52, en donde el manual de instrucciones comprende la información de una segunda o administración adicional de al menos una dosis de la composición inmunogénica, en donde la segunda administración o cualquier administración adicional es al menos 14 días después de la última administración.
- 25 54. Un método para recuperar la proteína recombinante expresada al abrir el estructura de lectura 2 de PCV2 que comprende las etapas de:

A) clonar dicho estructura de lectura abierto recombinante 2 del PCV2 dentro de un vector de transferencia;

B) transfectar la porción de dicho vector de transferencia que contiene dicho estructura de lectura abierto recombinante 2 dentro de un virus.

C) infectar las células en medio con dicho virus;

D) originar que dicho virus exprese la proteína a partir de dicho estructura de lectura abierto 2 durante al menos 5 días;

E) separar las células de dicho vector del sobrenadante; y

F) recuperar dicha proteína de estructura de lectura abierto 2 expresado en dicho sobrenadante.

55. Un método para preparar una composición para invocar una respuesta inmune contra PCV2, dicho método comprende las etapas de:

i) transfectar una construcción dentro de un virus, dicha construcción comprende ADN recombinante de estructura de lectura abierto 2 de PCV2;

ii) infectar las células con dicho virus transfectado, dichas células están en un medio de crecimiento;

- iii) originar que dicho virus exprese la proteína recombinante de dicho estructura de lectura abierto 2 durante al menos 5 días;
- iv) recuperar dicha proteína de estructura de lectura abierto 2 expresado en el sobrenadante; y
- v) combinar dicha proteína recuperada con un adyuvante adecuado u otro portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

10

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

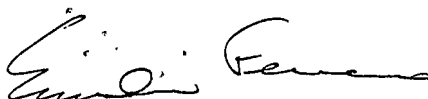
Poderdante : **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC**

Poder conferido el : 09/03/2006

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



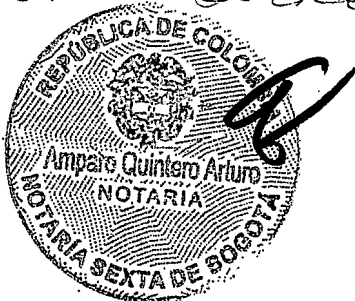
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogota, D.C. 22 OCT 2009
Ante mi AMPARO QUINTERO ARTURO,
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C.
Comparecido(aron)
[Signature]
[Signature]
[Signature]
Culón(ce) exhibido(aron) la(s) C.C.
038019 0831929
35116340 982314
Y declaro(aron) que la(s) firma(s) que a veces(n)
en el presente documento es(son) la(s) cuya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Venero
Luz Almonara Cordero



1146 #4
137
1510

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: The United States of America

THIS PUBLIC DOCUMENT

2. has been signed by JEANNE E. ROGERS

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

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

CERTIFIED

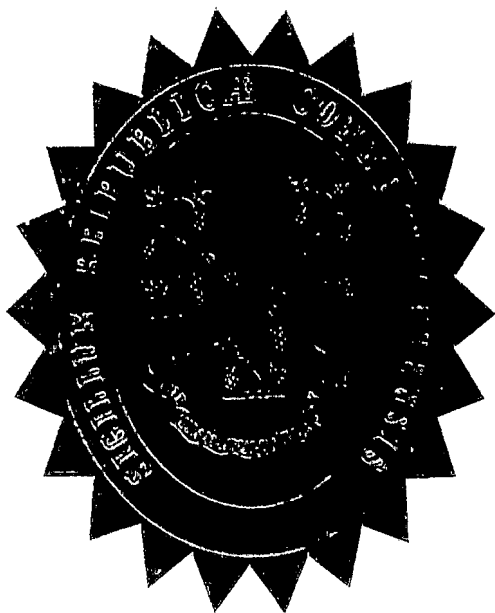
5. at Hartford, Connecticut

6. on March 13, 2006

7. by SUSAN BYSIEWICZ Secretary of the State of Connecticut

8. Number : 2006-3439

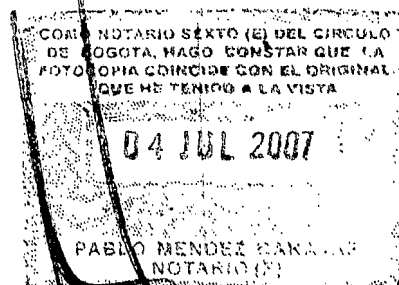
9. Seal :



