

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



PCT^{da}
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-77615

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

COMPOSICIONES INMUNOGENICAS PCV² Y METODOS PARA PRODUCIR

TALES COMPOSICIONES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BOEHRINGER INHELHEIM VETMEDICA INC

DOMICILIO

St Joseph, Missouri, 64506, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

438,019 de Usaquén

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 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 273

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

30/2007

1

☒ Patente de Invención.
☐ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
sociedad constituida y existente bajo las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América.

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

Domicilio: St. Joseph,
Missouri 64506,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual
Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: 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 América

3. Mark EICHMEYER,
10908 NE 77th Lane,
Bondurant,
Iowa 50035,
Estados Unidos de América

2. Phillip HAYES,
2775 430 St. Maurice,
Iowa 51036,
Estados Unidos de América

4. Greg NITZEL,
45620 Finch St.,
Mattawan,
Michigan 49071,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/047596
Publicación Internacional No. WO 2006/072065 A2

Fecha: 29 de diciembre de 2005
Fecha: 6 de julio de 2006

6

Título (54)

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS PCV2 Y METODOS PARA PRODUCIR TALES COMPOSICIONES

7

Clasificación Internacional (51)

C12P 021/006

8 Prioridad SI☒ NO☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	30 de diciembre de 2004	60/640,510
	US	13 de enero de 2005	11/034,797
	US	29 de diciembre de 2005	Sin número

9

Comprobante de pago No.: 07-55,369

Fecha: 9 de julio de 2007

07-55,368

9 de julio de 2007

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482.000.oo.

☐

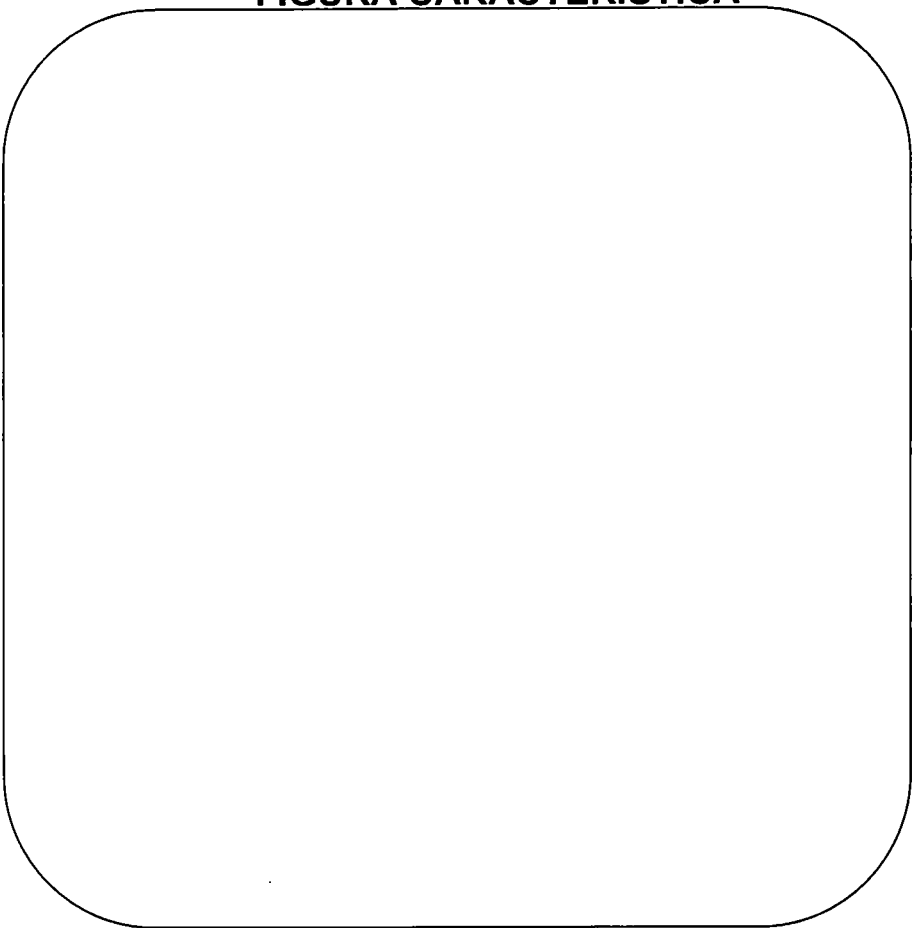
Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.

☒

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

11

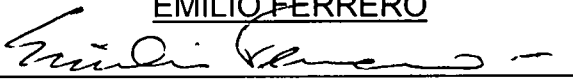
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/072065 A2

Descripción:

Páginas 106 en el idioma original

Páginas 118 en español

Reivindicaciones: Número (s) 4

Figuras: Número (s)

2. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

1196⁵
15149
6264

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

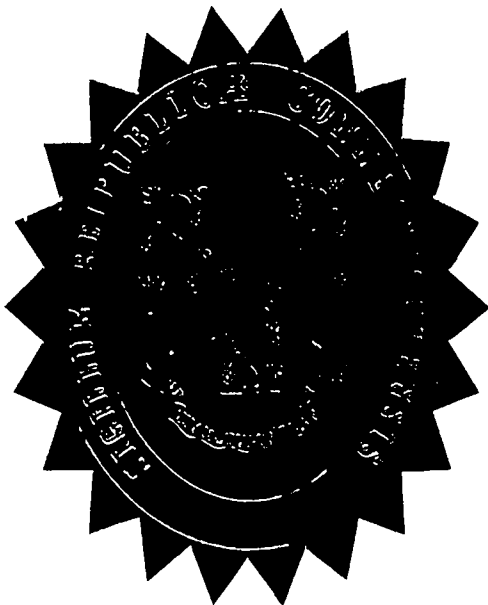
5. at Hartford, Connecticut

6. on **March 13, 2006**

7. by **SUSAN BYSIEWICZ** Secretary of the State of Connecticut

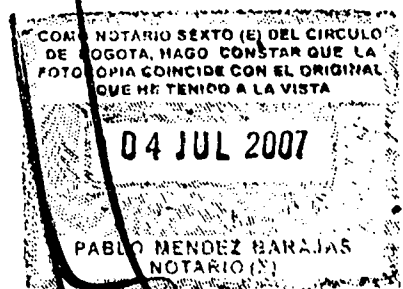
8. Number : **2006-3439**

9. Seal :



10. Signature

Secretary of the State



CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciliado (s)
en/of

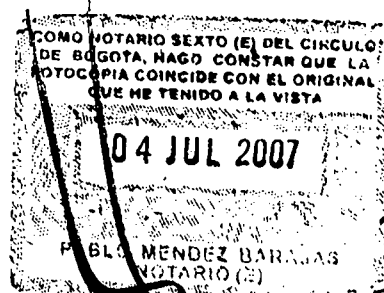
2621 North Belt Highway,

St. Joseph, MO 64506, Estados Unidos de América

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

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

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

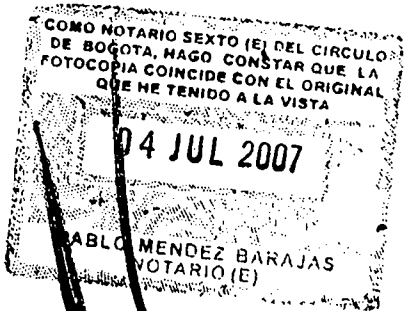
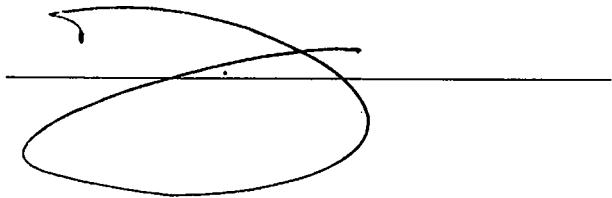


Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, 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 OFICIAL ---

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

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

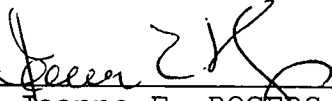
This 9th day of March 2006 _____

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

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* 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

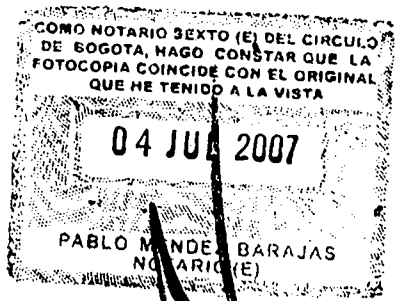
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

.....



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

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

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

Por Marla S. Persky, Secretaria

Firma: (firma ilegible)

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

Dado y firmado en la ciudad de Ridgefield

Estado de Connecticut

El 9 de marzo de 2006

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

Al dorso:

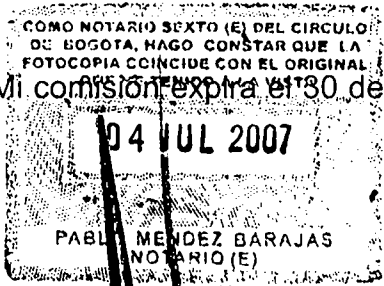
Compareció personalmente Marla S. Persky, quien firma y sella el instrumento anterior y reconoció a éste como un acto libre ante mí hoy 9 de marzo de 2006.

(Firmado)

JEANNE E. ROGERS

Notario Público

Mi comisión expira el 30 de noviembre de 2006



APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

ESTE DOCUMENTO PÚBLICO

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

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

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

CERTIFICADO

5. en Hartford, Connecticut

6. el **13 de marzo de 2006**

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

8. Número: **2006-3439**

9. Sello: sello del Estado de Connecticut

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

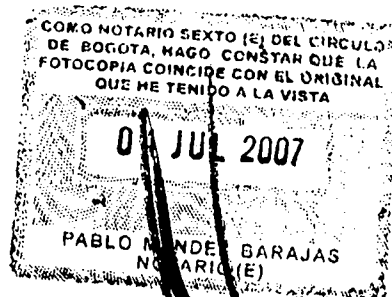
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 15149-841-001-9

WPC 15149 - ID 12

MAR 31/06

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



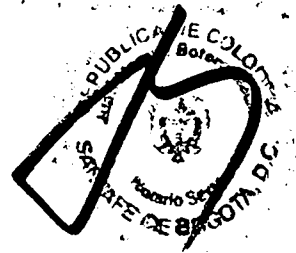
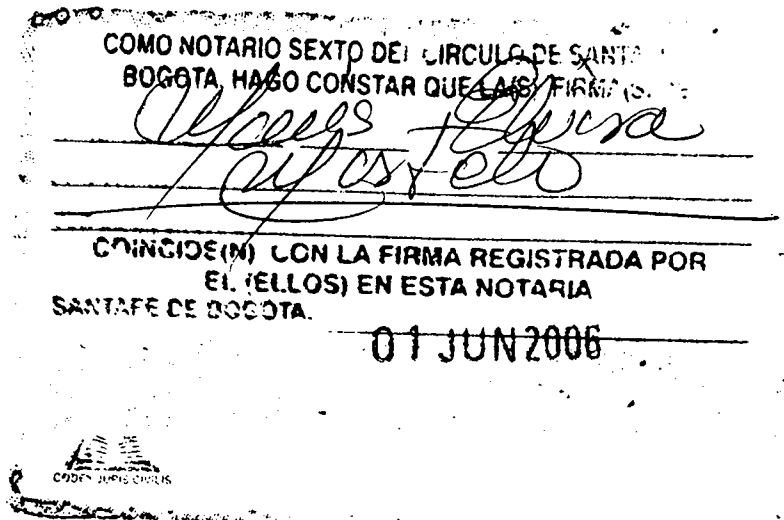
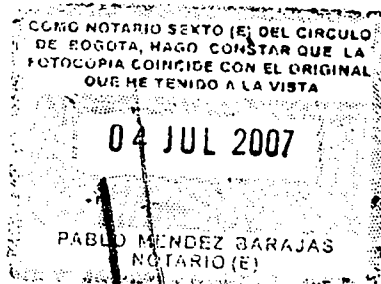
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

451535
Marta Martelo
CONFIRMA LA VERDAD EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 JUL -1 A 11: 56

Como
OFICINA DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 July 2006 (06.07.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/072065 A2

(51) International Patent Classification:
C12P 21/06 (2006.01) C07K 14/08 (2006.01)

(74) Agent: TRUITT, Tracey, S.; Hovey Williams LLP, 2405
Grand Boulevard, Suite 400, Kansas City, MI 64108 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2005/047596

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

(22) International Filing Date:
29 December 2005 (29.12.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/640,510 30 December 2004 (30.12.2004) US
11/034,797 13 January 2005 (13.01.2005) US
Not furnished 29 December 2005 (29.12.2005) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
[US/US]; 2621 N. Belt Hwy, St. J Oseph, MI 64506 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): EICHMEYER,
Mark [US/US]; 10908 NE 77th Lane, Bondurant, IA
50035 (US). NITZEL, Greg [US/US]; 45620 Finch
St., Mattawan, MI 49071 (US). SCHAEFFER, Merrill
[US/US]; 5302 Brookhaven Dr., St Joseph, MO 64507
(US).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PCV2 IMMUNOGENIC COMPOSITIONS AND METHODS OF PRODUCING SUCH COMPOSITIONS

(57) Abstract: An improved method for recovering the protein expressed by open reading frame (2) from porcine circovirus type (2) is provided. The method generally involves the steps of transfecting recombinant virus containing open reading frame (2) coding sequences into cells contained in growth media, causing the virus to express open reading frame (2), and recovering the expressed protein in the supernate. This recovery should take place beginning approximately (5) days after infection of the cells in order to permit sufficient quantities of recombinant protein to be expressed and secreted from the cell into the growth media. Such methods avoid costly and time consuming extraction procedures required to separate and recover the recombinant protein from within the cells.

WO 2006/072065 A2

PCV2 IMMUNOGENIC COMPOSITIONS AND METHODS OF PRODUCING SUCH COMPOSITIONS

5

RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of provisional application serial number 60/640,510, filed on December 30, 2004, and application serial number 11/034,737, filed on January 13, 2005, the teachings and contents of which are hereby incorporated by reference.

10

SEQUENCE LISTING

This application contains a sequence listing in paper format and in computer readable format, the teachings and content of which are hereby incorporated by reference.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

20

One aspect of the present invention is concerned with the recovery of a protein expressed by open reading frame 2 (ORF2) of porcine circovirus type 2 (PCV2). More particularly, the protein is a recombinant protein expressed by a transfected virus containing recombinant coding sequences for porcine circovirus type 2, open reading frame 2. Still more particularly, the transfected virus is permitted to infect cells in growth media and the protein expressed by open reading frame 2 is recovered in the supernate, rather than from inside the cells. Even more particularly, the method involves the steps of amplifying the open reading frame 2 gene from porcine circovirus type 2, cloning this amplified portion into a first vector, excising the open reading frame 2 portion from this first vector and cloning it into a transfer vector, cotransfecting the transfer vector with a viral vector into cells in growth media,

25

30

causing the cells to become infected by the viral vector and thereby express open reading frame 2, and recovering the expressed recombinant protein coded for by open reading frame 2 in the supernate.

In another aspect, the present invention is concerned with an immunogenic composition effective for inducing an immune response against PCV2, and methods for producing those immunogenic compositions. More particularly, the present invention is concerned with an immunological composition effective for providing an immune response that protects an animal receiving the composition and reduces, or lessens the severity, of the clinical symptoms associated with PCV2 infection. Still more particularly, the present invention is concerned with a protein-based immunological composition that confers effective protection against infection by PCV2. Even more particularly, the present invention is concerned with an immunological composition comprising ORF2 of PCV2, wherein administration of PCV2-ORF2 results in protection against infection by PCV2. Most particularly, the present invention is concerned with an immunological composition effective for conferring effective immunity to a swine receiving the immunological composition, and wherein the composition comprises the protein expressed by ORF2 of PCV2.

Description of the Prior Art

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a small (17 -22 nm in diameter), icosahedral, non-enveloped DNA virus, which contains a single-stranded circular genome. PCV2 shares approximately 80% sequence identity with porcine circovirus type 1 (PCV1). However, in contrast with PCV1, which is generally non-virulent, swine infected with PCV2 exhibit a syndrome commonly referred to as Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS).

PMWS is clinically characterized by wasting, paleness of the skin, unthriftiness, respiratory distress, diarrhea, icterus, and jaundice. In some affected swine, a combination of all symptoms will be apparent while other swine will only have one or two of these symptoms. During necropsy, microscopic and macroscopic lesions also appear on multiple tissues and organs, with lymphoid organs being the most common site for lesions. A strong correlation has been observed between the amount of PCV2 nucleic acid or antigen and the severity of microscopic lymphoid lesions. Mortality rates for swine infected with PCV2 can approach 80%. In addition to PMWS, PCV2 has been associated with several other infections including pseudorabies, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), Glasser's disease, streptococcal meningitis, salmonellosis, postweaning colibacillosis, dietetic hepatosis, and suppurative bronchopneumonia.

Open reading frame 2 (ORF2) protein of PCV2, having an approximate molecular weight of 30 kDa when run on SDS-PAGE gel, has been utilized in the past as an antigenic component in vaccines for PCV2. Typical methods of obtaining ORF2 for use in such vaccines generally consist of amplifying the PCV2 DNA coding for ORF2, transfecting a viral vector with the ORF2 DNA, infecting cells with the viral vector containing the ORF2 DNA, permitting the virus to express ORF2 protein within the cell, and extracting the ORF2 protein from the cell via cell lysis. These procedures generally take up to about four days after infection of the cells by the viral vector. However, these procedures have a disadvantage in that the extraction procedures are both costly and time-consuming. Additionally, the amount of ORF2 recovered from the cells is not very high; consequently, a large number of cells need to be infected by a large number of viral vectors in order to obtain sufficient quantities of the recombinant expressed protein for use in vaccines and the like.

Current approaches to PCV2 immunization include DNA-based vaccines, such as those described in U.S. Patent No. 6,703,023. However, such vaccines have been ineffective at conferring protective immunity against PCV2 infection and the clinical signs associated therewith.

Accordingly, what is needed in the art is a method of obtaining ORF2 protein, which does not require extraction of the ORF2 protein from within infected cells. What is further needed are methods of obtaining recombinant ORF2 protein in quantities sufficient for efficiently preparing vaccine compositions. What is still further needed are methods for obtaining ORF2 protein which do not require the complicated and labor-intensive methods required by the current ORF2 protein extraction protocols. Finally, with respect to compositions, what is needed in the art is an immunogenic composition which does confer protective immunity against PCV2 infection and lessens the severity of or prevents the clinical signs associated therewith.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the problems inherent in the prior art and provides a distinct advance in the state of the art. Specifically, one aspect of the present invention provides improved methods of producing and/or recovering recombinant PCV2 ORF2 protein, i) by permitting infection of susceptible cells in culture with a recombinant viral vector containing PCV2 ORF2 DNA coding sequences, wherein ORF2 protein is expressed by the recombinant viral vector, and ii) thereafter recovering the ORF2 in the supernate. It has been unexpectedly discovered that ORF2 is released into the supernate in large quantities if the infection and subsequent incubation of the infected cells is allowed to progress past the typical prior PCV 2 ORF2 recovery process, which extracts the PCV2 ORF2 from within

cells. It furthermore has been surprisingly found, that PCV ORF2 protein is robust against prototypical degradation outside of the production cells. Both findings together allow a recovery of high amounts of PCV2 ORF2 protein from the supernate of cell cultures infected with recombinant viral vectors containing a PCV2 ORF2 DNA and expressing the PCV2 ORF2 protein. High amounts of PCV2 ORF2 protein means more than about 20 µg/mL supernate, preferably more than about 25 µg/mL, even more preferred more than about 30 µg/mL, even more preferred more than about 40 µg/mL, even more preferred more than about 50 µg/mL, even more preferred more than about 60 µg/mL, even more preferred more than about 80 µg/mL, even more preferred more than about 100 µg/mL, even more preferred than about 150 µg/mL, most preferred than about 190 µg/mL. Those expression rates can also be achieved for example by the methods as described in Examples 1 to 3.

Preferred cell cultures have a cell count between about $0.3 - 2.0 \times 10^6$ cells/mL, more preferably from about $0.35 - 1.9 \times 10^6$ cells/mL, still more preferably from about $0.4 - 1.8 \times 10^6$ cells/mL, even more preferably from about $0.45 - 1.7 \times 10^6$ cells/mL, and most preferably from about $0.5 - 1.5 \times 10^6$ cells/mL. Preferred cells are determinable by those of skill in the art. Preferred cells are those susceptible for infection with an appropriate recombinant viral vector, containing a PCV2 ORF2 DNA and expressing the PCV2 ORF2 protein. Preferably the cells are insect cells, and more preferably, they include the insect cells sold under the trademark Sf+ insect cells (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT).

Appropriate growth media will also be determinable by those of skill in the art with a preferred growth media being serum-free insect cell media such as Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) and the like. Preferred viral vectors include baculovirus such as BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), in particular if the production cells are insect cells. Although the baculovirus expression system is preferred, it is

understood by those of skill in the art that other expression systems will work for purposes of the present invention, namely the expression of PCV2 ORF2 into the supernatant of a cell culture. Such other expression systems may require the use of a signal sequence in order to cause ORF2 expression into the media. It has been surprisingly discovered that when ORF2 is produced by a baculovirus expression system, it does not require any signal sequence or further modification to cause expression of ORF2 into the media. It is believed that this protein can independently form virus-like particles (Journal of General Virology Vol. 81, pp. 2281-2287 (2000) and be secreted into the culture supernate. The recombinant viral vector containing the PCV2 ORF2 DNA sequences has a preferred multiplicity of infection (MOI) of between about 0.03 - 1.5, more preferably from about 0.05 - 1.3, still more preferably from about 0.09 - 1.1, and most preferably from about 0.1 - 1.0, when used for the infection of the susceptible cells. Preferably the MOIs mentioned above relates to one mL of cell culture fluid. Preferably, the method described herein comprises the infection of $0.35 - 1.9 \times 10^6$ cells/mL, still more preferably of about $0.4 - 1.8 \times 10^6$ cells/mL, even more preferably of about $0.45 - 1.7 \times 10^6$ cells/mL, and most preferably of about $0.5 - 1.5 \times 10^6$ cells/mL with a recombinant viral vector containing a PCV2 ORF2 DNA and expressing the PCV2 ORF protein having a MOI (multiplicity of infection) of between about 0.03 - 1.5, more preferably from about 0.05 - 1.3, still more preferably from about 0.09 - 1.1, and most preferably from about 0.1 - 1.0.

The infected cells are then incubated over a period of up to ten days, more preferably from about two days to about ten days, still more preferably from about four days to about nine days, and most preferably from about five days to about eight days. Preferred incubation conditions include a temperature between about 22 - 32°C, more preferably from about 24 - 30°C, still more preferably from about 25 - 29°C, even more preferably from about 26 - 28°C,

and most preferably about 27°C. Preferably, the Sf⁺ cells are observed following inoculation for characteristic baculovirus-induced changes. Such observation may include monitoring cell density trends and the decrease in viability during the post-infection period. It was found that peak viral titer is observed 3-5 days after infection and peak ORF2 release from the cells into the supernate is obtained between days 5 and 8, and/or when cell viability decreases to less than 10%.

Thus, one aspect of the present invention provides an improved method of producing and/or recovering recombinant PCV2 ORF2 protein, preferably in amounts described above, by i) permitting infection of a number of susceptible cells (see above) in culture with a recombinant viral vector with a MOI as defined above, ii) expressing PCV2 ORF2 protein by the recombinant viral vector, and iii) thereafter recovering the PCV2 ORF2 in the supernate of cells obtained between days 5 and 8 after infection and/or cell viability decreases to less than 10%. Preferably, the recombinant viral vector is a recombinant baculovirus containing PCV2 ORF2 DNA coding sequences and the cells are Sf⁺ cells. Additionally, it is preferred that the culture be periodically examined for macroscopic and microscopic evidence of contamination or for atypical changes in cell morphology during the post-infection period. Any culture exhibiting any contamination should be discarded. Preferably, the expressed ORF2 recombinant protein is secreted by the cells into the surrounding growth media that maintains cell viability. The ORF2 is then recovered in the supernate surrounding the cells rather than from the cells themselves.

The recovery process preferably begins with the separation of cell debris from the expressed ORF2 in media via a separation step. Preferred separation steps include filtration, centrifugation at speeds up to about 20,000xg, continuous flow centrifugation, chromatographic separation using ion exchange or gel filtration, and conventional

immunoaffinity methods. Those methods are known to persons skilled in the art for example by (Harris and Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL press Oxford 1995). The most preferred separation methods include centrifugation at speeds up to about 20,000xg and filtration. Preferred filtration methods include dead-end microfiltration and tangential flow (or cross flow) filtration including hollow fiber filtration dead-end microfiltration. Of these, dead-end microfiltration is preferred. Preferred pore sizes for dead-end microfiltration are between about 0.30 - 1.35 μm , more preferably between about 0.35 - 1.25 μm , still more preferably between about 0.40 - 1.10 μm , and most preferably between about 0.45 - 1.0 μm . It is believed that any conventional filtration membrane will work for purposes of the present invention and polyethersulfone membranes are preferred. Any low weight nucleic acid species are removed during the filtration step.

Thus, one further aspect of the present invention provides an improved method of producing and/or recovering recombinant PCV2 ORF2 protein, preferably in amounts described above, by i) permitting infection of a number of susceptible cells (see above) in culture with a recombinant viral vector with a MOI as defined above, ii) expressing PCV ORF2 protein by the recombinant viral vector, iii) recovering the PCV2 ORF2 in the supernate of cells obtained between days 5 and 8 after infection and/or cell viability decreases to less than 10%, and, iv) separating cell debris from the expressed PCV2 ORF2 via a separation step. Preferably, the recombinant viral vector is a baculovirus containing ORF2 DNA coding sequences and the cells are SF+ cells. Preferred separation steps are those described above. Most preferred is a dead-end microfiltration using a membrane having a pore size between about 0.30 - 1.35 μm , more preferably between about 0.35 - 1.25 μm , still more preferably between about 0.40 - 1.10 μm , and most preferably between about 0.45 - 1.0 μm .

For recovery of PCV2 ORF2 that will be used in an immunogenic or immunological composition such as a vaccine, the inclusion of an inactivation step is preferred in order to inactivate the viral vector. An "immunogenic or immunological composition" refers to a composition of matter that comprises at least one antigen which elicits an immunological response in the host of a cellular and/ or antibody-mediated immune response to the composition or vaccine of interest. Usually, an "immunological response" includes but is not limited to one or more of the following effects: the production or activation of antibodies, B cells, helper T cells, suppressor T cells, and/or cytotoxic T cells and/or yd T cells, directed specifically to an antigen or antigens included in the composition or vaccine of interest.

Preferably, the host will display either a therapeutic or protective immunological response such that resistance to new infection will be enhanced and/or the clinical severity of the disease reduced. Such protection will be demonstrated by either a reduction or lack of symptoms normally displayed by an infected host, a quicker recovery time and/or a lowered viral titer in the infected host. Thus, the present invention also relates to method of producing and/or recovering recombinant PCV2 ORF2 protein, preferably in amounts described above, by i) permitting infection of a number of susceptible cells (see above) in culture with a recombinant viral vector with a MOI as defined above, ii) expressing PCV ORF2 protein by the recombinant viral vector, iii) recovering the PCV2 ORF2 in the supernate of cells obtained between days 5 and 8 after infection and/or cell viability decreases to less than 10%, iv) separating cell debris from the expressed PCV2 ORF2 via a separation step, and v) inactivating the recombinant viral vector.

Preferably, this inactivation is done either just before or just after the filtration step, with after the filtration step being the preferred time for inactivation. Any conventional inactivation method can be used for purposes of the present invention. Thus, inactivation can

be performed by chemical and/or physical treatments. In preferred forms, the volume of harvest fluids is determined and the temperature is brought to between about 32 - 42°C, more preferably between about 34 - 40°C, and most preferably between about 35 - 39°C. Preferred inactivation methods include the addition cyclized binary ethylenimine (BEI), preferably in a concentration of about 1 to about 20 mM, preferably of about 2 to about 10 mM, still more preferably of about 2 to about 8 mM, still more preferably of about 3 to about 7 mM, most preferably of about 5 mM. For example the inactivation includes the addition of a solution of 2-bromoethylethylamine hydrobromide, preferably of about 0.4M, which has been cyclized to 0.2M binary ethylenimine (BEI) in 0.3N NaOH, to the fluids to give a final concentration of about 5mM BEI. Preferably, the fluids are then stirred continuously for 72 - 96 hours and the inactivated harvest fluids can be stored frozen at -40°C or below or between about 1 - 7°C. After inactivation is completed a sodium thiosulfate solution, preferably at 1.0M is added to neutralize any residual BEI. Preferably, the sodium thiosulfate is added in equivalent amount as compared to the BEI added prior to for inactivation. For example, in the event BEI is added to a final concentration of 5mM, a 1.0M sodium thiosulfate solution is added to give a final minimum concentration of 5 mM to neutralize any residual BEI.

Thus, one further aspect of the present invention relates to a method of producing recombinant PCV2 ORF2 protein, preferably in amounts described above, by i) permitting infection of a number of susceptible cells (see above) in culture with a recombinant viral vector with a MOI as defined above, ii) expressing PCV ORF2 protein by the recombinant viral vector, iii) recovering the PCV2 ORF2 in the supernate of cells obtained between days 5 and 8 after infection and/or cell viability decreases to less than 10%, iv) separating cell debris from the expressed PCV2 ORF2 via a separation step, and v) inactivating the recombinant viral vector. Preferably, the recombinant viral vector is a baculovirus containing ORF2 DNA

coding sequences and the cells are Sf+ cells. Preferred separation steps are those described above, most preferred is the filtration step. Preferred inactivation steps are those described above. Preferably, inactivation is performed between about 35 - 39°C and in the presence of 2 to 8 mM BEI, still more preferred in the presence of about 5 mM BEI. It has been surprisingly found, that higher concentrations of BEI negatively affect the PCV2 ORF2 protein.

According to one further aspect of the present invention, the method described above also includes an neutralization step after step v). This step vi) comprises adding of an equivalent amount of an agent that neutralizes the inactivation agent within the solution. Preferably, if the inactivation agent is BEI, addition of sodium thiosulfate to an equivalent amount is preferred. Thus, according to a further aspect, step vi) comprises adding of a sodium thiosulfate solution to a final concentration of about 1 to about 20 mM, preferably of about 2 to about 10 mM, still more preferably of about 2 to about 8 mM, still more preferably of about 3 to about 7 mM most preferably of about 5 mM, when the inactivation agent is BEI.

In preferred forms and especially in forms that will use the recombinant PCV2 ORF2 protein in an immunogenic composition such as a vaccine, each lot of harvested ORF2 will be tested for inactivation by passage in the anchorage dependent, baculovirus susceptible Sf+ cells. In a preferred form of this testing, 150 cm² of appropriate cell culture monolayer is inoculated with 1.0 mL of inactivated PCV2 fluids and maintained at 25 - 29°C for 14 days with at least two passages. At the end of the maintenance period, the cell monolayers are examined for cytopathogenic effect (CPE) typical of PCV2 ORF2 baculovirus. Preferably, positive virus controls are also used. Such controls can consist of one culture of Sf+ cells inoculated with a non-inactivated reference PCV2 ORF2 baculovirus and one flask of Sf+ cells that remain uninoculated. After incubation and passage, the absence of virus-infected cells in the BEI treated viral fluids would constitute a satisfactory inactivation test. The

control cells inoculated with the reference virus should exhibit CPE typical of PCV2 ORF2 baculovirus and the uninoculated flask should not exhibit any evidence of PCV2 ORF2 baculovirus CPE. Alternatively, at the end of the maintenance period, the supernatant samples could be collected and inoculated onto a Sf+ 96 well plate, which has been loaded with Sf+ cells, and then maintained at 25 - 29°C for 5 - 6 days. The plate is then fixed and stained with anti-PCV2 ORF2 antibody conjugated to FITC. The absence of CPE and ORF2 expression, as detected by IFA microscopy, in the BEI treated viral fluids constitutes a satisfactory inactivation test. The control cells inoculated with the reference virus should exhibit CPE and IFA activity and the uninoculated flask should not exhibit any evidence of PCV2 ORF2 baculovirus CPE and contain no IFA activity.

Thus a further aspect of the present invention relates to an inactivation test for determining the effectiveness of the inactivation of the recombination viral vector, comprises the steps: i) contacting at least a portion of the culture fluid containing the recombinant viral vector with an inactivating agent, preferably as described above, ii) adding a neutralization agent to neutralize the inactivation agent, preferably as described above, and iii) determining the residual infectivity by the assays as described above.

After inactivation, the relative amount of recombinant PCV2 ORF2 protein in a sample can be determined in a number of ways. Preferred methods of quantitation include SDS-PAGE densitometry, ELISA, and animal vaccination studies that correlate known quantities of vaccine with clinical outcomes (serology, etc.). When SDS-PAGE is utilized for quantitation, the sample material containing an unknown amount of recombinant PCV2 ORF2 protein is run on a gel, together with samples that contain different known amounts of recombinant PCV2 ORF2 protein. A standard curve can then be produced based on the known samples and the amount of recombinant PCV2 ORF2 in the unknown sample can be

determined by comparison with this standard curve. Because ELISAs are generally recognized as the industry standard for antigen quantitation, they are preferred for quantitation.

Thus, according to a further aspect, the present invention also relates to an ELISA for the quantification of recombinant PCV2 ORF2 protein. A preferred ELISA as provided herewith will generally begin with diluting the capture antibody 1:6000 or an appropriate working dilution in coating buffer. A preferred capture antibody is Swine anti-PCV2 PAb Prot. G purified, and a preferred coating buffer is 0.05M Carbonate buffer, which can be made by combining 2.93 g NaHCO_3 (Sigma Cat. No. S-6014, or equivalent) and 1.59 g NaCO_3 (Sigma Cat. No. S-6139, or equivalent). The mixture is combined with distilled water, or equivalent, to make one liter at a pH of 9.6 ± 0.1 . Next, the capture antibody is diluted 1:6000, or any other appropriate working dilution, in coating buffer. For example, for four plates, one would need 42 mLs of coating buffer and seven μL of capture antibody. Using a reverse pipetting method, 100 μL of diluted capture antibody is added to all of the wells. In order to obtain an even coating, the sides of each plate should be gently tapped. The plates are then sealed with plate sealers, prior to stacking the plates and capping the stack with an empty 96-well plate. The plates are incubated overnight (14-24 hours) at $35-39^\circ\text{C}$. Each plate is then washed three times with wash buffer using the ultra wash plus micro titer plate washer set at 250 μL /wash with three washes and no soak time. After the last wash, the plates should be tapped onto a paper towel. Again, using the reverse pipetting technique, 250 μL of blocking solution should be added to all of the wells. The test plates should be sealed and incubated for approximately one hour ($\pm$ five minutes) at $35-37^\circ\text{C}$. Preferably, the plates will not be stacked after this step. During the blocking step, all test samples should be pulled out and thawed at room temperature. Next, four separate dilution plates should be prepared

by adding 200 μ L of diluent solution to all of the remaining wells except for row A and row H, columns 1-3. Next, six test tubes should be labeled as follows, low titer, medium titer, high titer, inactivated/filtered (1:240), inactivated/filtered (1:480), and internal control. In the designated tubes, an appropriate dilution should be prepared for the following test samples.

5 The thawed test samples should be vortexed prior to use. For four plates, the following dilutions will be made: A) the low titer will not be pre-diluted: 3.0 mLs of low titer; B) negative control at a 1:30 dilution (SF+ cells): 3.77 mLs of diluent + 130 μ L of the negative control; C) medium titer at a 1:30 dilution (8 μ g/mL): 3.77 mLs of diluent + 130 μ L of the medium titer; D) high titer at a 1:90 dilution (16 μ g/mL): 2.967 mLs of diluent + 33 μ L of high titer; E) inactivated/ filtered at a 1:240 dilution: 2.39 mLs of diluent + 10 μ L of inactivated/ filtered sample; F) inactivated/ filtered at a 1:480 dilution: 1.0 mL of diluent + 1.0 mL of inact/ filtered (1:240) prepared sample from E above; G) internal control at 1:30 dilution: 3.77 mLs of diluent + 130 μ L of the internal control. Next, add 300 μ L of the prepared samples to corresponding empty wells in the dilution plates for plates 1 through 4.

15 The multichannel pipettor is then set to 100 μ L, and the contents in Row A are mixed by pipetting up and down for at least 5 times and then 100 μ L is transferred to Row B using the reverse pipetting technique. The tips should be changed and this same procedure is followed down the plate to Row G. Samples in these dilution plates are now ready for transfer to the test plates once the test plates have been washed 3 times with wash buffer using the ultrawash plus microtiter plate washer (settings at 250 μ L/wash, 3 washes, no soak time). After the last wash, the plates should be tapped onto a paper towel. Next, the contents of the dilution plate are transferred to the test plate using a simple transfer procedure. More specifically, starting at row H, 100 μ L/well is transferred from the dilution plate(s) to corresponding wells of the test plate(s) using reverse pipetting technique. After each transfer, the pipette tips should be

20

changed. From Row G, 100 μ L/well in the dilution plate(s) is transferred to corresponding wells of the test plate(s) using reverse pipetting technique. The same set of pipette tips can be used for the remaining transfer. To ensure a homogenous solution for the transfer, the solution should be pipetted up and down at least 3 times prior to transfer. Next, the test plate(s) are sealed and incubated for 1.0 hour $\pm$ 5 minutes at 37°C $\pm$ 2.0°C. Again, it is preferable not to stack the plates. The plates are then washed 3 times with wash buffer using the ultrawash plus microtiter plate washer (settings at 250 μ L/wash, 3 washes, and no soak time). After the last wash, the plates are tapped onto a paper towel. Using reverse pipetting technique, 100 μ L of detection antibody diluted 1:300, or appropriate working dilution, in diluent solution is added to all of the wells of the test plate(s). For example, for four plates, one will need 42 mLs of diluent solution with 140 μ L of capture antibody. The test plate(s) are then sealed and incubated for 1.0 hour $\pm$ 5 minutes at 37°C $\pm$ 2.0°C. Again, the plates are washed 3 times with wash buffer using the ultrawash plus microtiter plate washer (settings at 250 μ L/wash, 3 washes, and no soak time). After the last wash, the plates are tapped onto a paper towel. Next, the conjugate diluent is prepared by adding 1% normal rabbit serum to the diluent. For example, for four plates, 420 μ L of normal rabbit serum is added to 42 mL of diluent. The conjugate antibody is diluted to 1:10,000, or any other appropriate working dilution, in a freshly prepared conjugate diluent solution to all wells of the test plate(s). Using a reverse pipetting technique, 100 μ L of this diluted conjugate antibody is added to all the wells. The test plate(s) are then sealed and incubated for 45 $\pm$ 5 minutes at 37°C $\pm$ 2.0°C. Preferably, the plates are not stacked. The plates are then washed 3 times with wash buffer using the ultrawash plus microtiter plate washer (settings at 250 μ L/wash, 3 washes, and no soak time). After the last wash, the plates are tapped onto a paper towel. Next, equal volumes of TMB Peroxidase Substrate (Reagent A) with Peroxidase Solution B (Reagent B)

are mixed immediately prior to use. The amount mixed will vary depending upon the quantity of plates but each plate will require 10 mL/plate + 2 mLs. Therefore, for 4 plates, it will be 21 mL of Reagent A + 21 mL of Reagent B. Using a reverse pipetting technique, 100 μ L of substrate is added to all wells of the test plate(s). The plates are then incubated at room temperature for 15 minutes $\pm$ 15 seconds. The reaction is stopped by the addition of 100 μ L of 1N HCl solution to all wells using a reverse pipetting technique. The ELISA plate reader is then turned on and allowed to proceed through its diagnostics and testing phases in a conventional manner.

A further aspect of the invention relates to a method for constructing a recombinant viral vector containing PCV2 ORF2 DNA and expressing PCV2 ORF2 protein in high amounts, when infected into susceptible cells. It has been surprisingly found that the recombinant viral vector as provided herewith expresses high amounts, as defined above, of PCV2 ORF2 after infecting susceptible cells. Therefore, the present invention also relates to an improved method for producing and/or recovering of PCV2 ORF2 protein, preferably comprises the step: constructing a recombinant viral vector containing PCV2 ORF2 DNA and expressing PCV2 ORF2 protein. Preferably, the viral vector is a recombinant baculovirus. Details of the method for constructing recombinant viral vectors containing PCV2 ORF2 DNA and expressing PCV2 ORF2 protein, as provided herewith, are described to the following: In preferred forms the recombinant viral vector containing PCV2 ORF 2 DNA and expressing PCV2 ORF2 protein used to infect the cells is generated by transfecting a transfer vector that has had an ORF2 gene cloned therein into a viral vector. Preferably, only the portion of the transfer vector is transfected into the viral vector, that contains the ORF2 DNA. The term "transfected into a viral vector" means, and is used as a synonym for "introducing"

or "cloning" a heterologous DNA into a viral vector, such as for example into a baculovirus vector. The viral vector is preferably but not necessarily a baculovirus.

Thus, according to a further aspect of the present invention, the recombinant viral vector is generated by recombination between a transfer vector containing the heterologous PCV2 ORF2 DNA and a viral vector, preferably a baculovirus, even more preferably a linearized replication-deficient baculovirus (such as Baculo Gold DNA). A "transfer vector" means a DNA molecule, that includes at least one origin of replication, the heterologous gene, in the present case PCV2 ORF2, and DNA sequences which allows the cloning of said heterologous gene into the viral vector. Preferably the sequences which allow cloning of the heterologous gene into the viral vector are flanking the heterologous gene. Even more preferably those flanking sequences are at least homologous in parts with sequences of the viral vector. The sequence homology then allows recombination of both molecules, the viral vector and the transfer vector to generate a recombinant viral vector containing the heterologous gene. One preferred transfer vector is the pVL1392 vector (BD Biosciences Pharmingen), which is designed for co-transfection with the BaculoGold DNA into the preferred Sf+ cell line. Preferably, said transfer vector comprises a PCV2 ORF2 DNA. The construct co-transfected is approximately 10,387 base pairs in length.

In more preferred forms, the methods of the present invention will begin with the isolation of PCV2 ORF2 DNA. Generally, this can be from a known or unknown strain as the ORF2 DNA appears to be highly conserved with at least about 95% sequence identity between different isolates. Any PCV2 ORF2 gene known in the art can be used for purposes of the present invention as each would be expressed into the supernate. The PCV ORF2 DNA is preferably amplified using PCR methods, even more preferred together with the introduction of a 5' flanking Kozak's consensus sequence (CCGCCAUG) (SEQ ID NO 1)

and/or a 3' flanking EcoR1 site (GAATTC) (SEQ ID NO 2). Such introduction of a 5' Kozak's consensus preferably removes the naturally occurring start codon AUG of PCV2 ORF2. The 3' EcoR1 site is preferably introduced downstream of the stop codon of the PCV2 ORF2. More preferably it is introduced downstream of a poly A transcription termination sequence, that itself is located downstream of the PCV2 ORF2 stop codon. It has been found, that the use of a Kozak consensus sequence, in particular as described above, increases the expression level of the subsequent PCV2 ORF2 protein. The amplified PCV2 ORF2 DNA, with these additional sequences, is cloned into a vector. A preferred vector for this initial cloning step is the pGEM-T-Easy Vector (Promega, Madison, WI). The PCV2 ORF2 DNA including some pGEM vector sequences (SEQ ID NO: 7) is preferably excised from the vector at the Not1 restriction site. The resulting DNA is then cloned into the transfer vector.

Thus, in one aspect of the present invention, a method for constructing a recombinant viral vector containing PCV2 ORF2 DNA is provided. This method comprises the steps: i) cloning a recombinant PCV2 ORF2 into a transfer vector; and ii) transfecting the portion of the transfer vector containing the recombinant PCV2 ORF2 into a viral vector, to generate the recombinant viral vector. Preferably, the transfer vector is that described above or is constructed as described above or as exemplarily shown in Figure 1. Thus according to a further aspect, the transfer vector, used for the construction of the recombinant viral vector as described herein, contains the sequence of SEQ ID NO: 7.

According to a further aspect, this method further comprises prior to step i) the following step: amplifying the PCV2 ORF2 DNA *in vitro*, wherein the flanking sequences of the PCV2 ORF2 DNA are modified as described above. *In vitro* methods for amplifying the PCV2 ORF2 DNA and modifying the flanking sequences, cloning *in vitro* amplified PCV2 ORF2 DNA into a transfer vector and suitable transfer vectors are described above,

exemplarily shown in Figure 1, or known to a person skilled in the art. Thus according to a further aspect, the present invention relates to a method for constructing a recombinant viral vector containing PCV2 ORF2 DNA and expressing PCV2 ORF2 protein comprises the steps of: i) amplifying PCV2 ORF2 DNA in vitro, wherein the flanking sequences of said PCV2 ORF2 DNA are modified, ii) cloning the amplified PCV2 ORF2 DNA into a transfer vector; and iii) transfecting the transfer vector or a portion thereof containing the recombinant PCV2 ORF2 DNA into a viral vector to generate the recombinant viral vector. Preferably, the modification of the flanking sequences of the PCV2 ORF2 DNA is performed as described above, e.g. by introducing a 5' Kozak sequence and /or a EcoR 1 site, preferably as described above.