10. Signature

Susan Bysiewicz

Secretary of the State



REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciliado (s)
en/of

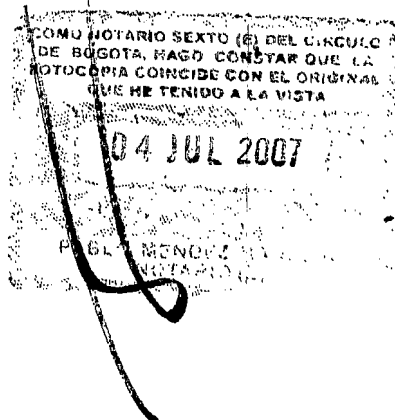
2621 North Belt Highway,

St. Joseph, MO 64506, Estados Unidos de América

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

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

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



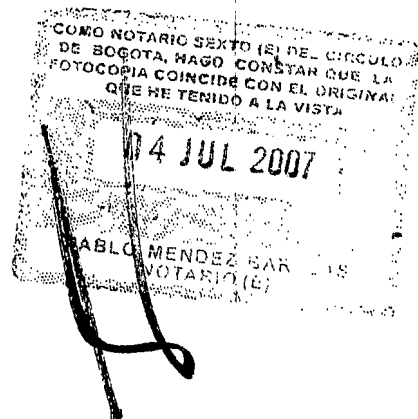
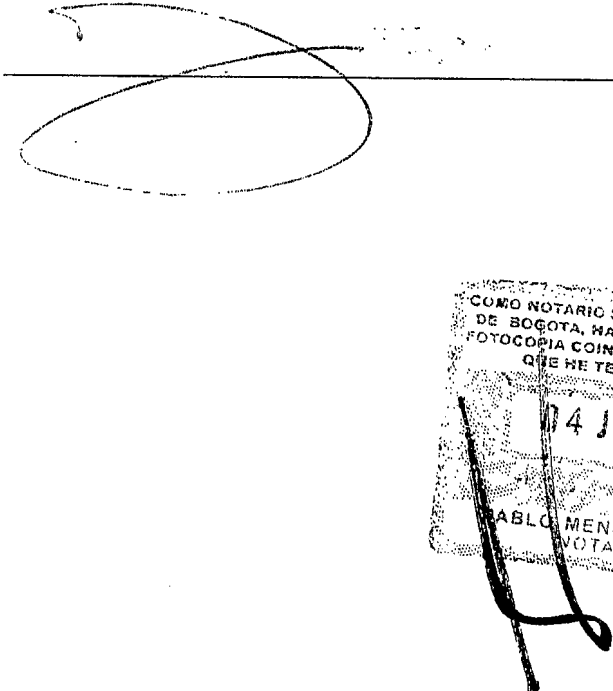
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no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

Dado y firmado hoy/Given and signed this 9th Day of March, 2006

en/in Ridgefield, Connecticut USA

por/by Marla S. Persky, Secretary

Firma/Signature



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200 _____ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado de _____
compareció(eron) personalmente _____

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

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

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los _____ 9 _____ días del mes de _____ MARZO
de 200 _____ 6 _____ compareció(eron) ante mí,
Marla S. Persky

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

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

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

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que MARLA S. PERSKY ES SECRETARIA

DE BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

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

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

St. Joseph, Missouri 64506 EUA

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

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

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

Ciudad Ridgefield

Estado Connecticut

Hoy 9 Marzo de 200 6

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

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

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

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

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this _____ 9th _____ day of _____ March
2006 _____ appeared before me
Marla S. Persky

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

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

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

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Marla S. Persky is Secretary to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

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

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

St. Joseph, Missouri, 64506-USA

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

2.4. That Mr.(Messrs.) Marla S. Persky

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

City Ridgefield

State Connecticut

This 9th day of March 2006

* Documents must be identified with date and origin

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



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

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document .
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature
.....

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
04 JUL 2007
PABLO MANDE BARAJAS
NOTARIO (E)

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

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

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

Por Marla S. Persky, Secretaria

Firma: (firma ilegible)

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

Dado y firmado en la ciudad de Ridgefield

Estado de Connecticut

El 9 de marzo de 2006

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

Al dorso:

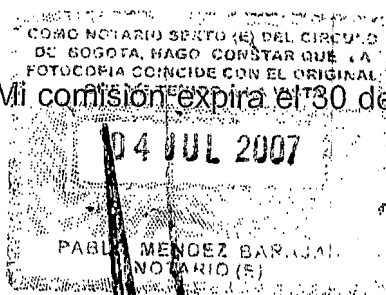
Compareció personalmente Marla S. Persky, quien firma y sella el instrumento anterior y reconoció a éste como un acto libre ante mí hoy 9 de marzo de 2006.

(Firmado)

JEANNE E. ROGERS

Notario Público

Mi comisión expira el 30 de noviembre de 2006



APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

ESTE DOCUMENTO PÚBLICO

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

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

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

CERTIFICADO

5. en Hartford, Connecticut

6. el 13 de marzo de 2006

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

8. Número: 2006-3439

9. Sello: sello del Estado de Connecticut

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

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

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

COLO 15149-841-001-9

WPC 15149 - ID 12

MAR 31/06



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

451535
Margarita Martelo
COORDINADORA GENERAL DEL
DOCUMENTO DE EMERGENCIA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2006 JUL -1 A 11:56
Cmo
RELACIONES
BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
04 JUL 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE
Alfredo Ospina
Alfredo Ospina
COINCIDE CON LA FIRMA REGISTRADA PARA
EL VELLO EN ESTA NOTARIAL
DE BOGOTA

15

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

F96
144



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 120823

Bogotá D.C., Noviembre 21 de 2012 - 16:23:35

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	194849805	20/11/2012	11.365.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	110 PTC SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
			=====	=====

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-077615- -00006-0000

Fecha: 2012-11-23 16:31:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 157

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-077615-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-18 16:10:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

COLO: 15149-841-075

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 21 do 2012 - 16:23:38

152
145

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 121048

Bogotá D.C., Noviembre 22 de 2012 - 10:02:25

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	113725	30/10/2012		15.000.00
RECIBO DE CA	999999999	117347	13/11/2012		315.000.00
RECIBO DE CA	999999999	117385	13/11/2012		960.000.00
RECIBO DE CA	999999999	120833	21/11/2012		60.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.350.000.00
			\$1.350.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N TRESCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-077615-00006-0000
Fecha: 2012-11-23 16:31:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 157

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-077615-A-00000-0000
Fecha: 2012-12-18 16:10:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

020: 15149-841-017-5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Noviembre 22 de 2012 - 10:02:27