According to a further aspect, a method of producing and/or recovering recombinant protein expressed by open reading frame 2 of PCV2 is provided. The method generally comprises the steps of: i) cloning a recombinant PCV2 ORF2 into a transfer vector; ii) transfecting the portion of the transfer vector containing the recombinant PCV2 ORF2 into a virus; iii) infecting cells in media with the transfected virus; iv) causing the transfected virus to express the recombinant protein from PCV2 ORF2; v) separating cells from the supernate; and vi) recovering the expressed PCV2 ORF2 protein from the supernate.

Methods of how to clone a recombinant PCV2 ORF2 DNA into a transfer vector are described above. Preferably, the transfer vector contains the sequence of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7. However, the transfer vector can contain any PCV2 ORF2 DNA, unmodified or modified, as long as the PCV2 ORF2 DNA, when transfected into a recombinant viral vector, is expressed in cell culture. Preferably, the recombinant viral vector comprises the sequence of SEQ ID NO:8. Moreover, methods of how to infect cells, preferably how to infect insect cells with a defined number of recombinant baculovirus

containing PCV2 ORF2 DNA and expressing PCV2 ORF2 protein are described above in detail. Moreover, steps of separating cells from the supernate as well as steps for recovering the expressed PCV2 ORF2 protein are also described above in detail. Any of these specific process steps, as described herein, are part of the method of producing and/or recovering

5 recombinant protein expressed by open reading frame 2 of PCV2 as described above. Preferably, the cells are SF+ cells. Still more preferably, cell cultures have a cell count between about $0.3 - 2.0 \times 10^6$ cells/mL, more preferably from about $0.35 - 1.9 \times 10^6$ cells/mL, still more preferably from about $0.4 - 1.8 \times 10^6$ cells/mL, even more preferably from about $0.45 - 1.7 \times 10^6$ cells/mL, and most preferably from about $0.5 - 1.5 \times 10^6$ cells/mL.

10 Preferably, the recombinant viral vector containing the PCV2 ORF2 DNA has a preferred multiplicity of infection (MOI) of between about 0.03 - 1.5, more preferably from about 0.05 - 1.3, still more preferably from about 0.09 - 1.1, still more preferably from about 0.1 - 1.0, and most preferably to about 0.5, when used for the infection of the susceptible cells. Preferably, recovering of the PCV2 ORF2 protein in the supernate of cells obtained between

15 days 5 and 8 after infection and/or cell viability decreases to less than 10%. Preferably, for producing PCV2 ORF2 protein, cells are cultivated at 25 to 29°C. Preferably, the separation step is a centrifugation or a filtration step.

Optionally, this method can include the step of amplifying the PCV2 ORF2 DNA from a strain of PCV2 prior to cloning the PCV2 ORF2 DNA into the transfer vector. In

20 preferred forms, a 5' Kozak's sequence, a 3' EcoR1 site, and combinations thereof can also be added to the amplified sequence, preferably prior to or during amplification. A preferred 5' Kozak's sequence comprises SEQ ID NO: 1. A preferred 3' EcoR1 site comprises SEQ ID NO: 2. Preferred PCV2 ORF2 DNA comprises the nucleotide sequence Genbank Accession No. AF086834 (SEQ ID NO: 3) and SEQ ID NO: 4. Preferred recombinant PCV2 ORF2

protein comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5, which is the protein encoded by SEQ ID NO: 3 (Genbank Accession No. AF086834) and SEQ ID No: 6, which is the protein encoded by SEQ ID NO: 4. A preferred media comprises serum-free insect cell media, still more preferably Excell 420 media. When the optional amplification step is performed, it is preferable to first clone the amplified open reading frame 2 into a first vector, excise the open reading frame 2 from the first vector, and use the excised open reading frame for cloning into the transfer vector. A preferred cell line for cotransfection is the SF+ cell line. A preferred virus for cotransfection is baculovirus. In preferred forms of this method, the transfected portion of the transfer vector comprises SEQ ID NO: 8. Finally, for this method, it is preferred to recover the PCV2 open reading frame 2 (ORF2) protein in the cell culture supernate at least 5 days after infecting the cells with the virus.

Thus, a further aspect of the invention relates to a method for producing and/or recovering the PCV2 open reading frame 2, comprises the steps: i) amplifying the PCV2 ORF2 DNA *in vitro*, preferably by adding a 5' Kozak sequence and/or by adding a 3' EcoR1 restriction site, ii) cloning the amplified PCV2 ORF2 into a transfer vector; iii) transfecting the portion of the transfer vector containing the recombinant PCV2 ORF2 into a virus; iv) infecting cells in media with the transfected virus; v) causing the transfected virus to express the recombinant protein from PCV2 ORF2; vi) separating cells from the supernate; and vii) recovering the expressed PCV2 ORF2 protein from the supernate.

A further aspect of the present invention relates to a method for preparing a composition comprising PCV2 ORF2 protein, and inactivated viral vector. This method comprises the steps: i) cloning the amplified PCV2 ORF2 into a transfer vector; ii) transfecting the portion of the transfer vector containing the recombinant PCV2 ORF2 into a virus; iii) infecting cells in media with the transfected viral vector; iv) causing the transfected

viral vector to express the recombinant protein from PCV2 ORF2; v) separating cells from the supernate; vi) recovering the expressed PCV2 ORF2 protein from the supernate; and vii) inactivating the recombinant viral vector. Preferably, the recombinant viral vector is a baculovirus containing ORF2 DNA coding sequences and the cells are SF+ cells. Preferred separation steps are those described above, most preferred is the filtration step. Preferred inactivation steps are those described above. Preferably, inactivation is performed between about 35 - 39°C and in the presence of 2 to 8 mM BEI, still more preferred in the presence of about 5 mM BEI. It has been surprisingly found, that higher concentrations of BEI negatively affect the PCV2 ORF2 protein, and lower concentrations are not effective to inactivate the viral vector within 24 to 72 hours of inactivation. Preferably, inactivation is performed for at least 24 hours, even more preferred for 24 to 72 hours.

According to a further aspect, the method for preparing a composition comprising PCV2 ORF2 protein, and inactivated viral vector, as described above, also includes an neutralization step after step vii). This step viii) comprises adding of an equivalent amount of an agent that neutralizes the inactivation agent within the solution. Preferably, if the inactivation agent is BEI, addition of sodium thiosulfate to an equivalent amount is preferred. Thus, according to a further aspect, step viii) comprises adding of a sodium thiosulfate solution to a final concentration of about 1 to about 20 mM, preferably of about 2 to about 10 mM, still more preferably of about 2 to about 8 mM, still more preferably of about 3 to about 7 mM, most preferably of about 5 mM, when the inactivation agent is BEI.

According to a further aspect, the method for preparing a composition comprising PCV2 ORF2 protein, and inactivated viral vector, as described above, comprises prior to step i) the following step: amplifying the PCV2 ORF2 DNA *in vitro*, wherein the flanking sequences of the PCV2 ORF2 DNA are modified as described above. *In vitro* methods for

amplifying the PCV2 ORF2 DNA and modifying the flanking sequences, cloning *in vitro* amplified PCV2 ORF2 DNA into a transfer vector and suitable transfer vectors are described above, exemplarily shown in Figure 1, or known to a person skilled in the art. Thus according to a further aspect, this method comprises the steps: i) amplifying PCV2 ORF2 DNA *in vitro*,
 5 wherein the flanking sequences of said PCV2 ORF2 DNA are modified, ii) cloning the amplified PCV2 ORF2 DNA into a transfer vector; and iii) transfecting the transfer vector or a portion thereof containing the recombinant PCV2 ORF2 DNA into a viral vector to generate the recombinant viral vector, iv) infecting cells in media with the transfected virus; v) causing the transfected virus to express the recombinant protein from PCV2 ORF2; vi) separating
 10 cells from the supernate; vii) recovering the expressed PCV2 ORF2 protein from the supernate; viii) inactivating the recombinant viral vector, preferably, in the presence of about 1 to about 20 mM BEI, most preferred in the presence of about 5 mM BEI; and ix) adding of an equivalent amount of an agent that neutralizes the inactivation agent within the solution, preferably, adding of a sodium thiosulfate solution to a final concentration of about 1 to about
 15 20 mM, preferably of about 5 mM, when the inactivation agent is BEI.

In another aspect of the present invention, a method for preparing a composition, preferably an antigenic composition, such as for example a vaccine, for invoking an immune response against PCV2 is provided. Generally, this method includes the steps of transfecting a construct into a virus, wherein the construct comprises i) recombinant DNA from ORF2 of
 20 PCV2, ii) infecting cells in growth media with the transfected virus, iii) causing the virus to express the recombinant protein from PCV2 ORF2, iv) recovering the expressed ORF2 protein from the supernate, v) and preparing the composition by combining the recovered protein with a suitable adjuvant and/or other pharmaceutically acceptable carrier.

“Adjuvants” as used herein, can include aluminum hydroxide and aluminum

phosphate, saponins e.g., Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), water-in-oil emulsion, oil-in-water emulsion, water-in-oil-in-water emulsion. The emulsion can be based in particular on light liquid paraffin oil (European Pharmacopea type); isoprenoid oil such as squalane or squalene
5 ; oil resulting from theoligomerization of alkenes, in particular of isobutene or decene; esters of acids or of alcohols containing a linear alkyl group, more particularly plant oils, ethyl oleate, propylene glycol di-(caprylate/caprate), glyceryl tri-(caprylate/caprate) or propylene glycol dioleate; esters of branched fatty acids or alcohols, in particular isostearic acid esters. The oil is used in combination with emulsifiers to form the emulsion. The emulsifiers are
10 preferably nonionic surfactants, in particular esters of sorbitan, of mannide (e.g. anhydromannitol oleate), of glycol, of polyglycerol, of propylene glycol and of oleic, isostearic, ricinoleic or hydroxystearic acid, which are optionally ethoxylated, and polyoxypropylene-polyoxyethylene copolymer blocks, in particular the Pluronic products, especially L121. See Hunter et al., The Theory and Practical Application of Adjuvants
15 (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). JohnWiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) and Todd et al., Vaccine 15:564-570 (1997).

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

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

are known by the term carbomer (Phameuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Persons skilled in the art can also refer to U. S. Patent No. 2,909,462 which describes such acrylic polymers cross-linked with a polyhydroxylated compound having at least 3 hydroxyl groups, preferably not more than 8, the hydrogen atoms of at least three hydroxyls being replaced by unsaturated aliphatic radicals having at least 2 carbon atoms. The preferred radicals are those containing from 2 to 4 carbon atoms, e.g. vinyls, allyls and other ethylenically unsaturated groups. The unsaturated radicals may themselves contain other substituents, such as methyl. The products sold under the name Carbopol ; (BF Goodrich, Ohio, USA) are particularly appropriate. They are cross-linked with an allyl sucrose or with allyl pentaerythritol. Among them, there may be mentioned Carbopol 974P, 934P and 971P. Most preferred is the use of Carbopol 971P. Among the copolymers of maleic anhydride and alkenyl derivative, the copolymers EMA (Monsanto) which are copolymers of maleic anhydride and ethylene. The dissolution of these polymers in water leads to an acid solution that will be neutralized, preferably to physiological pH, in order to give the adjuvant solution into which the immunogenic, immunological or vaccine composition itself will be incorporated.

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

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

µg to about 2.5 mg per dose. Most preferred the adjuvant is added in an amount of about 1 mg per dose.

Thus, according to a further aspect, the method for preparing an antigenic composition, such as for example a vaccine, for invoking an immune response against PCV2 comprises i) preparing and recovering PCV2 ORF2 protein, and ii) admixing this with a suitable adjuvant. Preferably, the adjuvant is Carbopol 971P. Even more preferred, Carbopol 971P is added in an amount of about 500 µg to about 5 mg per dose, even more preferred in an amount of about 750 µg to about 2.5 mg per dose and most preferred in an amount of about 1 mg per dose. Preferably, the process step i) includes the process steps as described for the preparation and recovery of PCV2 ORF2. For example, in preferred forms of this method, the construct comprising PCV2 ORF2 DNA is obtained in a transfer vector. Suitable transfer vectors and methods of preparing them are described above. Optionally, the method may include the step of amplifying the ORF2 from a strain of PCV2 through PCR prior to cloning the ORF2 into the transfer vector. Preferred open reading frame sequences, Kozak's sequences, 3' EcoR1 site sequences, recombinant protein sequences, transfected construct sequences, media, cells, and viruses are as described in the previous methods. Another optional step for this method includes cloning the amplified PCV2 ORF2 DNA into a first vector, excising the ORF2 DNA from this first vector, and using this excised PCV2 ORF2 DNA for cloning into the transfer vector. As with the other methods, it is preferred to wait for at least 5 days after infection of the cells by the transfected baculovirus prior to recovery of recombinant ORF2 protein from the supernate. Preferably, the recovery step of this method also includes the step of separating the media from the cells and cell debris. This can be done in a variety of ways but for ease and convenience, it is preferred to filter the cells, cell debris, and growth media through a filter having pores ranging in size from about 0.45 µm to

about 1.0 μ M. Finally, for this method, it is preferred to include a virus inactivation step prior to combining the recovered recombinant PCV2 ORF2 protein in a composition. This can be done in a variety of ways, but it is preferred in the practice of the present invention to use BEI.

5 Thus according to a further aspect, this method comprises the steps: i) amplifying PCV2 ORF2 DNA *in vitro*, wherein the flanking sequences of said PCV2 ORF2 DNA are modified, ii) cloning the amplified PCV2 ORF2 DNA into a transfer vector; and iii) transfecting the transfer vector or a portion thereof containing the recombinant PCV2 ORF2 DNA into a viral vector to generate the recombinant viral vector, iv) infecting cells in media
10 with the transfected virus; v) causing the transfected virus to express the recombinant protein from PCV2 ORF2; vi) separating cells from the supernate; vii) recovering the expressed PCV2 ORF2 protein from the supernate; viii) inactivating the recombinant viral vector, preferably, in the presence of about 1 to about 20 mM BEI, most preferred in the presence of about 5 mM BEI; ix) adding of an equivalent amount of an agent that neutralizes the
15 inactivation agent within the solution, preferably, adding of a sodium thiosulfate solution to a final concentration of about 1 to about 20 mM, preferably of about 5 mM, when the inactivation agent is BEI, and x) adding a suitable amount of an adjuvant, preferably adding Carbopol, more preferably Carbopol 971P, even more preferred in amounts as described above (e.g. of about 500 μ g to about 5 mg per dose, even more preferred in an amount of
20 about 750 μ g to about 2.5 mg per dose and most preferred in an amount of about 1 mg per dose).

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

antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like. Most preferred, the composition provided herewith, contains PCV2 ORF2 protein recovered from the supernate of *in vitro* cultured cells, wherein said cells were infected with a recombinant viral vector containing PCV2 ORF2 DNA and expressing PCV2 ORF2 protein, and wherein said
5 cell culture were treated with about 2 to about 8 mM BEI, preferably with about 5 mM BEI to inactivate the viral vector, and an equivalent concentration of a neutralization agent, preferably sodium thiosulfate solution to a final concentration of about 2 to about 8 mM, preferably of about 5 mM, Carbopol, more preferably Carbopol 971P, preferably in amounts of about 500 µg to about 5 mg per dose, even more preferred in an amount of about 750 µg to
10 about 2.5 mg per dose and most preferred in an amount of about 1 mg per dose, and physiological saline, preferably in an amount of about 50 to about 90% (v/v), more preferably to about 60 to 80% (v/v), still more preferably of about 70% (v/v).

Thus, a further aspect relates to a method for preparing an antigenic composition, such as for example a vaccine, for invoking an immune response against PCV2 comprising the
15 steps: i) amplifying PCV2 ORF2 DNA *in vitro*, wherein the flanking sequences of said PCV2 ORF2 DNA are modified, ii) cloning the amplified PCV2 ORF2 DNA into a transfer vector; and iii) transfecting the transfer vector or a portion thereof containing the recombinant PCV2 ORF2 DNA into a viral vector to generate the recombinant viral vector, iv) infecting cells in media with the transfected virus; v) causing the transfected virus to express the recombinant
20 protein from PCV2 ORF2; vi) separating cells from the supernate; vii) recovering the expressed PCV2 ORF2 protein from the supernate; viii) inactivating the recombinant viral vector, preferably, in the presence of about 2 to about 20 mM BEI, most preferred in the presence of about 5 mM BEI; ix) adding of an equivalent amount of an agent that neutralize the inactivation agent within the solution, preferably, adding of a sodium thiosulfate solution

to a final concentration of about 0.5 to about 20 mM, preferably of about 5 mM, when the inactivation agent is BEI, x) adding a suitable amount of an adjuvants, preferably adding Carbopol, more preferably Carbopol 971P, still more preferred in amounts as described above (e.g. of about 500 µg to about 5 mg per dose, even more preferred in an amount of about 750 µg to about 2.5 mg per dose and most preferred in an amount of about 1 mg per dose); and xi) adding physiological saline, preferably in an amount of about 50 to about 90% (v/v), more preferably to about 60 to 80% (v/v), still more preferably of about 70% (v/v). Optionally, this method can also include the addition of a protectant. A protectant as used herein, refers to an anti-microbiological active agent, such as for example Gentamycin, Merthiolate, and the like. In particular adding of a protectant is most preferred for the preparation of a multi-dose composition. Those anti-microbiological active agents are added in concentrations effective to prevent the composition of interest for any microbiological contamination or for inhibition of any microbiological growth within the composition of interest.

Moreover, this method can also comprise addition of any stabilizing agent, such as for example saccharides, trehalose, mannitol, saccharose and the like, to increase and/or maintain product shelf-life. However, it has been surprisingly found, that the resulting formulation is immunologically effective over a period of at least 24 months, without adding any further stabilizing agent.

A further aspect of the present invention relates to the products result from the methods as described above. In particular, the present invention relates to a composition of matter comprises recombinantly expressed PCV2 ORF2 protein. Moreover, the present invention also relates to a composition of matter that comprises recombinantly expressed PCV2 ORF2 protein, recovered from the supernate of an insect cell culture. Moreover, the present invention also relates to a composition of matter comprises recombinantly expressed

PCV2 ORF2 protein, recovered from the supernate of an insect cell culture. Preferably, this composition of matter also comprises an agent suitable for the inactivation of viral vectors. Preferably, said inactivation agent is BEI. Moreover, the present invention also relates to a composition of matter that comprises recombinantly expressed PCV2 ORF2 protein,
5 recovered from the supernate of an insect cell culture, and comprises an agent, suitable for the inactivation of viral vectors, preferably BEI and a neutralization agent for neutralization of the inactivation agent. Preferably, that neutralization agent is sodium thiosulfate, when BEI is used as an inactivation agent.

In yet another aspect of the present invention, an immunogenic composition that
10 induces an immune response and, more preferably, confers protective immunity against the clinical signs of PCV2 infection, is provided. The composition generally comprises the polypeptide, or a fragment thereof, expressed by Open Reading Frame 2 (ORF2) of PCV2, as the antigenic component of the composition.

PCV2 ORF2 DNA and protein, as used herein for the preparation of the compositions
15 and also as used within the processes provided herein is a highly conserved domain within PCV2 isolates and thereby, any PCV2 ORF2 would be effective as the source of the PCV ORF2 DNA and/or polypeptide as used herein. A preferred PCV2 ORF2 protein is that of SEQ ID NO. 11. A preferred PCV ORF2 polypeptide is provided herein as SEQ ID NO. 5, but it is understood by those of skill in the art that this sequence could vary by as much as 6-
20 10% in sequence homology and still retain the antigenic characteristics that render it useful in immunogenic compositions. The antigenic characteristics of an immunological composition can be, for example, estimated by the challenge experiment as provided by Example 4. Moreover, the antigenic characteristic of an modified antigen is still retained, when the modified antigen confers at least 70%, preferably 80%, more preferably 90% of the protective

immunity as compared to the PCV2 ORF 2 protein, encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4. An “immunogenic composition” as used herein, means a PCV2 ORF2 protein which elicits an “immunological response” in the host of a cellular and/or antibody-mediated immune response to PCV2 ORF2 protein. Preferably, this

5 immunogenic composition is capable to confer protective immunity against PCV2 infection and the clinical signs associated therewith. In some forms, immunogenic portions of PCV2 ORF2 protein are used as the antigenic component in the composition. The term “immunogenic portion” as used herein refers to truncated and/or substituted forms, or fragments of PCV2 ORF2 protein and/or polynucleotide, respectively. Preferably, such

10 truncated and/or substituted forms, or fragments will comprise at least 6 contiguous amino acids from the full-length ORF2 polypeptide. More preferably, the truncated or substituted forms, or fragments will have at least 10, more preferably at least 15, and still more preferably at least 19 contiguous amino acids from the full-length ORF2 polypeptide. Two preferred sequences in this respect are provided herein as SEQ ID NOs. 9 and 10. It is further

15 understood that such sequences may be a part of larger fragments or truncated forms. A further preferred PCV2 ORF2 polypeptide provided herein is encoded by the nucleotide sequences of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4. But it is understood by those of skill in the art that this sequence could vary by as much as 6-20% in sequence homology and still retain the antigenic characteristics that render it useful in immunogenic compositions. In some forms, a

20 truncated or substituted form, or fragment of ORF2 is used as the antigenic component in the composition. Preferably, such truncated or substituted forms, or fragments will comprise at least 18 contiguous nucleotides from the full-length ORF2 nucleotide sequence, e.g. of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4. More preferably, the truncated or substituted forms, or fragments will have at least 30, more preferably at least 45, and still more preferably at least 57

contiguous nucleotides the full-length ORF2 nucleotide sequence, e.g. of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4.

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

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

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

“Sequence homology”, as used herein, refers to a method of determining the relatedness of two sequences. To determine sequence homology, two or more sequences are optimally aligned, and gaps are introduced if necessary. However, in contrast to “sequence identity”, conservative amino acid substitutions are counted as a match when determining sequence homology. In other words, to obtain a polypeptide or polynucleotide having 95% sequence homology with a reference sequence, 85%, preferably 90%, even more preferably 95% of the amino acid residues or nucleotides in the reference sequence must match or comprise a conservative substitution with another amino acid or nucleotide, or a number of

amino acids or nucleotides up to 15%, preferably up to 10%, even more preferably up to 5% of the total amino acid residues or nucleotides, not including conservative substitutions, in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. Preferably the homolog sequence comprises at least a stretch of 50, even more preferred of 100, even more preferred of 250, even more preferred of 500 nucleotides.

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

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

Thus, a further aspect of the present invention relates to an immunogenic composition effective for lessening the severity of clinical symptoms associated with PCV2 infection comprising PCV2 ORF2 protein. Preferably, the PCV2 ORF2 protein is anyone of those, described above. Preferably, said PCV2 ORF2 protein is

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

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

Preferably any of those immunogenic portions having the immunogenic characteristics of PCV2 ORF2 protein that is encoded by the sequence of SEQ ID NO: 3 or

15 SEQ ID NO: 4.

According to a further aspect, PCV2 ORF2 protein is provided in the immunological composition at an antigen inclusion level effective for inducing the desired immune response, namely reducing the incidence of or lessening the severity of clinical signs resulting from PCV2 infection. Preferably, the PCV2 ORF2 protein inclusion level is at least 0.2 μg antigen

20 / ml of the final immunogenic composition ($\mu\text{g}/\text{ml}$), more preferably from about 0.2 to about 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 0.3 to about 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, even more preferably from about 0.35 to about 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 0.4 to about 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 0.45 to about 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, still more preferably from about 0.6 to about 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, even more preferably from about 0.75 to about 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, even more

preferably from about 1.0 to about 6 $\mu\text{g/ml}$, still more preferably from about 1.3 to about 3.0 $\mu\text{g/ml}$, even more preferably from about 1.4 to about 2.5 $\mu\text{g/ml}$, even more preferably from about 1.5 to about 2.0 $\mu\text{g/ml}$, and most preferably about 1.6 $\mu\text{g/ml}$.

According to a further aspect, the ORF2 antigen inclusion level is at least 0.2 μg PCV2 ORF2 protein as described above per dose of the final antigenic composition ($\mu\text{g/dose}$), more preferably from about 0.2 to about 400 $\mu\text{g/dose}$, still more preferably from about 0.3 to about 200 $\mu\text{g/dose}$, even more preferably from about 0.35 to about 100 $\mu\text{g/dose}$, still more preferably from about 0.4 to about 50 $\mu\text{g/dose}$, still more preferably from about 0.45 to about 30 $\mu\text{g/dose}$, still more preferably from about 0.6 to about 15 $\mu\text{g/dose}$, even more preferably from about 0.75 to about 8 $\mu\text{g/dose}$, even more preferably from about 1.0 to about 6 $\mu\text{g/dose}$, still more preferably from about 1.3 to about 3.0 $\mu\text{g/dose}$, even more preferably from about 1.4 to about 2.5 $\mu\text{g/dose}$, even more preferably from about 1.5 to about 2.0 $\mu\text{g/dose}$, and most preferably about 1.6 $\mu\text{g/dose}$.

The PCV2 ORF2 polypeptide used in an immunogenic composition in accordance with the present invention can be derived in any fashion including isolation and purification of PCV2 ORF2, standard protein synthesis, and recombinant methodology. Preferred methods for obtaining PCV2 ORF2 polypeptide are described herein above and are also provided in U.S. Patent Application Serial No. 11/034,797, the teachings and content of which are hereby incorporated by reference. Briefly, susceptible cells are infected with a recombinant viral vector containing PCV2 ORF2 DNA coding sequences, PCV2 ORF2 polypeptide is expressed by the recombinant virus, and the expressed PCV2 ORF2 polypeptide is recovered from the supernate by filtration and inactivated by any conventional method, preferably using binary ethylenimine, which is then neutralized to stop the inactivation process.

Thus, according to a further aspect the immunogenic composition comprises i) any of the PCV2 ORF2 protein described above, preferably in concentrations described above, and ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF2 protein, preferably of a recombinant baculovirus. Moreover, according to a further aspect, the immunogenic composition comprises i) any of the PCV2 ORF2 protein described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF2 protein, preferably of a recombinant baculovirus, and iii) a portion of the cell culture supernate.

According to one specific embodiment of the production and recovery process for PCV2 ORF2 protein, the cell culture supernate is filtered through a membrane having a pore size, preferably between about 0.45 to 1 μm . Thus, a further aspect relates to an immunogenic composition that comprises i) any of the PCV2 ORF2 protein described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF2 protein, preferably of a recombinant baculovirus, and iii) a portion of the cell culture; wherein about 90% of the components have a size smaller than 1 μm .

According to a further aspect, the present invention relates to an immunogenic composition that comprises i) any of the PCV2 ORF2 protein described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF2 protein, iii) a portion of the cell culture, iv) and inactivating agent to inactivate the recombinant viral vector preferably BEI, wherein about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 μm . Preferably, BEI is present in concentrations effective to inactivate the baculovirus. Effective concentrations are described above.

According to a further aspect, the present invention relates to an immunogenic composition that comprises i) any of the PCV2 ORF2 protein described above, preferably in

concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF2 protein, iii) a portion of the cell culture, iv) an inactivating agent to inactivate the recombinant viral vector preferably BEI, and v) an neutralization agent to stop the inactivation mediated by the inactivating agent, wherein about 90% of the components i) to
5 iii) have a size smaller than 1 μm . Preferably, if the inactivating agent is BEI, said composition comprises sodium thiosulfate in equivalent amounts to BEI.

The polypeptide is incorporated into a composition that can be administered to an animal susceptible to PCV2 infection. In preferred forms, the composition may also include additional components known to those of skill in the art (see also Remington's
10 Pharmaceutical Sciences. (1990). 18th ed. Mack Publ., Easton). Additionally, the composition may include one or more veterinary-acceptable carriers. As used herein, "a veterinary-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like.

15 In a preferred embodiment, the immunogenic composition comprises PCV2 ORF2 protein as provided herewith, preferably in concentrations described above as an antigenic component, which is mixed with an adjuvant, preferably Carbopol, and physiological saline.

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

lactose, among others. Stabilizers include albumin and alkali salts of ethylenediaminetetracetic acid, among others. Suitable adjuvants, are those described above. Most preferred is the use of Carbopol, in particular the use of Carbopol 971P, preferably in amounts as described above (e.g. of about 500 μ g to about 5 mg per dose, even more preferred in an amount of about 750 μ g to about 2.5 mg per dose and most preferred in an amount of about 1 mg per dose).

Thus, the present invention also relates to an immunogenic composition that comprises i) any of the PCV2 ORF2 proteins described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF2 protein, iii) a portion of the cell culture, iv) an inactivating agent to inactivate the recombinant viral vector preferably BEI, and v) an neutralization agent to stop the inactivation mediated by the inactivating agent, preferably sodium thiosulfate in equivalent amounts to BEI; and vi) a suitable adjuvant, preferably Carbopol 971 in amounts described above; wherein about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 μ m. According to a further aspect, this immunogenic composition further comprises a pharmaceutical acceptable salt, preferably a phosphate salt in physiologically acceptable concentrations. Preferably, the pH of said immunogenic composition is adjusted to a physiological pH, meaning between about 6.5 and 7.5.

Thus, the present invention also relates to an immunogenic composition comprises per one ml i) at least 1.6 μ g of PCV2 ORF2 protein described above, ii) at least a portion of baculovirus expressing said PCV2 ORF2 protein iii) a portion of the cell culture, iv) about 2 to 8 mM BEI, v) sodium thiosulfate in equivalent amounts to BEI; and vi) about 1 mg Carbopol 971, and vii) phosphate salt in a physiologically acceptable concentration; wherein about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 μ m and the pH of said immunogenic composition is adjusted to about 6.5 to 7.5.

The immunogenic compositions can further include one or more other immunomodulatory agents such as, e. g., interleukins, interferons, or other cytokines. The immunogenic compositions can also include Gentamicin and Merthiolate. While the amounts and concentrations of adjuvants and additives useful in the context of the present invention can readily be determined by the skilled artisan, the present invention contemplates compositions comprising from about 50 µg to about 2000 µg of adjuvant and preferably about 250 µg/ ml dose of the vaccine composition. In another preferred embodiment, the present invention contemplates vaccine compositions comprising from about 1ug/ml to about 60 µg/ml of antibiotics, and more preferably less than about 30 µg/ml of antibiotics.

Thus, the present invention also relates to an immunogenic composition that comprises i) any of the PCV2 ORF2 proteins described above, preferably in concentrations described above, ii) at least a portion of the viral vector expressing said PCV2 ORF2 protein, iii) a portion of the cell culture, iv) an inactivating agent to inactivate the recombinant viral vector preferably BEI, and v) an neutralization agent to stop the inactivation mediated by the inactivating agent, preferably sodium thiosulfate in equivalent amounts to BEI; vi) a suitable adjuvant, preferably Carbopol 971 in amounts described above; vii) a pharmaceutical acceptable concentration of a saline buffer, preferably of a phosphate salt, and viii) an anti-microbiological active agent; wherein about 90% of the components i) to iii) have a size smaller than 1 µm.

It has been surprisingly found, that the immunogenic composition provided herewith comprises was highly stable over a period of 24 months. It has also been found the immunogenic compositions provided herewith, comprising recombinant, baculovirus expressed PCV2 ORF2 protein as provided herewith are very effective in reducing the clinical symptoms associated with PCV2 infections. It has been surprisingly found, that the

immunogenic compositions comprising the recombinant baculovirus expressed PCV2 ORF2 protein as provided herewith, are more effective than an immunogenic composition comprising the whole PCV2 virus in an inactivated form, or isolated viral PCV2 ORF2 antigen. In particular, it has been surprisingly found, that the recombinant baculovirus expressed PCV2 ORF2 protein is effective is in very low concentrations, which means in concentrations up to 0.25 µg/dose. This unexpected high immunogenic potential of the PCV2 ORF2 protein could be further increased by the addition of Carbopol.

A further aspect relates to a container comprises at least one dose of the immunogenic composition of PCV2 ORF2 protein as provided herewith, wherein one dose comprises at least 2 µg PCV2 ORF2 protein , preferably 2 to 16 µg PCV2 ORF2 protein. Said container can comprises 1 to 250 doses of the immunogenic composition, preferably it contains 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, or 250 doses of the immunogenic composition of PCV2 ORF2 protein. Preferably, each of the containers comprising more than one dose of the immunogenic composition of PCV2 ORF2 protein further comprises an anti-microbiological active agent. Those agents are for for example antibiotics including Gentamicin and Merthiolate and the like. Thus, one aspect of the present invention relates to a container that comprises 1 to 250 doses of the immunogenic composition of PCV2 ORF2 protein, wherein one dose comprises at least 2 µg PCV2 ORF2 protein, and Gentamicin and/or Merthiolate, preferably from about 1 µg/ml to about 60 µg/ml of antibiotics, and more preferably less than about 30 µg/ml.

A further aspect relates to a kit, comprising any of the containers, described above, and an instruction manual, including the information for the intramuscular application of at least one dose of the immunogenic composition of PCV2 ORF2 protein into piglets to lessening the severity of clinical symptoms associated with PCV2 infection. Moreover, according to a further aspect, said instruction manual comprises the information of a second

or further administration(s) of at least one dose of the immunogenic composition of PCV2 ORF2, wherein the second administration or any further administration is at least 14 days beyond the initial or any former administration. Preferably, said instruction manual also includes the information, to administer an immune stimulant. Preferably, said immune stimulant shall be given at least twice. Preferably, at least 3, more preferably at least 5, even more preferably at least 7 days are between the first and the second or any further administration of the immune stimulant. Preferably, the immune stimulant is given at least 10 days, preferably 15, even more preferably 20, even more preferably at least 22 days beyond the initial administration of the immunogenic composition of PCV2 ORF2 protein. A preferred immune stimulant is for example is keyhole limpet hemocyanin (KLH), still preferably emulsified with incomplete Freund's adjuvant (KLH/ICFA). However, it is herewith understood, that any other immune stimulant known to a person skilled in the art can also be used. "Immune stimulant" as used herein, means any agent or composition that can trigger the immune response, preferably without initiating or increasing a specific immune response, for example the immune response against a specific pathogen. It is further instructed to administer the immune stimulant in a suitable dose. Moreover, the kit may also comprises a container, including at least one dose of the immune stimulant, preferably one dose of KLH, or KLH/ICFA.

Moreover, it has also been surprisingly found that the immunogenic potential of the immunogenic compositions comprising recombinant baculovirus expressed PCV2 ORF2 protein, preferably in combination with Carbopol, can be further enhanced by the administration of the IngelVac PRRS MLV vaccine (see Example 5). PCV2 clinical signs and disease manifestations are greatly magnified when PRRS infection is present. However, the immunogenic compositions and vaccination strategies as provided herewith lessened this

effect greatly, and more than expected. In other words, an unexpected synergistic effect was observed when animals, preferably pigs are treated with any of the PCV2 ORF2 immunogenic composition, as provided herewith, and the Ingelvac PRRS MLV vaccine (Boehringer Ingelheim).

5 Thus, a further aspect of the present invention relates to the kit as described above, comprising the immunogenic composition of PCV2 ORF2 as provided herewith and the instruction manual, wherein the instruction manual further include the information to administer the PCV2 ORF2 immunogenic composition together with immunogenic composition that comprises PRRS antigen, preferably adjuvanted PRRS antigen. Preferably,
10 the PRRS antigen is IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

 A further aspect of the present invention also relates to a kit comprising i) a container containing at least one dose of an immunogenic composition of PCV2 ORF2 as provided herewith, and ii) a container containing an immunogenic composition comprising PRRS antigen, preferably adjuvanted PRRS antigen. Preferably the PRRS antigen is IngelVac®
15 PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). More preferably, the kit further comprises an instruction manual, including the information to administer both pharmaceutical compositions. Preferably, it contains the information that the PCV2 ORF2 containing composition is administered temporally prior to the PRRS containing composition.

 A further aspect, relates to the use of any of the compositions provided herewith as a
20 medicament, preferably as a veterinary medicament, even more preferred as a vaccine. Moreover, the present invention also relates to the use of any of the compositions described herein, for the preparation of a medicament for lessening the severity of clinical symptoms associated with PCV2 infection. Preferably, the medicament is for the prevention of a PCV2 infection, even more preferably in piglets.

5 A further aspect relates to a method for (i) the prevention of an infection, or re-infection with PCV2 or (ii) the reduction or elimination of clinical symptoms caused by PCV2 in a subject, comprising administering any of the immunogenic compositions provided herewith to a subject in need thereof. Preferably, the subject is a pig. Preferably, the immunogenic composition is administered intramuscular. Preferably, one dose or two doses of the immunogenic composition is/are administered, wherein one dose preferably comprises at least about 2 μ g PCV2 ORF2 protein, even more preferably about 2 to about 16 μ g, and at least about 0.1 to about 5 mg Carbopol, preferably about 1 mg Carbopol. A further aspect relates to the method of treatment as described above, wherein a second application of the immunogenic composition is administered. Preferably, the second administration is done with the same immunogenic composition, preferably having the same amount of PCV2 ORF2 protein. Preferably the second administration is also given intramuscular. Preferably, the second administration is done at least 14 days beyond the initial administration, even more preferably at least 4 weeks beyond the initial administration.

15 According to a further aspect, the method of treatment also comprises the administration of an immune stimulant. Preferably, said immune stimulant is administered at least twice. Preferably, at least 3, more preferably at least 5 days, even more preferably at least 7 days are between the first and the second administration of the immune stimulant. Preferably, the immune stimulant is administered at least 10 days, preferably 15, even more preferably 20, even more preferably at least 22 days beyond the initial administration of the PCV2 ORF2 immunogenic composition. A preferred immune stimulant is for example is keyhole limpet hemocyanin (KLH), still preferably emulsified with incomplete Freund's adjuvant (KLH/ICFA). However, it is herewith understood, that any other immune stimulant

20

known to a person skilled in the art can also be used. It is within the general knowledge of a person skilled in the art to administer the immune stimulant in a suitable dose.

According to a further aspect, the method of treatments described above also comprises the administration of PRRS antigen. Preferably the PRRS antigen is IngelVac®
5 PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Preferably, said PRRS antigen is administered temporally beyond the administration of the immunogenic composition of PCV2 ORF2 protein.

10

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a schematic flow diagram of a preferred construction of PCV2 ORF2 recombinant baculovirus; and

Fig. 2a and 2b are a schematic flow diagram of how to produce a composition in accordance with the present invention.

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

20

The following examples set forth preferred materials and procedures in accordance with the present invention. It is to be understood, however, that these examples are provided by way of illustration only, and nothing therein should be deemed a limitation upon the overall scope of the invention.

EXAMPLE 1

This example compares the relative yields of ORF2 using methods of the present invention with methods that are known in the prior art. Four 1000mL spinner flasks were each seeded with approximately 1.0×10^6 Sf+ cells/ml in 300mL of insect serum free media, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). The master cell culture is identified as SF+ (*Spodoptera frugiperda*) Master Cell Stock, passage 19, Lot#N112-095W. The cells used to generate the SF+ Master Cell Stock were obtained from Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. The SF+ cell line for this example was confined between passages 19 and 59. Other passages will work for purposes of the present invention, but in order to scale the process up for large scale production, at least 19 passages will probably be necessary and passages beyond 59 may have an effect on expression, although this was not investigated. In more detail, the initial SF+ cell cultures from liquid nitrogen storage were grown in Excell 420 media in suspension in sterile spinner flasks with constant agitation. The cultures were grown in 100 mL to 250mL spinner flasks with 25 to 150 mL of Excell 420 serum-free media. When the cells had multiplied to a cell density of $1.0 - 8.0 \times 10^6$ cells/mL, they were split to new vessels with a planting density of $0.5 - 1.5 \times 10^6$ cells/mL. Subsequent expansion cultures were grown in spinner flasks up to 36 liters in size or in stainless steel bioreactors of up to 300 liters for a period of 2-7 days at 25 - 29°C.

After seeding, the flasks were incubated at 27°C for four hours. Subsequently, each flask was seeded with a recombinant baculovirus containing the PCV2 ORF2 gene (SEQ ID NO: 4). The recombinant baculovirus containing the PCV2 ORF2 gene was generated as follows: the PCV2 ORF2 gene from a North American strain of PCV2 was PCR amplified to contain a 5' Kozak's sequence (SEQ ID NO: 1) and a 3' EcoR1 site (SEQ ID NO: 2), cloned into the pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, WI). Then, it was subsequently excised and subcloned into the transfer vector pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego,

60

CA). The subcloned portion is represented herein as SEQ ID NO: 7. The pVL1392 plasmid containing the PCV2 ORF2 gene was designated N47-064Y and then co-transfected with BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) baculovirus DNA into Sf+ insect cells (Protein Sciences, Meriden, CT) to generate the recombinant baculovirus containing the PCV2 ORF2 gene. The new construct is provided herein as SEQ ID NO: 8. The recombinant baculovirus containing the PCV2 ORF2 gene was plaque-purified and Master Seed Virus (MSV) was propagated on the SF+ cell line, aliquotted, and stored at -70°C. The MSV was positively identified as PCV2 ORF2 baculovirus by PCR-RFLP using baculovirus specific primers. Insect cells infected with PCV2 ORF2 baculovirus to generate MSV or Working Seed Virus express PCV2 ORF2 antigen as detected by polyclonal serum or monoclonal antibodies in an indirect fluorescent antibody assay. Additionally, the identity of the PCV2 ORF2 baculovirus was confirmed by N-terminal amino acid sequencing. The PCV2 ORF2 baculovirus MSV was also tested for purity in accordance with 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28, and 113.55. Each recombinant baculovirus seeded into the spinner flasks had varying multiplicities of infection (MOIs). Flask 1 was seeded with 7.52mL of .088 MOI seed; flask 2 was seeded with 3.01mL of 0.36MOI seed; flask 3 was seeded with 1.5mL of 0.18MOI seed; and flask 4 was seeded with 0.75mL of 0.09MOI seed. A schematic flow diagram illustrating the basic steps used to construct a PCV2 ORF2 recombinant baculovirus is provided herein as Figure 1.

After being seeded with the baculovirus, the flasks were then incubated at $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 7 days and were also agitated at 100rpm during that time. The flasks used ventilated caps to allow for air flow. Samples from each flask were taken every 24 hours for the next 7 days. After extraction, each sample was centrifuged, and both the pellet and the supernatant were separated and then microfiltered through a 0.45-1.0 μm pore size membrane.

61

The resulting samples then had the amount of ORF2 present within them quantified via an ELISA assay. The ELISA assay was conducted with capture antibody Swine anti-PCV2 Pab IgG Prot. G purified (diluted 1:250 in PBS) diluted to 1:6000 in 0.05M Carbonate buffer (pH 9.6). 100 μ L of the antibody was then placed in the wells of the microtiter plate, sealed, and incubated overnight at 37°C. The plate was then washed three times with a wash solution which comprised 0.5mL of Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100mL of 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) and 899.5mL of distilled water. Subsequently, 250 μ L of a blocking solution (5g Carnation Non-fat dry milk (Nestle, Glendale, CA) in 10mL of D-PBS QS to 100mL with distilled water) was added to each of the wells. The next step was to wash the test plate and then add pre-diluted antigen. The pre-diluted antigen was produced by adding 200 μ L of diluent solution (0.5mL Tween 20 in 999.5mL D-PBS) to each of the wells on a dilution plate. The sample was then diluted at a 1:240 ratio and a 1:480 ratio, and 100 μ L of each of these diluted samples was then added to one of the top wells on the dilution plate (i.e. one top well received 100 μ L of the 1:240 dilution and the other received 100 μ L of the 1:480 dilution). Serial dilutions were then done for the remainder of the plate by removing 100 μ L from each successive well and transferring it to the next well on the plate. Each well was mixed prior to doing the next transfer. The test plate washing included washing the plate three times with the wash buffer. The plate was then sealed and incubated for an hour at 37°C before being washed three more times with the wash buffer. The detection antibody used was monoclonal antibody to PCV ORF2. It was diluted to 1:300 in diluent solution, and 100 μ L of the diluted detection antibody was then added to the wells. The plate was then sealed and incubated for an hour at 37°C before being washed three times with the wash buffer. Conjugate diluent was then prepared by adding normal rabbit serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) to the diluent solution to 1% concentration.

Conjugate antibody Goat anti-mouse (H+I)-HRP (Jackson ImmunoResearch) was diluted in the conjugate diluent to 1:10,000. 100 µL of the diluted conjugate antibody was then added to each of the wells. The plate was then sealed and incubated for 45 minutes at 37°C before being washed three times with the wash buffer. 100 µL of substrate (TMB Peroxidase Substrate, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), mixed with an equal volume of Peroxidase Substrate B (KPL) was added to each of the wells. The plate was incubated at room temperature for 15 minutes. 100 µL of 1N HCL solution was then added to all of the wells to stop the reaction. The plate was then run through an ELISA reader. The results of this assay are provided in Table 1 below:

10

Table 1

Day	Flask	ORF2 in pellet (µg)	ORF2 in supernatant (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

These results indicate that when the incubation time is extended, expression of ORF2 into the supernatant of the centrifuged cells and media is greater than expression in the pellet of the centrifuged cells and media. Accordingly, allowing the ORF2 expression to proceed for at least 5 days and recovering it in the supernate rather than allowing expression to proceed for less than 5 days and recovering ORF2 from the cells, provides a great increase in ORF2 yields, and a significant improvement over prior methods.

EXAMPLE 2

This example provides data as to the efficacy of the invention claimed herein. A 1000mL spinner flask was seeded with approximately 1.0×10^6 Sf+ cells/ml in 300mL of Excell 420 media. The flask was then incubated at 27°C and agitated at 100rpm. Subsequently, the flask was seeded with 10 mL of PCV2 ORF2/Bac p+6 (the recombinant baculovirus containing the PCV2 ORF2 gene passed 6 additional times in the Sf9 insect cells) virus seed with a 0.1 MOI after 24 hours of incubation.

The flask was then incubated at 27°C for a total of 6 days. After incubation, the flask was then centrifuged and three samples of the resulting supernatant were harvested and inactivated. The supernatant was inactivated by bringing its temperature to $37 \pm 2^\circ\text{C}$. To the first sample, a 0.4M solution of 2-bromoethylethylamine hydrobromide which had been cyclized to 0.2M binary ethyleneimine (BEI) in 0.3N NaOH is added to the supernatant to give a final concentration of BEI of 5mM. To the second sample, 10mM BEI was added to the supernatant. To the third sample, no BEI was added to the supernatant. The samples were then stirred continuously for 48 hrs. A 1.0 M sodium thiosulfate solution to give a final minimum concentration of 5 mM was added to neutralize any residual BEI. The quantity of ORF2 in each sample was then quantified using the same ELISA assay procedure as described in Example 1. The results of this may be seen in Table 2 below:

Table 2

Sample	ORF2 in supernatant (µg)
1	78.71
2	68.75
3	83.33

This example demonstrates that neutralization with BEI does not remove or degrade significant amounts of the recombinant PCV2 ORF2 protein product. This is evidenced by the fact that there is no large loss of ORF2 in the supernatant from the BEI or elevated temperatures. Those of skill in the art will recognize that the recovered ORF2 is a stable protein product.

EXAMPLE 3

This example demonstrates that the present invention is scalable from small scale production of recombinant PCV2 ORF2 to large scale production of recombinant PCV2 ORF2. 5.0 x 10⁵ cells/ml of SF+ cells/ml in 7000mL of ExCell 420 media was planted in a 20000mL Applikon Bioreactor. The media and cells were then incubated at 27°C and agitated at 100RPM for the next 68 hours. At the 68th hour, 41.3mL of PCV2 ORF2 Baculovirus MSV+3 was added to 7000mL of ExCell 420 medium. The resultant mixture was then added to the bioreactor. For the next seven days, the mixture was incubated at 27°C and agitated at 100RPM. Samples from the bioreactor were extracted every 24 hours beginning at day 4, post-infection, and each sample was centrifuged. The supernatant of the samples were preserved and the amount of ORF2 was then quantified using SDS-PAGE densitometry. The results of this can be seen in Table 3 below:

Table 3

Day after infection:	ORF2 in supernatant (µg/mL)
4	29.33
5	41.33
6	31.33

7	60.67
---	-------

EXAMPLE 4

5 This example tests the efficacy of seven PCV2 candidate vaccines and further defines efficacy parameters following exposure to a virulent strain of PCV2. One hundred and eight (108) cesarean derived colostrum deprived (CDCD) piglets, 9-14 days of age, were randomly divided into 9 groups of equal size. Table 4 sets forth the General Study Design for this Example.

Table 4. General Study Design

Group	No. Of Pigs	Treatment	Day of Treatment	KLH/ICF A on Day 21 and Day 27	Challenged with Virulent PCV2 on Day 24	Necropsy on Day 49
1	12	PCV2 Vaccine No. 1 - (vORF2 16 µg)	0	+	+	+
2	12	PCV2 Vaccine No. 2 - (vORF2 8 µg)	0	+	+	+
3	12	PCV2 Vaccine No. 3 - (vORF2 4 µg)	0	+	+	+

4	12	PCV2 Vaccine No. 4 - (rORF2 16 µg)	0	+	+	+
5	12	PCV2 Vaccine No. 5 - (rORF2 8 µg)	0	+	+	+
6	12	PCV2 Vaccine No. 6 - (rORF2 4 µg)	0	+	+	+
7	12	PCV2 Vaccine No. 7 - (Killed whole cell virus)	0	+	+	+
8	12	None - Challenge Controls	N/A	+	+	+
9	12	None - Strict Negative Control Group	N/A	+	-	+

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

5 Seven of the groups (Groups 1 - 7) received doses of PCV2 ORF2 polypeptide, one of the groups acted as a challenge control and received no PCV2 ORF2, and another group acted as the strict negative control group and also received no PCV2 ORF2. On Day 0, Groups 1 through 7 were treated with assigned vaccines. Piglets in Group 7 were given a booster treatment on Day 14. Piglets were observed for adverse events and injection site reactions following vaccination and on Day 19, piglets were moved to the second study site. At the 10 second study site, Groups 1-8 were group housed in one building while Group 9 was housed

in a separate building. All pigs received keyhole limpet hemocyanin (KLH)/incomplete Freund's adjuvant (ICFA) on Days 21 and 27 and on Day 24, Groups 1-8 were challenged with a virulent PCV2.

Pre- and post-challenge, blood samples were collected for PCV2 serology. Post-challenge, body weight data for determination of average daily weight gain (ADWG), and clinical symptoms, as well as nasal swab samples to determine nasal shedding of PCV2, were collected. On Day 49, all surviving pigs were necropsied, lungs were scored for lesions, and selected tissues were preserved in formalin for Immunohistochemistry (IHC) testing at a later date.

Materials and Methods

This was a partially blinded vaccination-challenge feasibility study conducted in CDCD pigs, 9 to 14 days of age on Day 0. To be included in the study, PCV2 IFA titers of sows were $\leq 1:1000$. Additionally, the serologic status of sows were from a known PRRS-negative herd. Twenty-eight (28) sows were tested for PCV2 serological status. Fourteen (14) sows had a PCV2 titer of ≤ 1000 and were transferred to the first study site. One hundred ten (110) piglets were delivered by cesarean section surgeries and were available for this study on Day -4. On Day -3, 108 CDCD pigs at the first study site were weighed, identified with ear tags, blocked by weight and randomly assigned to 1 of 9 groups, as set forth above in table 4. If any test animal meeting the inclusion criteria was enrolled in the study and was later excluded for any reason, the Investigator and Monitor consulted in order to determine the use of data collected from the animal in the final analysis. The date of which enrolled piglets were excluded and the reason for exclusion was documented. Initially, no sows were excluded. A total of 108 of an available 110 pigs were randomly assigned to one

of 9 groups on Day -3. The two smallest pigs (No. 17 and 19) were not assigned to a group and were available as extras, if needed. During the course of the study, several animals were removed. Pig 82 (Group 9) on Day -1, Pig No. 56 (Group 6) on Day 3, Pig No. 53 (Group 9) on Day 4, Pig No. 28 (Group 8) on Day 8, Pig No. 69 (Group 8) on Day 7, and Pig No. 93 (Group 4) on Day 9, were each found dead prior to challenge. These six pigs were not included in the final study results. Pig no 17 (one of the extra pigs) was assigned to Group 9. The remaining extra pig, No. 19, was excluded from the study.

The formulations given to each of the groups were as follows: Group 1 was designed to administer 1ml of viral ORF2 (vORF2) containing 16 μg ORF2/ml. This was done by mixing 10.24 ml of viral ORF2 ($256 \mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 10.24 \text{ ml vORF2}$) with 3.2 ml of 0.5% Carbopol and 2.56 ml of phosphate buffered saline at a pH of 7.4. This produced 16 ml of formulation for group 1. Group 2 was designed to administer 1ml of vORF2 containing 8 μg vORF2/ml. This was done by mixing 5.12 ml of vORF2 ($128 \mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 5.12 \text{ ml vORF2}$) with 3.2 ml of 0.5% Carbopol and 7.68 ml of phosphate buffered saline at a pH of 7.4. This produced 16 ml of formulation for group 2. Group 3 was designed to administer 1ml of vORF2 containing 4 μg vORF2/ml. This was done by mixing 2.56 ml of vORF2 ($64 \mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 2.56 \text{ ml vORF2}$) with 3.2 ml of 0.5% Carbopol and 10.24 ml of phosphate buffered saline at a pH of 7.4. This produced 16 ml of formulation for group 3. Group 4 was designed to administer 1ml of recombinant ORF2 (rORF2) containing 16 μg rORF2/ml. This was done by mixing 2.23 ml of rORF2 ($512 \mu\text{g}/230 \mu\text{g}/\text{ml} = 2.23 \text{ ml rORF2}$) with 6.4 ml of 0.5% Carbopol and 23.37 ml of phosphate buffered saline at a pH of 7.4. This produced 32 ml of formulation for group 4. Group 5 was designed to administer 1ml of rORF2 containing 8 μg rORF2/ml. This was done by mixing 1.11 ml of rORF2 ($256 \mu\text{g}/230 \mu\text{g}/\text{ml} = 1.11 \text{ ml rORF2}$) with 6.4 ml of 0.5% Carbopol and 24.49 ml of phosphate buffered saline at a pH of

7.4. This produced 32 ml of formulation for group 5. Group 6 was designed to administer 1ml of rORF2 containing 8 µg rORF2/ml. This was done by mixing 0.56 ml of rORF2 ($128 \mu\text{g}/230 \mu\text{g/ml} = 0.56 \text{ ml rORF2}$) with 6.4 ml of 0.5% Carbopol and 25.04 ml of phosphate buffered saline at a pH of 7.4. This produced 32 ml of formulation for group 6. Group 7 was designed to administer 2ml of PCV2 whole killed cell vaccine (PCV2 KV) containing the MAX PCV2 KV. This was done by mixing 56 ml of PCV2 KV with 14 ml of 0.5% Carbopol. This produced 70 ml of formulation for group 7. Finally group 8 was designed to administer KLH at 0.5 µg/ml or 1.0 µg/ml per 2 ml dose. This was done by mixing 40.71 ml KLH ($7.0 \mu\text{g protein/ml at } 0.5 \mu\text{g/ml} = 570 \text{ ml } (7.0 \mu\text{g/ml})(x) = (0.5)(570 \text{ ml}))$), 244.29 ml phosphate buffered saline at a pH of 7.4, and 285 ml Freund's adjuvant. Table 5 describes the time frames for the key activities of this Example.

Table 5. Study Activities

Study Day	Study Activity
-4, 0 to 49	General observations for overall health and clinical symptoms
-3	Weighed; Randomized to groups; Collected blood samples from all pigs
0	Health examination; Administered IVP Nos. 1-7 to Groups 1-7, respectively
0-7	Observed pigs for injection site reactions
14	Boosted Group 7 with PCV2 Vaccine No. 7; Blood samples from all pigs

14-21	Observed Group 7 for injection site reactions
16-19	Treated all pigs with antibiotics (data missing)
19	Pigs transported from the first test site to a second test site
21	Treated Groups 1-9 with KLH/ICFA
24	Collected blood and nasal swab samples from all pigs; Weighed all pigs; Challenged Groups 1-8 with PCV2 challenge material
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47	Collected nasal swab samples from all pigs
27	Treated Groups 1-9 with KLH/ICFA
31	Collected blood samples from all pigs
49	Collected blood and nasal swab samples from all pigs; Weighed all pigs; Necropsy all pigs; Gross lesions noted with emphasis placed on icterus and gastric ulcers; Lungs evaluated for lesions; Fresh and formalin fixed tissue samples saved; In-life phase of the study completed

Following completion of the in-life phase of the study, formalin fixed tissues were

examined by Immunohistochemistry (IHC) for detection of PCV2 antigen by a pathologist, blood samples were evaluated for PCV2 serology, nasal swab samples were evaluated for PCV2 shedding, and average daily weight gain (ADWG) was determined from Day 24 to Day 49.

5 Animals were housed at the first study site in individual cages in five rooms from birth to approximately 11 days of age (approximately Day 0 of the study). Each room was identical in layout and consisted of stacked individual stainless steel cages with heated and filtered air supplied separately to each isolation unit. Each room had separate heat and ventilation, thereby preventing cross-contamination of air between rooms. Animals were
10 housed in two different buildings at the second study site. Group 9 (The Strict negative control group) was housed separately in a converted finisher building and Groups 1-8 were housed in converted nursery building. Each group was housed in a separate pen (11-12 pigs per pen) and each pen provided approximately 3.0 square feet per pig. Each pen was on an elevated deck with plastic slatted floors. A pit below the pens served as a holding tank for
15 excrement and waste. Each building had its own separate heating and ventilation systems, with little likelihood of cross-contamination of air between buildings.

 At the first study site, piglets were fed a specially formulated milk ration from birth to approximately 3 weeks of age. All piglets were consuming solid, special mixed ration by Day 19 (approximately 4 ½ weeks of age). At the second study site, all piglets were fed a custom
20 non-medicated commercial mix ration appropriate for their age and weight, *ad libitum*. Water at both study sites was also available *ad libitum*.

 All test pigs were treated with Vitamin E on Day -2, with iron injections on Day -1 and with NAXCEL® (1.0 mL, IM, in alternating hams) on Days 16, 17, 18 and 19. In addition, Pig No. 52 (Group 9) was treated with an iron injection on Day 3, Pig 45 (Group 6)

was treated with an iron injection on Day 11, Pig No. 69 (Group 8) was treated with NAXCEL® on Day 6, Pig No. 74 (Group 3) was treated with dexamethazone and penicillin on Day 14, and Pig No. 51 (Group 1) was treated with dexamethazone and penicillin on Day 13 and with NAXCEL® on Day 14 for various health reasons.

5 While at both study sites, pigs were under veterinary care. Animal health examinations were conducted on Day 0 and were recorded on the Health Examination Record Form. All animals were in good health and nutritional status before vaccination as determined by observation on Day 0. All test animals were observed to be in good health and nutritional status prior to challenge. Carcasses and tissues were disposed of by rendering.
10 Final disposition of study animals was records on the Animal Disposition Record.

 On Day 0, pigs assigned to Groups 1-6 received 1.0 mL of PCV2 Vaccines 1-6, respectively, IM in the left neck region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x ½" needle. Pigs assigned to Group 7 received 2.0 mL of PCV2 Vaccine No. 7 IM in the left neck region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x ½" needle.
15 On Day 14, pigs assigned to Group 7 received 2.0 mL of PCV2 Vaccine No. 7 IM in the right neck region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x ½" needle.

 On Day 21 all test pigs received 2.0 mL of KLH/ICFA IM in the right ham region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x 1" needle. On Day 27 all test pigs received 2.0 mL of KLH/ICFA in the left ham region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe
20 and a sterile 20g x 1" needle.

 On Day 24, pigs assigned to Groups 1-8 received 1.0 mL of PCV2 ISUVDL challenge material (5.11 log₁₀ TCID₅₀/mL) IM in the left neck region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x 1" needle. An additional 1.0 mL of the same material was administered IN to each pig (0.5 mL per nostril) using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and

nasal canula.

Test pigs were observed daily for overall health and adverse events on Day -4 and from Day 0 to Day 19. Observations were recorded on the Clinical Observation Record. All test pigs were observed from Day 0 to Day 7, and Group 7 was further observed from Day 14 to 21, for injection site reactions. Average daily weight gain was determined by weighing each pig on a calibrated scale on Days -3, 24 and 49, or on the day that a pig was found dead after challenge. Body weights were recorded on the Body Weight Form. Day -3 body weights were utilized to block pigs prior to randomization. Day 24 and Day 49 weight data was utilized to determine the average daily weight gain (ADWG) for each pig during these time points. For pigs that died after challenge and before Day 49, the ADWG was adjusted to represent the ADWG from Day 24 to the day of death.

In order to determine PCV2 serology, venous whole blood was collected from each piglet from the orbital venous sinus on Days -3 and 14. For each piglet, blood was collected from the orbital venous sinus by inserting a sterile capillary tube into the medial canthus of one of the eyes and draining approximately 3.0 mL of whole blood into a 4.0 mL Serum Separator Tube (SST). On Days 24, 31, and 49, venous whole blood from each pig was collected from the anterior vena cava using a sterile 18g x 1 1/2" Vacutainer needle (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey), a Vacutainer needle holder and a 13 mL SST. Blood collections at each time point were recorded on the Sample Collection Record. Blood in each SST was allowed to clot, each SST was then spun down and the serum harvested. Harvested serum was transferred to a sterile snap tube and stored at -70±10° C until tested at a later date. Serum samples were tested for the presence of PCV2 antibodies by BIVI-R&D personnel.

Pigs were observed once daily from Day 20 to Day 49 for clinical symptoms and

clinical observations were recorded on the Clinical Observation Record.

To test for PCV2 nasal shedding, on Days 24, 25, and then every other odd numbered study day up to and including Day 49, a sterile dacron swab was inserted intra nasally into either the left or right nostril of each pig (one swab per pig) as aseptically as possible, swished around for a few seconds and then removed. Each swab was then placed into a single sterile snap-cap tube containing 1.0 mL of EMEM media with 2% IFBS, 500 units/mL of Penicillin, 500 µg/mL of Streptomycin and 2.5 µg/mL of Fungizone. The swab was broken off in the tube, and the snap tube was sealed and appropriately labeled with animal number, study number, date of collection, study day and "nasal swab." Sealed snap tubes were stored at $-40 \pm 10^{\circ}$ C until transported overnight on ice to BIVI-St. Joseph. Nasal swab collections were recorded on the Nasal Swab Sample Collection Form. BIVI-R&D conducted quantitative virus isolation (VI) testing for PCV2 on nasal swab samples. The results were expressed in $\log_{10}$ values. A value of 1.3 logs or less was considered negative and any value greater than 1.3 logs was considered positive.

Pigs that died (Nos. 28, 52, 56, 69, 82, and 93) at the first study site were necropsied to the level necessary to determine a diagnosis. Gross lesions were recorded and no tissues were retained from these pigs. At the second study site, pigs that died prior to Day 49 (Nos. 45, 23, 58, 35), pigs found dead on Day 49 prior to euthanasia (Nos. 2, 43) and pigs euthanized on Day 49 were necropsied. Any gross lesions were noted and the percentages of lung lobes with lesions were recorded on the Necropsy Report Form.

From each of the 103 pigs necropsied at the second study site, a tissue sample of tonsil, lung, heart, liver, mesenteric lymph node, kidney and inguinal lymph node was placed into a single container with buffered 10% formalin; while another tissue sample from the same aforementioned organs was placed into a Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd.,

Thelwall, UK) and each Whirl-pak was placed on ice. Each container was properly labeled. Sample collections were recorded on the Necropsy Report Form. Afterwards, formalin-fixed tissue samples and a Diagnostic Request Form were submitted for IHC testing. IHC testing was conducted in accordance with standard ISU laboratory procedures for receiving samples, sample and slide preparation, and staining techniques. Fresh tissues in Whirl-paks were shipped with ice packs to the Study Monitor for storage ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ} \text{C}$) and possible future use. Formalin-fixed tissues were examined by a pathologist for detection of PCV2 by IHC and scored using the following scoring system: 0 = None; 1 = Scant positive staining, few sites; 2 = Moderate positive staining, multiple sites; and 3 = Abundant positive staining, diffuse throughout the tissue. Due to the fact that the pathologist could not positively differentiate inguinal LN from mesenteric LN, results for these tissues were simply labeled as Lymph Node and the score given the highest score for each of the two tissues per animal.

Results

Results for this example are given below. It is noted that one pig from Group 9 died before Day 0, and 5 more pigs died post-vaccination (1 pig from Group 4; 1 pig from Group 6; 2 pigs from Group 8; and 1 pig from Group 9). Post-mortem examination indicated all six died due to underlying infections that were not associated with vaccination or PMWS. Additionally, no adverse events or injection site reactions were noted with any groups.

Average daily weight gain (ADWG) results are presented below in Table 6. Group 9, the strict negative control group, had the highest ADWG ($1.06 \pm 0.17 \text{ lbs/day}$), followed by Group 5 ($0.94 \pm 0.22 \text{ lbs/day}$), which received one dose of $8 \mu\text{g}$ of rORF2. Group 3, which received one dose of $4 \mu\text{g}$ of vORF2, had the lowest ADWG ($0.49 \pm 0.21 \text{ lbs/day}$), followed by Group 7 ($0.50 \pm 0.15 \text{ lbs/day}$), which received 2 doses of killed vaccine.

Table 6. Summary of Group Average Daily Weight Gain (ADWG)

Group	Treatment	N	ADWG - lbs/day (Day 24 to Day 49) or adjusted for pigs dead before Day 29
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	0.87 ± 0.29 lbs/day
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	0.70 ± 0.32 lbs/day
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	0.49 ± 0.21 lbs/day
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	0.84 ± 0.30 lbs/day
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	0.94 ± 0.22 lbs/day
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	0.72 ± 0.25 lbs/day
7	KV (2 doses)	12	0.50 ± 0.15 lbs/day
8	Challenge Controls	10	0.76 ± 0.19 lbs/day
9	Strict Negative Controls	11	1.06 ± 0.17 lbs/day

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

5

10

PCV2 serology results are presented below in Table 7. All nine groups were seronegative for PCV2 on Day -3. On Day 14, Groups receiving vORF2 vaccines had the highest titers, which ranged from 187.5 to 529.2. Pigs receiving killed viral vaccine had the next highest titers, followed by the groups receiving rORF2 vaccines. Groups 8 and 9 remained seronegative at this time. On Day 24 and Day 31, pigs receiving vORF2 vaccines continued to demonstrate a strong serological response, followed closely by the group that

received two doses of a killed viral vaccine. Pigs receiving rORF2 vaccines were slower to respond serologically and Groups 8 and 9 continued to remain seronegative. On Day 49, pigs receiving vORF2 vaccine, 2 doses of the killed viral vaccine and the lowest dose of rORF2 demonstrated the strongest serological responses. Pigs receiving 16 µg and 8 µg of rORF2 vaccines had slightly higher IFA titers than challenge controls. Group 9 on Day 49 demonstrated a strong serological response.

Table 7. Summary of Group PCV2 IFA Titers

AVERAGE IFA TITER

Group	Treatment	Day -3	Day 14	Day 24	Day 31**	Day 49***
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	50.0	529.2	4400.0	7866.7	11054.5
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	50.0	500.0	3466.7	6800.0	10181.8
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	50.0	187.5	1133.3	5733.3	9333.3
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	50.0	95.5	1550.0	3090.9	8000.0
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	50.0	75.0	887.5	2266.7	7416.7
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	50.0	50.0	550.0	3118.2	10570.0
7	KV (2 doses)	50.0	204.2	3087.5	4620.8	8680.0
8	Challenge Controls	50.0	55.0	50.0	50.0	5433.3
9	Strict Negative Controls	50.0	59.1	59.1	54.5	6136.4

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

*For calculation purposes, a ≤100 IFA titer was designated as a titer of "50"; a ≥400 IFA

79

titer was designated as a titer of "12,800".

****Day of Challenge**

*****Day of Necropsy**

The results from the post-challenge clinical observations are presented below in Table

5 8. This summary of results includes observations for Abnormal Behavior, Abnormal
Respiration, Cough and Diarrhea. Table 9 includes the results from the Summary of Group
Overall Incidence of Clinical Symptoms and Table 10 includes results from the Summary of
Group Mortality Rates Post-challenge. The most common clinical symptom noted in this
study was abnormal behavior, which was scored as mild to severe lethargy. Pigs receiving
10 the 2 lower doses of vORF2, pigs receiving 16 µg of rORF2 and pigs receiving 2 doses of KV
vaccine had incidence rates of $\geq 27.3\%$. Pigs receiving 8 µg of rORF2 and the strict negative
control group had no abnormal behavior. None of the pigs in this study demonstrated any
abnormal respiration. Coughing was noted frequently in all groups (0 to 25%), as was
diarrhea (0-20%). None of the clinical symptoms noted were pathognomic for PMWS.

15 The overall incidence of clinical symptoms varied between groups. Groups receiving
any of the vORF2 vaccines, the group receiving 16 µg of rORF2, the group receiving 2 doses
of KV vaccine and the challenge control group had the highest incidence of overall clinical
symptoms ($\geq 6.4\%$). The strict negative control group, the group receiving 8 µg of rORF2
and the group receiving 4 µg of rORF2 had overall incidence rates of clinical symptoms of
20 0%, 8.3% and 9.1%, respectively.

Overall mortality rates between groups varied as well. The group receiving 2 doses of
KV vaccine had the highest mortality rate (16.7%); while groups that received 4 µg of
vORF2, 16 µg of rORF2, or 8 µg of rORF2 and the strict negative control group all had 0%
mortality rates.

**Table 8. Summary of Group Observations for Abnormal Behavior, Abnormal
Respiration, Cough, and Diarrhea**

Group	Treatment	N	Abnormal Behavior ¹	Abnormal Behavior ²	Cough ³	Diarrhea ⁴
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	2/12 (16.7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16.7%)
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	4/12 (33.3%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	1/12 (8.3%)
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	8/12 (66.7%)	0/12 (0%)	2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	3/11 (27.3%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2/11 (18.2%)
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	0/12 (0%)
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1/11 (9.1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 doses)	12	7/12 (58.3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)
8	Challenge Controls	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)

9	Strict Negative Controls	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)
---	--------------------------	----	--------------	--------------	-----------	-----------

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

¹Total number of pigs in each group that demonstrated any abnormal behavior for at least one day

²Total number of pigs in each group that demonstrated any abnormal respiration for at least one day

³Total number of pigs in each group that demonstrated a cough for at least one day

⁴Total number of pigs in each group that demonstrated diarrhea for at least one day

Table 9. Summary of Group Overall Incidence of Clinical Symptoms

Group	Treatment	N	Incidence of pigs with Clinical Symptoms ¹	Incidence Rate
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	5	41.7%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	5	41.7%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	8	66.7%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	4	36.4%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8.3%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1	9.1%
7	KV (2 doses)	12	7	58.3%

8	Challenge Controls	10	4	40%
9	Strict Negative Controls	11	0	0%

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

¹Total number of pigs in each group that demonstrated any clinical symptom for at least one
5 day

Table 10. Summary of Group Mortality Rates Post-challenge

Group	Treatment	N	Dead Post-challenge	Mortality Rate
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	1	8.3%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8.3%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	0	0%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	0	0%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	0	0%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1	9.1%
7	KV (2 doses)	12	2	16.7%
8	Challenge Controls	10	1	10%
9	Strict Negative Controls	11	0	0%

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; killed whole cell

83

virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

PCV2 nasal shedding results are presented below in Table 11. Following challenge on Day 24, 1 pig in Group 7 began shedding PCV2 on Day 27. None of the other groups experienced shedding until Day 33. The bulk of nasal shedding was noted from Day 35 to Day 45. Groups receiving any of the three vORF2 vaccines and groups receiving either 4 or 8 µg of rORF2 had the lowest incidence of nasal shedding of PCV2 ($\leq 9.1\%$). The challenge control group (Group 8) had the highest shedding rate (80%), followed by the strict negative control group (Group 9), which had an incidence rate of 63.6%.

10

Table 11. Summary of Group Incidence of Nasal Shedding of PCV2

Group	Treatment	N	No. Of pigs that shed for at least one day	Incidence Rate
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	1	8.3%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8.3%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	1	8.3%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	2	18.2%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8.3%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1	9.1%
7	KV (2 doses)	12	5	41.7%
8	Challenge Controls	10	8	80%

9	Strict Negative Controls	11	7	63.6%
---	--------------------------	----	---	-------

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

The Summary of Group Incidence of Icterus, Group Incidence of Gastric Ulcers, Group Mean Lung Lesion Scores, and Group Incidence of Lung Lesions are shown below in Table12. Six pigs died at the first test site during the post-vaccination phase of the study (Group 4, N=1; Group 6, N=1; Group 8, N=2; Group 9, N=2). Four out of six pigs had fibrinous lesions in one or more body cavities, one pig (Group 6) had lesions consistent with clostridial disease, and one pig (Group 9) had no gross lesions. None of the pigs that died during the post-vaccination phased of the study had lesions consistent with PMWS.

Pigs that died post-challenge and pigs euthanized on Day 49 were necropsied. At necropsy, icterus and gastric ulcers were not present in any group. With regard to mean % lung lesions, Group 9 had lowest mean % lung lesions (0%), followed by Group 1 with 0.40 ± 0.50% and Group 5 with 0.68 ± 1.15%. Groups 2, 3, 7 and 8 had the highest mean % lung lesions (≥7.27%). Each of these four groups contained one pig with % lung lesions ≥1.5%, which skewed the results higher for these four groups. With the exception of Group 9 with 0% lung lesions noted, the remaining 8 groups had ≤36% lung lesions. Almost all lung lesions noted were described as red/purple and consolidated.

Table 12. Summary of Group Incidence of Icterus, Group Incidence of Gastric Ulcers, Group Mean % Lung Lesion Scores, and Group Incidence of Lung Lesions Noted

Group	Treatment	Icterus	Gastric Ulcers	Mean % Lung Lesions	Incidence of Lung Lesions Noted
1	vORF2 - 16 μ g (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$0.40 \pm 0.50\%$	10/12 (83%)
2	vORF2 - 8 μ g (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$7.41 \pm 20.2\%$	10/12 (83%)
3	vORF2 - 4 μ g (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$9.20 \pm 20.9\%$	10/12 (83%)
4	rORF2 - 16 μ g (1 dose)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	$1.5 \pm 4.74\%$	4/11 (36%)
5	rORF2 - 8 μ g (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$0.68 \pm 1.15\%$	9/12 (75%)
6	rORF2 - 4 μ g (1 dose)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	$2.95 \pm 5.12\%$	7/11 (64%)
7	KV (2 doses)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	$7.27 \pm 22.9\%$	9/12 (75%)
8	Challenge Controls	0/10 (0%)	0/10 (0%)	$9.88 \pm 29.2\%$	8/10 (80%)
9	Strict Negative Controls	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

The Summary of Group IHC Positive Incidence Results are shown in Table 13.

5 Group 1 (vORF2 - 16 µg) and Group 5 (rORF2 - 8 µg) had the lowest rate of IHC positive results (16.7%). Group 8 (Challenge Controls) and Group 9 (Strict Negative Controls) had the highest rate of IHC positive results, 90% and 90.9%, respectively.

Table 13. Summary of Group IHC Positive Incidence Rate

Group	Treatment	N	No. Of pigs that had at least one tissue positive for PCV2	Incidence Rate
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	2	16.7%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	3	25.0%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	8	66.7%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	4	36.3%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	2	16.7%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	4	36.4%
7	KV (2 doses)	12	5	41.7%
8	Challenge Controls	10	9	90.0%
9	Strict Negative Controls	11	10	90.9%

10 vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

Post-challenge, Group 5, which received one dose of 8 µg of rORF2 antigen, outperformed the other 6 vaccine groups. Group 5 had the highest ADWG (0.94 ± 0.22 lbs/day), the lowest incidence of abnormal behavior (0%), the second lowest incidence of cough (8.3%), the lowest incidence of overall clinical symptoms (8.3%), the lowest mortality rate (0%), the lowest rate of nasal shedding of PCV2 (8.3%), the second lowest rate for mean % lung lesions (0.68 ± 1.15%) and the lowest incidence rate for positive tissues (16.7%). Groups receiving various levels of rORF2 antigen overall outperformed groups receiving various levels of vORF2 and the group receiving 2 doses of killed whole cell PCV2 vaccine performed the worst. Tables 14 and 15 contain summaries of group post-challenge data.

Table 14. Summary of Group Post-Challenge Data - Part 1

Group	N	Treatment	ADWG (lbs/day)	Abnormal Behavior	Cough	Overall Incidence of Clinical Symptoms
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dose)	0.87 ± 0.29	2/12 (16.7%)	3/12 (25%)	41.7%
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dose)	0.70 ± 0.32	4/12 (33.3%)	1/12 (8.3%)	41.7%
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dose)	0.49 ± 0.21	8/12 (66.7%)	2/12 (16.7%)	66.7%

4	11	rORF2 - 16 µg (1 dose)	0.84 ± 0.30	3/11 (27.3%)	0/11 (0%)	36.4%
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dose)	0.94 ± 0.22	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	8.3%
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dose)	0.72 ± 0.25	1/11 (9.1%)	0/11 (0%)	9.1%
7	12	KV (2 doses)	0.50 ± 0.15	7/12 (58.3)	0/12 (0%)	58.3%
8	10	Challenge Controls	0.76 ± 0.19	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40%
9	11	Strict Negative Controls	1.06 ± 0.17	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0%

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

5

Table 15. Summary of Group Post-Challenge Data - Part 2

Group	N	Treatment	Mortality Rate	Nasal Shedding	Mean % Lung Lesions	Incidence Rate of at least one tissue IHC positive for PCV2
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dose)	8.3%	8.3%	0.40 ± 0.50%	16.7%

89

2	12	vORF2 - 8 µg (1 dose)	8.3%	8.3%	7.41 ± 20.2%	25.0%
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dose)	0%	8.3%	9.20 ± 20.9%	66.7%
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dose)	0%	18.2%	1.50 ± 4.74%	36.3%
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dose)	0%	8.3%	0.68 ± 1.15%	16.7%
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dose)	9.1%	9.1%	2.95 ± 5.12%	36.4%
7	12	KV (2 doses)	16.7%	41.7%	7.27 ± 22.9%	41.7%
8	10	Challenge Controls	10%	80%	9.88 ± 29.2%	90.0%
9	11	Strict Negative Controls	0%	63.6%	0/11 (0%)	90.9%

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

5 Results of this study indicate that all further vaccine efforts should focus on a rORF2 vaccine. Overall, nasal shedding of PCV2 was detected post-challenge and vaccination with a PCV2 vaccine resulted in a reduction of shedding. Immunohistochemistry of selected lymphoid tissues also served as a good parameter for vaccine efficacy, whereas large

90

differences in ADWG, clinical symptoms, and gross lesions were not detected between groups. This study was complicated by the fact that extraneous PCV2 was introduced at some point during the study, as evidenced by nasal shedding of PCV2, PCV2 seroconversion and positive IHC tissues in Group 9, the strict negative control group.

5

Discussion

Seven PCV2 vaccines were evaluated in this study, which included three different dose levels of vORF2 antigen administered once on Day 0, three different dose levels of rORF2 antigen administered once on Day 0 and one dose level of killed whole cell PCV2 vaccine administered on Day 0 and Day 14. Overall, Group 5, which received 1 dose of vaccine containing 8 µg of rORF2 antigen, had the best results. Group 5 had the highest ADWG, the lowest incidence of abnormal behavior, the lowest incidence of abnormal respiration, the second lowest incidence of cough, the lowest incidence of overall clinical symptoms, the lowest mortality rate, the lowest rate of nasal shedding of PCV2, the second lowest rate for mean % lung lesions and the lowest incidence rate for positive IHC tissues.

Interestingly, Group 4, which received a higher dose of rORF2 antigen than Group 5, did not perform as well or better than Group 5. Group 4 had a slightly lower ADWG, a higher incidence of abnormal behavior, a higher incidence of overall clinical symptoms, a higher rate of nasal shedding of PCV2, a higher mean % lung lesions, and a higher rate for positive IHC tissues than Group 5. Statistical analysis, which may have indicated that the differences between these two groups were not statistically significant, was not conducted on these data, but there was an observed trend that Group 4 did not perform as well as Group 5.

Post-vaccination, 6 pigs died at the first study site. Four of the six pigs were from Group 8 or Group 9, which received no vaccine. None of the six pigs demonstrated lesions

consistent with PMWS, no adverse events were reported and overall, all seven vaccines appeared to be safe when administered to pigs approximately 11 days of age. During the post-vaccination phase of the study, pigs receiving either of three dose levels of vORF2 vaccine or killed whole cell vaccine had the highest IFAT levels, while Group 5 had the lowest IFAT levels just prior to challenge, of the vaccine groups.

Although not formally proven, the predominant route of transmission of PCV2 to young swine shortly after weaning is believed to be by oronasal direct contact and an efficacious vaccine that reduces nasal shedding of PCV2 in a production setting would help control the spread of infection. Groups receiving one of three vORF2 antigen levels and the group receiving 8 µg of rORF2 had the lowest incidence rate of nasal shedding of PCV2 (8.3%). Expectedly, the challenge control group had the highest incidence rate of nasal shedding (80%).

Gross lesions in pigs with PMWS secondary to PCV2 infection typically consist of generalized lymphadenopathy in combination with one or a multiple of the following: (1) interstitial pneumonia with interlobular edema, (2) cutaneous pallor or icterus, (3) mottled atrophic livers, (4) gastric ulcers and (5) nephritis. At necropsy, icterus, hepatitis, nephritis, and gastric ulcers were not noted in any groups and lymphadenopathy was not specifically examined for. The mean % lung lesion scores varied between groups. The group receiving 16 µg of vORF2 antigen had the lowest mean % lung lesion score ($0.40 \pm 0.50\%$), followed by the group that received 8 µg of rORF2 ($0.68 \pm 1.15\%$). As expected, the challenge control group had the highest mean % lung lesion score ($9.88 \pm 29.2\%$). In all four groups, the mean % lung lesion scores were elevated due to one pig in each of these groups that had very high lung lesion scores. Most of the lung lesions were described as red/purple and consolidated. Typically, lung lesions associated with PMWS are described as tan and non-collapsible with

interlobular edema. The lung lesions noted in this study were either not associated with PCV2 infection or a second pulmonary infectious agent may have been present. Within the context of this study, the % lung lesion scores probably do not reflect a true measure of the amount of lung infection due to PCV2.

5 Other researchers have demonstrated a direct correlation between the presence of PCV2 antigen by IHC and histopathology. Histopathology on select tissues was not conducted with this study. Group 1 (16 μ g of vORF2) and Group 5 (8 μ g of rORF2) had the lowest incidence rate of pigs positive for PCV2 antigen (8.3%), while Group 9 (the strict negative control group - 90.9%) and Group 8 (the challenge control group - 90.0%) had the
10 highest incidence rates for pigs positive for PCV2 antigen. Due to the non-subjective nature of this test, IHC results are probably one of the best parameters to judge vaccine efficacy on.

Thus, in one aspect of the present invention, the Minimum Portective Dosage (MPD) of a 1ml/1 dose recombinant product with extracted PCV2 ORF2 (rORF2) antigen in the CDCD pig model in the face of a PCV2 challenge was determined. Of the three groups that
15 received varying levels of rORF2 antigen, Group 5 (8 μ g of rORF2 antigen) clearly had the highest level of protection. Group 5 either had the best results or was tied for the most favorable results with regard to all of the parameters examined. When Group 5 was compared with the other six vaccine groups post-challenge, Group 5 had the highest ADWG (0.94 $\pm$ 0.22 lbs/day), the lowest incidence of abnormal behavior (0%), the second lowest
20 incidence of cough (8.3%), the lowest incidence of overall clinical symptoms (8.3%), the lowest mortality rate (0%), the lowest rate of nasal shedding of PCV2 (8.3%), the second lowest rate for mean % lung lesions (0.68 $\pm$ 1.15%) and the lowest incidence rate for positive IHC tissues (16.7%).

In another aspect of the present invention, the MPD of a 1ml/1 dose conventional

product that is partially purified PCV2 ORF2 (vORF2) antigen in the CDCD pig model in the face of a PCV2 challenge was determined. Of the three groups that received varying levels of vORF2 antigen, Group 1 (16 µg of vORF2) had the highest level of protection. Group 1 outperformed Groups 2 and 3 with respect to ADWG, mean % lung lesions, and IHC. Groups 1 and 2 (8 µg of vORF2 antigen) performed equally with respect to overall incidence of clinical symptoms, Group 3 (4 µg of vORF2 antigen) had the lowest mortality rate, and all three groups performed equally with respect to nasal shedding. Overall, vORF vaccines did not perform as well as rORF vaccines.

In yet another aspect of the present invention, the efficacy of a maximum dose of a 2ml/2 dose Conventional Killed PCV2 vaccine in the CDCD pig model in the face of a PCV2 challenge was determined. Of the seven vaccines evaluated in this study, the killed whole cell PCV2 vaccine performed the worst. Piglets receiving two doses of killed whole cell PCV2 vaccine had the lowest ADWG, the second highest rate of abnormal behavior (58.3%), the second highest overall incidence of clinical symptoms (58.3%), the highest mortality rate (16.7%), the second highest incidence of nasal shedding (41.7%), highest mean % lung lesions (9.88 ± 29.2%), a high incidence of lung lesions noted (75%) and a moderate IHC incidence rate in tissues (41.7%). However, it was still effective at invoking an immune response.

In still another aspect of the present invention, nasal shedding of PCV2 was assessed as an efficacy parameter and the previous PCV2 efficacy parameters from previous studies were reconfirmed. Results from this study indicate that nasal shedding of PCV2 occurs following intra nasal challenge and that PCV2 vaccines reduce nasal shedding of PCV2 post-challenge. Furthermore, results from this study and reports in the literature indicate that IHC should continue to be evaluated in future PCV2 vaccine trials as well.

Some additional conclusions arising from this study are that lymphadenopathy is one of the hallmarks of PMWS. Another one of the hallmarks of PMWS is lymphoid depletion and multinucleated/giant histiocytes. Additionally, no adverse events or injection site reactions were noted for any of the 7 PCV2 vaccines and all 7 PCV2 vaccines appeared to be safe when administered to young pigs.

EXAMPLE 5

This example tests the efficacy of eight PCV2 candidate vaccines and reconfirms PCV2 challenge parameters from earlier challenge studies following exposure to a virulent strain of PCV2. One hundred and fifty (150) cesarean derived colostrum deprived (CDCD) piglets, 6-16 days of age, were blocked by weight and randomly divided into 10 groups of equal size. Table 16 sets forth the General Study Design for this Example.

Table 16. General Study Design

Group	No. Of Pigs	Treatment	Day of Treatment	KLH/ICFA on Day 22 and Day 28	Challenge with Virulent PCV2 on Day 25	PRRSV MLV on Day 46	Necropsy on Day 50
1	15	PVC2 Vaccine 1 16 µg rORF2 – IMS 1314	0 & 14	+	+	+	+
2	15	PVC2 Vaccine 2 16 µg vORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
3	15	PCV2 Vaccine 3 16 µg rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+

CJ

4	15	PCV2 Vaccine 2 16 µg vORF2 – Carbopol	0	+	+	+	+
5	15	PVC2 Vaccine 3 4 µg rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
6	15	PVC2 Vaccine 3 1 µg rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
7	15	PVC2 Vaccine 3 0.25 µg rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
8	15	PVC2 Vaccine 4 > 8.0 log KV – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
9	15	Challenge Controls	N/A	+	+	+	+
10	15	None - Strict Negative Control Group	N/A	+	-	+	+

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

The vaccine formulation given to each group were as follows. PCV2 Vaccine

5 No. 1, administered at 1 x 2 ml dose to Group 1, was a high dose (16 ug/2 ml dose) of inactivated recombinant ORF2 antigen adjuvanted with IMS 1314 (16 ug rORF2 – IMS 1314). PCV2 Vaccine No. 2, administered at 1 x 2 ml dose to Group 2, was a high dose (16 ug/2 ml dose) of a partially purified VIDO R-1 generated PCV2 ORF2 antigen adjuvanted with Carbopol (16 ug vORF2 – Carbopol). PCV2 Vaccine No. 3, administered at 1 x 2 ml
10 dose to Group 3, was a high dose (16 ug/2 ml dose) of inactivated recombinant ORF2 antigen adjuvanted with Carbopol (16 ug rORF2 – Carbopol). PCV2 Vaccine No. 4, administered at

1 x 1 ml dose to Group 4, was a high dose (16 ug /1 ml dose) of a partially purified VIDO R-1 generated PCV2 ORF2 antigen adjuvanted with Carbopol (16 ug vORF2 – Carbopol). Vaccine No. 5, administered at 1 x 2 ml dose to Group 5, was a 4 ug/2 ml dose of an inactivated recombinant ORF2 antigen adjuvanted with Carbopol (4 ug rORF2 – Carbopol).
5 PCV2 Vaccine No. 6, administered at 1 x 2 ml dose to Group 6, was a 1 ug/2 ml dose of an inactivated recombinant ORF2 antigen adjuvanted with Carbopol (1 ug rORF2 – Carbopol). PCV2 Vaccine No. 7, administered at 1 x 2 ml dose to Group 7, was a low dose (0.25 ug/2 ml dose) of inactivated recombinant ORF2 antigen adjuvanted with Carbopol (0.25 ug rORF2 – Carbopol). PCV2 Vaccine No. 8, administered at 1 x 2 ml dose to Group 8, was a high dose
10 (pre-inactivation titer > 8.0 log/2 ml dose) Inactivated Conventional Killed VIDO R-1 generated PCV2 Struve antigen adjuvanted with Carbopol (>8.0 log KV – Carbopol). On Day 0, Groups 1-8 were treated with their assigned vaccines. Groups 1-3 and 5-8 received boosters of their respective vaccines again on Day 14. The effectiveness of a single dose of 16 µg of vORF2 – Carbopol was tested on Group 4 which did not receive a booster on Day
15 14. Piglets were observed for adverse events and injection site reactions following both vaccinations. On Day 21 the piglets were moved to a second study site where Groups 1-9 were group housed in one building and Group 10 was housed in a separate building. All pigs received keyhole limpet hemocyanin emulsified with incomplete Freund's adjuvant (KLH/ICFA) on Days 22 and 28. On Day 25, Groups 1-9 were challenged with
20 approximately 4 logs of virulent PCV2 virus. By Day 46, very few deaths had occurred in the challenge control group. In an attempt to immunostimulate the pigs and increase the virulence of the PCV2 challenge material, all Groups were treated with INGELVAC® PRRSV MLV (Porcine Reproductive and Respiratory Vaccine, Modified Live Virus) on Day 46.

Pre- and post-challenge blood samples were collected for PCV2 serology. Post-challenge, body weight data for determination of average daily weight gain (ADWG) and observations of clinical signs were collected. On Day 50, all surviving pigs were necropsied, gross lesions were recorded, lungs were scored for pathology, and selected tissues were preserved in formalin for examination by Immunohistochemistry (IHC) for detection of PCV2 antigen at a later date.

Materials and Methods

This was a partially-blind vaccination-challenge feasibility study conducted in CDCD pigs, 6 to 16 days of age on Day 0. To be included in the study, PCV2 IFA titers of sows were $\leq 1:1000$. Additionally, the serologic status of sows were from a known PRRS-negative herd. Sixteen (16) sows were tested for PCV2 serological status and all sixteen (16) had a PCV2 titer of ≤ 1000 and were transferred to the first study site. One hundred fifty (150) piglets were delivered by cesarean section surgeries and were available for this study on Day -3. On Day -3, 150 CDCD pigs at the first study site were weighed, identified with ear tags, blocked by weight and randomly assigned to 1 of 10 groups, as set forth above in table 16. Blood samples were collected from all pigs. If any test animal meeting the inclusion criteria was enrolled in the study and was later excluded for any reason, the Investigator and Monitor consulted in order to determine the use of data collected from the animal in the final analysis. The date of which enrolled piglets were excluded and the reason for exclusion was documented. No sows meeting the inclusion criteria, selected for the study and transported to the first study site were excluded. No piglets were excluded from the study, and no test animals were removed from the study prior to termination. Table 17 describes the time frames for the key activities of this Example.

Table 17. Study Activities

Study Day	Actual Dates	Study Activity
-3	4-04-03	Weighed pigs; health exam; randomized to groups; collected blood samples
-3, 0-21	4-04-03 4-07-03 to 5-27-03	Observed for overall health and for adverse events post-vaccination
0	4-07-03	Administered respective IVPs to Groups 1-8
0-7	4-07-03 to 4-14-03	Observed pigs for injection site reactions
14	4-21-03	Boostered Groups 1-3, 5-8 with respective IVPs; blood sampled all pigs
14-21	4-21-03 to 4-28-03	Observed pigs for injection reactions
19-21	4-26-03 to 4-28-03	Treated all pigs with antibiotics
21	4-28-03	Pigs transported from Struve Labs, Inc. to Veterinary Resources, Inc.(VRI)
22-50	4-28-03 to 5-27-03	Observed pigs for clinical signs post-challenge
22	4-29-03	Treated Groups 1-10 with KLH/ICFA
25	5-02-03	Collected blood samples from all pigs; weighed all pigs; challenged Groups 1-9 with PCV2 challenge material
28	5-05-03	Treated Groups 1-10 with KLH/ICFA
32	5-09-03	Collected blood samples from all pigs
46	5-23-03	Administered INGELVAC® PRRS MLV to all groups
50	5-27-03	Collected blood samples, weighed and necropsied all pigs; gross lesions were recorded; lungs were evaluated for lesions; fresh and formalin fixed tissue samples were saved; In-life phase of the study was completed

Following completion of the in-life phase of the study, formalin fixed tissues were
 5 examined by Immunohistochemistry (IHC) for detection of PCV2 antigen by a pathologist,
 blood samples were evaluated for PCV2 serology, and average daily weight gain (ADWG)
 was determined from Day 25 to Day 50.

Animals were housed at the first study site in individual cages in seven rooms from
 birth to approximately 11 days of age (approximately Day 0 of the study). Each room was

identical in layout and consisted of stacked individual stainless steel cages with heated and filtered air supplied separately to each isolation unit. Each room had separate heat and ventilation, thereby preventing cross-contamination of air between rooms. Animals were housed in two different buildings at the second study site. Group 10 (The Strict negative control group) was housed separately in a converted nursery building and Groups 1-9 were housed in a converted farrowing building. Each group was housed in a separate pen (14-15 pigs per pen) and each pen provided approximately 2.3 square feet per pig. Groups 2, 4 and 8 were penned in three adjacent pens on one side of the alleyway and Groups 1, 3, 5, 6, 7, and 9 were penned in six adjacent pens on the other side of the alleyway. The Group separation was due to concern by the Study Monitor that vaccines administered to Groups 2, 4, and 8 had not been fully inactivated. Each pen was on an elevated deck with plastic slatted floors. A pit below the pens served as a holding tank for excrement and waste. Each building had its own separate heating and ventilation systems, with little likelihood of cross-contamination of air between buildings.

At the first study site, piglets were fed a specially formulated milk ration from birth to approximately 3 weeks of age. All piglets were consuming solid, special mixed ration by Day 21 (approximately 4 ½ weeks of age). At the second study site, all piglets were fed a custom non-medicated commercial mix ration appropriate for their age and weight, *ad libitum*. Water at both study sites was also available *ad libitum*.

All test pigs were treated with 1.0 mL of NAXCEL®, IM, in alternating hams on Days 19, 20, and 21. In addition, Pig No. 11 (Group 1) was treated with 0.5 mL of NAXCEL® IM on Day 10, Pig No. 13 (Group 10) was treated with 1 mL of Penicillin and 1 mL of PREDEF® 2X on Day 10, Pig No. 4 (Group 9) was treated with 1.0 mL of NAXCEL® IM on Day 11, and Pigs 1 (Group 1), 4 and 11 were each treated with 1.0 mL of NAXCEL®

on Day 14 for various health reasons.

While at both study sites, pigs were under veterinary care. Animal health examinations were conducted on Day -3 and were recorded on the Health Examination Record Form. All animals were in good health and nutritional status before vaccination as determined by observation on Day 0. All test animals were observed to be in good health and nutritional status prior to challenge. Carcasses and tissues were disposed of by rendering. Final disposition of study animals was recorded on the Animal Disposition Record.

On Days 0 and 14, pigs assigned to Groups 1-3 and 5-8 received 2.0 mL of assigned PCV2 Vaccines 1-4, respectively, IM in the right and left neck region, respectively, using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x ½" needle. Pigs assigned to Group 4 received 1.0 mL of PCV2 Vaccine No. 2, IM in the right neck region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x ½" needle on Day 0 only.

On Day 22 all test pigs received 2.0 mL of KLH/ICFA IM in the left neck region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x 1" needle. On Day 28 all test pigs received 2.0 mL of KLH/ICFA in the right ham region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x 1" needle.

On Day 25, pigs assigned to Groups 1-9 received 1.0 mL of PCV2 ISUVDL challenge material (3.98 log₁₀ TCID₅₀/mL) IM in the right neck region using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and a sterile 20g x 1" needle. An additional 1.0 mL of the same material was administered IN to each pig (0.5 mL per nostril) using a sterile 3.0 mL Luer-lock syringe and nasal canula.

On Day 46, all test pigs received 2.0 mL INGELVAC® PRRS MLV, IM, in the right neck region using a sterile 3.0 mL Luerlock syringe and a sterile 20g x 1" needle. The PRRSV MLV was administered in an attempt to increase virulence of the PCV2 challenge

material.

Test pigs were observed daily for overall health and adverse events on Day -3 and from Day 0 to Day 21. Each of the pigs were scored for normal or abnormal behavior, respiration or cough. Observations were recorded on the Clinical Observation Record. All test pigs were observed from Day 0 to Day 7, and Group 7 was further observed from Day 14 to 21, for injection site reactions. Average daily weight gain was determined by weighing each pig on a calibrated scale on Days -3, 25 and 50, or on the day that a pig was found dead after challenge. Body weights were recorded on the Body Weight Form. Day -3 body weights were utilized to block pigs prior to randomization. Day 25 and Day 50 weight data was utilized to determine the average daily weight gain (ADWG) for each pig during these time points. For pigs that died after challenge and before Day 50, the ADWG was adjusted to represent the ADWG from Day 25 to the day of death.

In order to determine PCV2 serology, venous whole blood was collected from each piglet from the orbital venous sinus on Days -3 and 14. For each piglet, blood was collected from the orbital venous sinus by inserting a sterile capillary tube into the medial canthus of one of the eyes and draining approximately 3.0 mL of whole blood into a 4.0 mL Serum Separator Tube (SST). On Days 25, 32, and 50, venous whole blood from each pig was collected from the anterior vena cava using a sterile 20g x 1 1/2" Vacutainer® needle (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey), a Vacutainer® needle holder and a 13 mL SST. Blood collections at each time point were recorded on the Sample Collection Record. Blood in each SST was allowed to clot, each SST was then spun down and the serum harvested. Harvested serum was transferred to a sterile snap tube and stored at -70±10° C until tested at a later date. Serum samples were tested for the presence of PCV2 antibodies by BIVI-R&D personnel.

Pigs were observed once daily from Day 22 to Day 50 for clinical symptoms and scored for normal or abnormal behavior, respiration or cough. Clinical observations were recorded on the Clinical Observation Record.

5 Pigs Nos. 46 (Group 1) and 98 (Groups 9) died at the first study site. Both of these deaths were categorized as bleeding deaths and necropsies were not conducted on these two pigs. At the second study site, pigs that died after challenge and prior to Day 50, and pigs euthanized on Day 50, were necropsied. Any gross lesions were noted and the percentages of lung lobes with lesions were recorded on the Necropsy Report Form.

10 From each of the pigs necropsied at the second study site, a tissue sample of tonsil, lung, heart, and mesenteric lymph node was placed into a single container with buffered 10% formalin; while another tissue sample from the same aforementioned organs was placed into a Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK) and each Whirl-pak® was placed on ice. Each container was properly labeled. Sample collections were recorded on the Necropsy Report Form. Afterwards, formalin-fixed tissue samples and a Diagnostic Request Form
15 were submitted for IHC testing. IHC testing was conducted in accordance with standard laboratory procedures for receiving samples, sample and slide preparation, and staining techniques. Fresh tissues in Whirl-paks® were shipped with ice packs to the Study Monitor for storage ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ} \text{C}$) and possible future use.

20 Formalin-fixed tissues were examined by a pathologist for detection of PCV2 by IHC and scored using the following scoring system: 0 = None; 1 = Scant positive staining, few sites; 2 = Moderate positive staining, multiple sites; and 3 = Abundant positive staining, diffuse throughout the tissue. For analytical purposes, a score of 0 was considered "negative," and a score of greater than 0 was considered "positive."

Results

Results for this example are given below. It is noted that Pigs No. 46 and 98 died on days 14 and 25 respectively. These deaths were categorized as bleeding deaths. Pig No. 11 (Group 1) was panting with rapid respiration on Day 15. Otherwise, all pigs were normal for behavior, respiration and cough during this observation period and no systemic adverse events were noted with any groups. No injection site reactions were noted following vaccination on Day 0. Following vaccination on Day 14, seven (7) out of fourteen (14) Group 1 pigs (50.0%) had swelling with a score of "2" on Day 15. Four (4) out of fourteen (14) Group 1 (28.6%) still had a swelling of "2" on Day 16. None of the other groups experienced injection site reactions following either vaccination.

Average daily weight gain (ADWG) results are presented below in Table 18. Pigs No. 46 and 98 that died from bleeding were excluded from group results. Group 4, which received one dose of 16 ug vORF2 – Carbopol, had the highest ADWG (1.16 ± 0.26 lbs/day), followed by Groups 1, 2, 3, 5, 6, and 10 which had ADWGs that ranged from 1.07 ± 0.23 lbs/day to 1.11 ± 0.26 lbs/day. Group 9 had the lowest ADWG (0.88 ± 0.29 lbs/day), followed by Groups 8 and 7, which had ADWGs of 0.93 ± 0.33 lbs/day and 0.99 ± 0.44 lbs/day, respectively.

Table 18. Summary of Group Average Daily Weight Gains (ADWG)

Group	Treatment	N	ADWG - lbs/day (Day 25 to Day 50) or adjusted for pigs dead before Day 50
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 doses	14	1.08 ± 0.30 lbs/day
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	1.11 ± 0.16 lbs/day
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	1.07 ± 0.21 lbs/day

4	vORF2 - 16 µg – Carbopol 1 dose	15	1.16 ± 0.26 lbs/day
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 1 dose	15	1.07 ± 0.26 lbs/day
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 doses	15	1.11 ± 0.26 lbs/day
7	rORF2 - 0.25 µg – Carbopol 2 doses	15	0.99 ± 0.44 lbs/day
8	KV > 8.0 log – Carbopol 2 doses	15	0.93 ± 0.33 lbs/day
9	Challenge Controls	14	0.88 ± 0.29 lbs/day
10	Strict Negative Controls	15	1.07 ± 0.23 lbs/day

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

PVC2 serology results are presented below in Table 19. All ten (10) groups were seronegative for PCV2 on Day -3. On Day 14, PCV2 titers remained low for all ten (10) groups (range of 50-113). On Day 25, Group 8, which received the whole cell killed virus vaccine, had the highest PCV2 titer (4617), followed by Group 2, which received 16 ug vORF2 – Carbopol, Group 4, which received as single dose of 16 ug vORF2 – Carbopol, and Group 3, which received 16 ug rORF2 – Carbopol, which had titers of 2507, 1920 and 1503 respectively. On Day 32 (one week post challenge), titers for Groups 1-6 and Group 8 ranged from 2360 to 7619; while Groups 7 (0.25 ug rORF2 – Carbopol), 9 (Challenge Control), and 10 (Strict negative control) had titers of 382, 129 and 78 respectively. On Day 50 (day of necropsy), all ten (10) groups demonstrated high PCV2 titers (≥ 1257).

On Days 25, 32, and 50, Group 3, which received two doses of 16 ug rORF2 – Carbopol had higher antibody titers than Group 1, which received two doses of 16 ug rORF2 – IMS 1314. On Days 25, 32 and 50, Group 2, which received two doses of 16 ug vORF2 had higher titers than Group 4, which received only one does of the same vaccine. Groups 3,

5, 6, 7, which received decreasing levels of rORF2 – Carbopol, of 16, 4, 1, and 0.25 ug respectively, demonstrated correspondingly decreasing antibody titers on Days 25 and 32.

Table 19. Summary of Group PCV2 IFA Titers

Group	Treatment	Day -3	Day 14**	Day 25***	Day 32	Day 50****
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 doses	50	64	646	3326	4314
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol 1 dose	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 1 dose	50	61	1867	3933	4533
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 doses	50	70	490	2360	5740
7	rORF2 – 0.25 µg – Carbopol 2 doses	50	73	63	382	5819
8	KV > 8.0 log – Carbopol 2 doses	50	97	4617	7619	10817
9	Challenge Controls	50	53	50	129	4288
10	Strict Negative Controls	50	50	50	78	11205

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

*For calculation purposes, a ≤100 IFA titer was designated as a titer of “50”; a ≥400 IFA titer was designated as a titer of “12,800”.

**Day of Challenge

***Day of Necropsy

The results from the post-challenge clinical observations are presented below. Table

20 includes observations for Abnormal Behavior, Abnormal Respiration, Cough and Diarrhea. Table 21 includes the results from the Summary of Group Overall Incidence of Clinical Symptoms and Table 22 includes results from the Summary of Group Mortality Rates Post-challenge. The incidence of abnormal behavior, respiration and cough post-challenge were low in pigs receiving 16 ug rORF2-IMS 1314 (Group 1), 16 ug rORF2-Carbopol (Group 3), 1 ug rORF2-Carbopol (Group 6), 0.25 ug rORF2-Carbopol (Group 7), and in pigs in the Challenge Control Group (Group 9). The incidence of abnormal behavior respiration and cough post-challenge was zero in pigs receiving 16 ug vORF2-Carbopol (Group 2), a single dose of 16ug vORF2-Carbopol (Group 4), 4 ug rORF2-Carbopol (Group 5), >8 log KV-Carbopol (Group 8), and in pigs in the strict negative control group (Group 10).

The overall incidence of clinical symptoms varied between groups. Pigs receiving 16 ug vORF2-Carbopol (Group 2), a single dose of 16 ug vORF2-Carbopol (Group 4), and pigs in the Strict negative control group (Group 10) had incidence rates of 0%; pigs receiving 16 ug rORF2-Carbopol (Group 3), and 1 ug rORF2-Carbopol (Group 6) had incidence rates of 6.7%; pigs receiving 16 ug rORF2-IMS 1314 (Group 1) had an overall incidence rate of 7.1%; pigs receiving 4 ug rORF2-Carbopol (Group 5), 0.25 ug rORF2-Carbopol (Group 7), and >8 log KV vaccine had incidence rates of 13.3%; and pigs in the Challenge Control Group (Group 9) had an incidence rate of 14.3%.

Overall mortality rates between groups varied as well. Group 8, which received 2 doses of KV vaccine had the highest mortality rate of 20.0%; followed by Group 9, the challenge control group, and Group 7, which received 0.25 ug rORF2-Carbopol and had mortality rates of 14.3% and 13.3% respectively. Group 4, which received one dose of 16 ug vORF2-Carbopol had a 6.7% mortality rate. All of the other Groups, 1, 2, 3, 5, 6, and 10 had

a 0% mortality rate.

Table 20. Summary of Group Observations for Abnormal Behavior, Abnormal Respiration, and Cough Post-Challenge

Group	Treatment	N	Abnormal Behavior ¹	Abnormal Behavior ²	Cough ³
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 doses	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7.1%)
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol 1 dose	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 1 dose	15	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)	0/15 (0%)
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)
7	rORF2 – 0.25 µg – Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)
8	KV > 8.0 log – Carbopol 2 doses	15	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)	0/15 (0%)
9	Challenge Controls	14	1/14 (7.1%)	1/14 (7.1%)	2/14 (14.3%)
10	Strict Negative Controls	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

5 ¹Total number of pigs in each group that demonstrated any abnormal behavior for at least one day

²Total number of pigs in each group that demonstrated any abnormal respiration for at least one day

³Total number of pigs in each group that demonstrated a cough for at least one day

Table 21. Summary of Group Overall Incidence of Clinical Symptoms Post-Challenge

Group	Treatment	N	Incidence of pigs with Clinical Symptoms ¹	Incidence Rate
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 doses	14	1	7.1%
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	0	0.0%
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	1	6.7%
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol 1 dose	15	0	0.0%
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 1 dose	15	2	13.3%
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 doses	15	1	6.7%
7	rORF2 – 0.25 µg – Carbopol 2 doses	15	2	13.3%
8	KV > 8.0 log – Carbopol 2 doses	15	2	13.3%
9	Challenge Controls	14	2	14.3%
10	Strict Negative Controls	15	0	0.0%

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

5

¹Total number of pigs in each group that demonstrated any clinical symptom for at least one day

Table 22. Summary of Group Mortality Rates Post-Challenge

Group	Treatment	N	Dead Post-challenge	Mortality Rate
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 doses	14	0	0.0%

2	vORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	0	0.0%
3	rORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	0	0.0%
4	vORF2 - 16 µg - Carbopol 1 dose	15	1	6.7%
5	rORF2 - 4 µg - Carbopol 1 dose	15	0	0.0%
6	rORF2 - 1 µg - Carbopol 2 doses	15	0	0.0%
7	rORF2 - 0.25 µg - Carbopol 2 doses	15	2	13.3%
8	KV > 8.0 log - Carbopol 2 doses	15	3	20.0%
9	Challenge Controls	14	2	14.3%
10	Strict Negative Controls	15	0	0.0%

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

5 The Summary of Group Mean Percentage Lung Lesions and Tentative Diagnosis is given below in Table 23. Group 9, the challenge control group, had the highest percentage lung lesions with a mean of $10.81 \pm 23.27\%$, followed by Group 7, which received 0.25 ug rORF2–Carbopol and had a mean of $6.57 \pm 24.74\%$, Group 5, which received 4 ug rORF2–Carbopol and had a mean of $2.88 \pm 8.88\%$, and Group 8, which received the KV vaccine and had a mean of $2.01 \pm 4.98\%$. The remaining six (6) groups had lower mean percentage lung
10 lesions that ranged from $0.11 \pm 0.38\%$ to $0.90 \pm 0.15\%$.

Tentative diagnosis of pneumonia varied among the groups. Group 3, which received two doses of 16 ug rORF2–Carbopol, had the lowest tentative diagnosis of pneumonia, with 13.3%. Group 9, the challenge control group, had 50% of the group tentatively diagnosed with pneumonia, followed by Group 10, the strict negative control group and Group 2, which
15 received two doses of 16 ug vORF2–Carbopol, with 46.7% of 40% respectively, tentatively

diagnosed with pneumonia.

Groups 1, 2, 3, 5, 9, and 10 had 0% of the group tentatively diagnosed as PCV2 infected; while Group 8, which received two doses of KV vaccine, had the highest group rate of tentative diagnosis of PCV2 infection, which 20%. Group 7, which received two doses of 0.25 ug rORF2–Carbopol, and Group 4, which received one dose of 16 ug vORF2–Carbopol had tentative group diagnoses of PCV2 infection in 13.3% and 6.7% of each group, respectively.

Gastric ulcers were only diagnosed in one pig in Group 7 (6.7%); while the other 9 groups remained free of gastric ulcers.

10

Table 23. Summary of Group Mean % Lung Lesion and Tentative Diagnosis

Group	Treatment	N	No. Of pigs that shed for at least one day	Incidence Rate
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 doses	15	0	0%
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	1	6.7%
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	3	20.0%
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol 1 dose	15	2	13.3%
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 1 dose	15	3	20.0%
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 doses	15	6	40.0%
7	rORF2 – 0.25 µg – Carbopol 2 doses	15	7	46.7%
8	KV > 8.0 log – Carbopol 2 doses	15	12	80%

9	Challenge Controls	14	14	100.0%
10	Strict Negative Controls	15	14	93.3%

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

The Summary of Group IHC Positive Incidence Results are shown below in Table 24.

5 Group 1 (16 ug rORF2 – IMS 1314) had the lowest group rate of IHC positive results with 0% of the pigs positive for PCV2, followed by Group 2 (16 ug vORF2 – Carbopol) and Group 4 (single dose 16 ug vORF2 – Carbopol), which had group IHC rates of 6.7% and 13.3% respectively. Group 9, the challenge control group, had the highest IHC positive incidence rate with 100% of the pigs positive for PCV2, followed by Group 10, the strict negative control group, and Group 8 (KV vaccine), with 93.3% and 80% of the pigs positive for PCV2, respectively.

Table 24. Summary of Group IHC Positive Incidence Rate

Group	Treatment	N	No. Of pigs that shed for at least one day	Incidence Rate
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 2 doses	15	0	0%
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	1	6.7%
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	3	20.0%
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol 1 dose	15	2	13.3%
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol 1 dose	15	3	20.0%
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol 2 doses	15	6	40.0%

7	rORF2 - 0.25 µg - Carbopol 2 doses	15	7	46.7%
8	KV > 8.0 log - Carbopol 2 doses	15	12	80%
9	Challenge Controls	14	14	100.0%
10	Strict Negative Controls	15	14	93.3%

vORF2 = isolated viral ORF2; rORF2 = recombinant baculovirus expressed ORF2; KV or killed whole cell virus = PCV2 virus grown in suitable cell culture

Discussion

5 Seven PCV2 vaccines were evaluated in this example, which included a high dose (16 µg) of rORF2 antigen adjuvanted with IMS 1314 administered twice, a high dose (16 µg) of vORF2 antigen adjuvanted with Carbopol administered once to one group of pigs and twice to a second group of pigs, a high dose (16 µg) of rORF2 antigen adjuvanted with Carbopol administered twice, a 4 µg dose of rORF2 antigen adjuvanted with Carbopol administered twice, a 1 µg dose of rORF2 antigen adjuvanted with Carbopol administered twice, a low dose (0.25 µg) of rORF2 antigen adjuvanted with Carbopol administered twice, and a high dose (> 8 log) of killed whole cell PCV2 vaccine adjuvanted with Carbopol. Overall, Group 1, which received two doses of 16 µg rORF2 - IMS 1314, performed slightly better than Groups 2 through 7, which received vaccines containing various levels of either vORF2 or rORF2 antigen adjuvanted with Carbopol and much better than Group 8, which received two doses of killed whole cell PCV2 vaccine. Group 1 had the third highest ADWG (1.80 ± 0.30 lbs/day), the lowest incidence of abnormal behavior (0%), the lowest incidence of abnormal respiration (0%), a low incidence of cough (7.1%), a low incidence of overall clinical symptoms (7.1%), was tied with three other groups for the lowest mortality rate (0%), the second lowest rate for mean % lung lesions (0.15 ± 0.34%), the second lowest rate for pneumonia (21.4%) and the lowest incidence rate for positive IHC tissues (0%). Group 1 was,

however, the only group in which injection site reactions were noted, which included 50% of the vaccinates 1 day after the second vaccination. The other vaccines administered to Groups 2 through 7 performed better than the killed vaccine and nearly as well as the vaccine administered to Group 1.

5 Group 8, which received two doses of killed PCV2 vaccine adjuvanted with Carbopol, had the worst set of results for any vaccine group. Group 8 had the lowest ADWG (0.93 ± 0.33 lbs/day), the second highest rate of abnormal behavior (6.7%), the highest rate of abnormal respiration (6.7%), was tied with three other groups for the highest overall incidence rate of clinical symptoms (13.3%), had the highest mortality rate of all groups
10 (20%), and had the highest positive IHC rate (80%) of any vaccine group. There was concern that the killed whole cell PCV2 vaccine may not have been fully inactivated prior to administration to Group 8, which may explain this group's poor results. Unfortunately, definitive data was not available to confirm this concern. Overall, in the context of this example, a Conventional Killed PCV2 vaccine did not aid in the reduction of PCV2
15 associated disease.

As previously mentioned, no adverse events were associated with the test vaccines with exception of the vaccine adjuvanted with IMS 1314. Injection site reactions were noted in 50.0% of the pigs 1 day after the second vaccination with the vaccine formulated with IMS 1314 and in 28.6% of the pigs 2 days after the second vaccination. No reactions were noted
20 in any pigs receiving Carbopol adjuvanted vaccines. Any further studies that include pigs vaccinated with IMS 1314 adjuvanted vaccines should continue to closely monitor pigs for injection site reactions.

All pigs were sero-negative for PCV2 on Day -3 and only Group 2 had a titer above 100 on Day 14. On Day 25 (day of challenge), Group 8 had the highest PCV2 antibody titer

(4619), followed by Group 2 (2507). With the exception of Groups 7, 9 and 10, all groups demonstrated a strong antibody response by Day 32. By Day 50, all groups including Groups 7, 9 and 10 demonstrated a strong antibody response.

One of the hallmarks of late stage PCV2 infection and subsequent PMWS development is growth retardation in weaned pigs, and in severe cases, weight loss is noted. Average daily weight gain of groups is a quantitative method of demonstrating growth retardation or weight loss. In this example, there was not a large difference in ADWG between groups. Group 8 had the lowest ADWG of 0.88 ± 0.29 lbs/day, while Group 4 had the highest ADWG of 1.16 ± 0.26 lb/day. Within the context of this study there was not a sufficient difference between groups to base future vaccine efficacy on ADWG.

In addition to weight loss – dyspnea, lethargy, pallor of the skin and sometimes icterus are clinical symptoms associated with PMWS. In this example, abnormal behavior and abnormal respiration and cough were noted infrequently for each group. As evidenced in this study, this challenge model and challenge strain do not result in overwhelming clinical symptoms and this is not a strong parameter on which to base vaccine efficacy.

Overall, mortality rates were not high in this example and the lack of a high mortality rate in the challenge control group limits this parameter on which to base vaccine efficacy. Prior to Day 46, Groups 4 and 7 each had one out of fifteen pigs die, Group 9 had two out of fourteen pigs die and Group 8 had three out of fifteen pigs die. Due to the fact that Group 9, the challenge control group was not demonstrating PCV2 clinical symptoms and only two deaths had occurred in this group by Day 46, Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus (PRRSV) MLV vaccine was administered to all pigs on Day 46. Earlier studies had utilized INGELVAC® PRRS MLV as an immunostimulant to exasperate PCV2-associated PMWS disease and mortality rates were higher in these earlier studies. Two

deaths occurred shortly after administering the PRRS vaccine on Day 46 – Group 4 had one death on Day 46 and Group 7 had one death on Day 47 – which were probably not associated with the administration of the PRRS vaccine. By Day 50, Group 8, which received two doses of killed vaccine, had the highest mortality rate (20%), followed by Group 9 (challenge control) and Group 7 (0.25 ug rORF2 – Carbopol), with mortality rates of 14.3% and 13.3% respectively. Overall, administration of the PRRS vaccine to the challenge model late in the post-challenge observation phase of this example did not significantly increase mortality rates.

Gross lesions in pigs with PMWS secondary to PCV2 infection typically consist of generalized lymphadenopathy in combination with one or more of the following: (1) interstitial pneumonia with interlobular edema, (2) cutaneous pallor or icterus, (3) mottled atrophic livers, (4) gastric ulcers and (5) nephritis. At necropsy (Day 50), icterus, hepatitis, and nephritis were not noted in any groups. A gastric ulcer was noted in one Group 7 pig, but lymphadenopathy was not specifically examined for. Based on the presence of lesions that were consistent with PCV2 infection, three groups had at least one pig tentatively diagnosed with PCV2 (PMWS). Group 8, which received two doses of killed vaccine, had 20% tentatively diagnosed with PCV2, while Group 7 and Group 4 had 13.3% and 6.7%, respectively, tentatively diagnosed with PCV2. The mean % lung lesion scores varied between groups at necropsy. Groups 1, 2, 3, 4, 6 and 10 had low % lung lesion scores that ranged from $0.11 \pm 0.38\%$ to $0.90 \pm 0.15\%$. As expected, Group 9, the challenge control group, had the highest mean % lung lesion score ($10.81 \pm 23.27\%$). In four groups, the mean % lung lesion scores were elevated due to one to three pigs in each of these groups having very high lung lesion scores. The lung lesions were red/purple and consolidated. Typically, lung lesions associated with PMWS are described as tan, non-collapsible with interlobular

edema. The lung lesions noted in this study were either not associated with PCV2 infection or a second pulmonary infectious agent may have been present. Within the context of this study, the % lung lesion scores probably do no reflect a true measure of the amount of lung infection due to PCV2. Likewise, tentative diagnosis of pneumonia may have been over-
5 utilized as well. Any pigs with lung lesions, some as small as 0.10% were listed with a tentative diagnosis of pneumonia. In this example, there was no sufficient difference between groups with respect to gross lesions and % lung lesions on which to base vaccine efficacy.

IHC results showed the largest differences between groups. Group 1 (16 µg rORF2 – IMS 1314) had the lowest positive IHC results for PCV2 antigen (0%); while Groups 9 and
10 had the highest positive IHC results with incidence rates of 100% and 93.3% respectively. Groups 3, 5, 6 and 7, which received 16, 4, 1 or 0.25 µg of rORF2 antigen, respectively, adjuvanted with Carbopol, had IHC positive rates of 20%, 20%, 40% and 46.7%, respectively. Group 2, which received two doses of 16 µg vORF2 adjuvanted with Carbopol had an IHC positive rate of 6.7%, while Group 4 which received only one dose of the same
15 vaccine, had an IHC positive rate of 13.3%. Due to the objective nature of this test and the fact that IHC results correlated with expected results, IHC testing is probably one of the best parameters on which to base vaccine efficacy.

Thus in one aspect of the present invention, the Minimum Protective Dosage (MPD) of PCV2 rORF2 antigen adjuvanted with Carbopol in the CDCD pig model in the face of a
20 PCV2 challenge is determined. Groups 3, 5, 6 and 7 each received two doses of rORF2 antigen adjuvanted with Carbopol, but the level of rORF2 antigen varied for each group. Groups 3, 5, 6 and 7 each received 16, 4, 1 or 0.25 µg of rORF2 antigen respectively. In general, decreasing the level of rORF2 antigen decreased PCV2 antibody titers, and increased the mortality rate, mean % lung lesions and the incidence of IHC positive tissues. Of the four

groups receiving varying levels of rORF2 – Carbopol, Groups 3 and 5, which received two doses of 16 or 4 µg of rORF2 antigen, respectively, each had an IHC positive rate of only 20%, and each had similar antibody titers. Overall, based on IHC positive results, the minimum protective dosage of rORF2 antigen administered twice is approximately 4 µg.

5 In another aspect of the present invention, the antigenicity of recombinant (rORF2) and VIDO R-1 (vORF2) PCV2 antigens were assessed. Group 2 received two doses of 16 µg vORF2 and Group 3 received two doses of 16 µg rORF2. Both vaccines were adjuvanted with Carbopol. Both vaccines were found to be safe and both had 0% mortality rate. Group 2 had a PCV2 antibody titer of 2507 on Day 25, while Group 3 had a PCV2 antibody titer of 10 1503. Group 3 had a lower mean % lung lesion score than Group 2 ($0.11 \pm 0.38\%$ vs. $0.90 \pm 0.15\%$), but Group 2 had a lower IHC positive incidence rate than Group 3 (6.7% vs. 20%). Overall, both vaccines had similar antigenicity, but vORF2 was associated with slightly better IHC results.

In yet another aspect of the present invention, the suitability of two different adjuvants 15 (Carbopol and IMS 1314) was determined. Groups 1 and 3 both received two doses of vaccine containing 16 µg of rORF2 antigen, but Group 1 received the antigen adjuvanted with IMS 1314 while Group 3 received the antigen adjuvanted with Carbopol. Both groups had essentially the same ADWG, essentially the same incidence of clinical signs post-challenge, the same mortality rate, and essentially the same mean % lung lesions; but Group 1 had an 20 IHC positive rate of 0% while Group 3 had an IHC positive rate of 20%. However, Group 3, which received the vaccine adjuvanted with Carbopol had higher IFAT PCV2 titers on Days 25, 32 and 50 than Group 1, which received the vaccine adjuvanted with IMS 1314. Overall, although the PCV2 vaccine adjuvanted with IMS 1314 did provide better IHC results, it did not provide overwhelmingly better protection from PCV2 infection and did induce injection

site reaction. Whereas the PCV2 vaccine adjuvanted with Carbopol performed nearly as well as the IMS 1314 adjuvanted vaccine, but was not associated with any adverse events.

5 In still another aspect of the present invention, the feasibility of PCV2 ORF2 as a 1ml, 1 dose product was determined. Groups 2 and 4 both received 16 µg of vORF2 vaccine adjuvanted with Carbopol on Day 0, but Group 2 received a second dose on Day 14. Group 4 had a slightly higher ADWG and a lower mean % lung lesions than Group 2, but Group 2 had higher IFAT PCV2 titers on Day 25, 32 and 50, and a slightly lower incidence rate of IHC positive tissues. All other results for these two groups were similar. Overall, one dose of vORF2 adjuvanted with Carbopol performed similar to two doses of the same vaccine.

10

What is claimed is:

1. A method of recovering recombinant protein expressed by open reading frame 2 of PCV2 comprising the steps of:

- A) cloning said recombinant open reading frame 2 from PCV2 into a transfer vector;
- B) transfecting the portion of said transfer vector containing said recombinant open reading frame 2 into a virus;
- C) infecting cells in media with said virus;
- D) causing said virus to express the protein from said open reading frame 2;
- E) separating cells from said vector from the supernate; and
- F) recovering said expressed open reading frame 2 protein in said supernate.

2. The method of claim 1, said method further including the step of amplifying said open reading frame 2 from a strain of PCV2 prior to cloning said open reading frame into said transfer vector.

3. The method of claim 1, said recombinant open reading frame 2 further comprising a sequence selected from the group consisting of a 5' Kozak's sequence, a 3' EcoR1 site, and combinations thereof.

4. The method of claim 3, said 5' Kozak's sequence comprising SEQ ID NO: 1.

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 periodo 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 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+ 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 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, 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 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 especie 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 elicitaba 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 presencias 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 citopatogénico (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 μL 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°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°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 deben marcar como sigue, título bajo, título medio, título alto, activado/filtrado (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 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 + 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 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 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 μ l 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 μ l/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 ml 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 100 μ l 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

13
140

vector vírico están flanqueando el gen heterólogo. Aún más preferiblemente aquellas secuencias de flanqueo 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 flanqueo (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 5 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.

10 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 15 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.

20 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 25 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 flanco 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 flanco 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
5 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
10 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.

15 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;
20 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
25 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
5 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.

10 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
15 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
20 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.

25 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 flanqueo 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 flanqueo, 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 flanqueo 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 hidroxisteárico, 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
5 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
10 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
15 expertas en la técnica también pueden hacer referencia a la patente U.S. No.
2,909,462 que describe tales polímeros acrílicos reticulados con incompuesto
polihidroxilatado 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
20 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
25 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

10 toxina del cólera, el IMS 1314 o el dipéptido muramil entre muchos otros.

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

15 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.

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

25 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

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
10 agregar un ningún agente estabilizante adicional.

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
15 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
20 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
25 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,

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,

1-58

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% homólogo 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% homólogo con el polinucleótido de v),

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

viii) La porción inmunogénica de vii) en 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 $\mu\text{g/ml}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.0 a aproximadamente 6 $\mu\text{g/ml}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.3 a aproximadamente 3.0 $\mu\text{g/ml}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.4 a aproximadamente 2.5 $\mu\text{g/ml}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.0 $\mu\text{g/ml}$, y más preferiblemente 1.6 $\mu\text{g/ml}$.

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 ($\mu\text{g/dosis}$), más preferiblemente desde aproximadamente 0.2 a aproximadamente 400 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.3 a aproximadamente 200 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.35 a aproximadamente 100 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 50 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.45 a aproximadamente 30 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.6 a aproximadamente 15 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 0.75 a aproximadamente 8 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.0 a aproximadamente 6 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.3 a aproximadamente 3.0 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.4 a aproximadamente 2.5 $\mu\text{g/dosis}$, aún más preferiblemente desde aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.0 $\mu\text{g/dosis}$, y más preferiblemente desde aproximadamente 1.6 $\mu\text{g/dosis}$.

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 μm , 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 μm .

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 μg /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 µg de proteína ORF2 de PCV2, aún más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 16 µg, 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

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 tener 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° 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
10 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
15 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.

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

180

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

resultante se cosechan e inactivan. El sobrenadante se inactiva al llevar su temperatura a $37 \pm 2^{\circ}$ 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.

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. La 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

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 ($7.0 \mu\text{g proteína/ml a } 0.5 \mu\text{g /ml} = 570 \text{ ml } (7.0\mu\text{g /ml}) (x) = (0.5(570))$), 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.

189

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

190

	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.

- 15 En el Día 21 todos los cerdos de ensayo reciben 2.0 ml de KLH/ICFA IM, en 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 ½" (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,

195

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 tejido de los mismo órganos mencionados anterior mente se coloca en un whirl-

10 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.

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-
5 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
15 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.

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

197

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 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 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


198

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

20

- 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%)

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 día

15

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.

201
202

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 inecuación	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%

205

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

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

15

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%

			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

28
207

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.

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%).

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 μ g 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 μ g 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 (16 μ g de vORF2) y el Grupo

5 (8 μ g de rORF2) tiene la tasa de incidencia más baja de cerdos positivos para el 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

25 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
5 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
10 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
15 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
20 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	+	+	+	+

		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.

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 por 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 aloja separadamente en un edificio convertido en criadero y las Grupos 1-9 se alojan en un edificio convertido en sala de partos. Cada grupo se aloja 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 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 de 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 ($3.98 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$) 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
10 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
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;

10 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

15 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

25 propósitos analíticos una clasificación de 0 se considera "negativa" y una clasificación mayor de 0 se considera "positiva".

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.

223

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:± 0.16 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).

224

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.

10

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.

15

* 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).

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

226

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 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 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 (06.7%)
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%)

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

227

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

28

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 $10.81 \pm 23.27\%$, seguido por el Grupo 7, que recibe 0.25 ug de rORF2-Carbopol y tiene una media de $6.57 \pm 24.74\%$, el Grupo 5, que recibe 4 ug de rORF2- Carbopol y tiene una media de $2.88 \pm 8.88\%$, y el Grupo 8, que recibe la vacuna KV y tiene una media de $2.01 \pm 4.98\%$. Los seis grupos restantes (6) tienen una media de porcentaje menor de lesiones pulmonares que varía de $0.11 \pm 0.38\%$ a $0.90 \pm 0.15\%$.

229

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%

230

	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%

231

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 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 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 e 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.

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.

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 diagnostico 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 unos 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 título 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:

- 5 1. Un método para recuperar una proteína recombinante expresada al abrir
 un 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;
 - 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.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, 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 dentro de dicho
 vector de transferencia.

3. El método de la reivindicación 1, dicho 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.

5

4. El método de la reivindicación 3, dicha secuencia 5' de Kozak que comprende la SEQ ID No: 1.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS PCV2 Y MÉTODOS PARA PRODUCIR
TALES COMPOSICIONES

RESUMEN

5

Se suministra un método mejorado para recuperar la proteína expresada mediante la estructura de lectura abierta (2) proveniente de el circovirus porcino tipo (2). El método generalmente involucra las etapas de de transfectar virus recombinante que contiene secuencias codificantes de estructura de lectura abierta (2) en
10 células contenidas en medio de crecimiento, haciendo que el virus exprese estructura de lectura abierta (2) y recuperando la proteína expresada en sobrenadante. Esta recuperación debe tener lugar iniciando aproximadamente (5) días después de la infección de las células con el fin de permitir que suficientes cantidades de proteínas recombinantes sean expresadas y secretadas de la célula
15 hacia el medio de crecimiento. Tales métodos evitan procedimientos de extracción costosos y que consumen tiempo requeridos para separar y recuperar la proteína recombinante proveniente de dentro de las células.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 34816-CIP1-P	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US05/47596	International filing date (day/month/year) 29 December 2005 (29.12.2005)	Priority date (day/month/year) 29 December 2005 (29.12.2005)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC: C12Q 1/68(2006.01) USPC: 435/6			
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>11</u> sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____, containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 14 December 2006 (14.12.2006)		Date of completion of this report 20 March 2007 (20.03.2007)	
Name and mailing address of the IPEA/ US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer <i>A. H. Salimi</i> Telephone No. (571) 272-1600	

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet)(April 2005)

242

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/US05/47596

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
- ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the elements of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

- ☐ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
- pages 1-106 as originally filed/furnished
- pages* NONE received by this Authority on _____
- pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
- pages NONE as originally filed/furnished
- pages* NONE as amended (together with any statement) under Article 19
- pages* NONE received by this Authority on _____
- pages* 107-117 received by this Authority on 14 December 2006 (14.12.2006)
- ☐ the drawings:
- pages NONE as originally filed/furnished
- pages* NONE received by this Authority on _____
- pages* NONE received by this Authority on _____
- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____
- ☐ any table(s) related to the sequence listing (*specify*): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____
- ☐ any table(s) related to the sequence listing (*specify*): _____

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/US05/47596

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 36,37 and 49-53

because:

☐ the said international application, or the said claim Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 36,37 and 49-53

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

245

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US05/47596

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims <u>1-35, 38-48, 54-55</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>13, 27, 32, 54-55</u>	YES
	Claims <u>1-12, 14-26, 28-35, 38-48</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-35, 38-48, 54-55</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and Explanations (Rule 70.7)

Claims 1-12, 14-26, 28-35, 38-48 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over NAWAGITGUL et al (CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, Jan. 2002, Vol. 9, No. 1, pages 33-40), BUBLOT et al (US 6,497,883 B1), and MAHE (Journal of General Virology, 2000), for reasons of record advanced in the previous written opinion mailed 02 October 2006. Applicants argue that none of the art teaches or suggest recovering the recombinant ORF2 protein form the supernatant. Applicants further assert that it was not known that higher yields of ORF2 would be obtained from the supernatant than the infected cells that were lysed, once the infection was permitted to progress for a longer period of time. Applicants' argument as part of a response filed on 14 December 2006 has been considered fully, but they are not persuasive. None of the limitations that are argued are present in the claims, and absent such limitations the claimed invention is neither novel nor inventive. Absent specific time limitation the product obtained from the current method yield the same or similar amount of protein as previously reported by the above cited art, absent any unexpected results. The rejection for the above cited claims are maintained.

Claims 13, 27, 32, 54, and 55 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest the time line necessary to obtain the protein form the supernatant.

Claims 1-35, 38-48, 54-55 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus the industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

24b

What is claimed is:

1. A method of recovering recombinant protein expressed by open reading frame

2 of PCV2 comprising the steps of:

- A) cloning said recombinant open reading frame 2 from PCV2 into a transfer vector;
- B) transfecting the portion of said transfer vector containing said recombinant open reading frame 2 into a virus;
- C) infecting cells in media with said virus;
- D) causing said virus to express the protein from said open reading frame 2;
- E) separating cells from said vector from the supernate; and
- F) recovering said expressed open reading frame 2 protein in said supernate.

2. The method of claim 1, wherein said method further includes the step of amplifying said open reading frame 2 from a strain of PCV2 prior to cloning said open reading frame into said transfer vector.

3. The method of claim 1 or 2, wherein said recombinant open reading frame 2 further comprises a sequence selected from the group consisting of a 5' Kozak's sequence, a 3' EcoRI site, and combinations thereof.

4. The method of claim 3, wherein said 5' Kozak's sequence comprises SEQ ID NO: 1.

247

5. The method of claim 3, wherein said 3' EcoR1 site comprises SEQ ID NO: 2.
6. The method of any one of claims 1 to 5, wherein said PCV2 open reading frame comprises SEQ ID NO: 4.
7. The method of any one of claims 1 to 5, wherein said recombinant protein comprises SEQ ID No: 6.
8. The method of any one of claims 1 to 6, wherein said media comprises serum-free insect cell media.
9. The method of any one of claims 1 to 8, further comprising the steps of:
 - i) prior to step A, cloning said amplified open reading frame 2 into a first vector;
 - ii) excising said open reading frame 2 from said first vector; and
 - iii) using said excised open reading frame 2 in step A.
10. The method of any one of claims 1 to 9, wherein said cells comprise SF+ cells.
11. The method of any one of claims 1 to 10, said virus comprising baculovirus.
12. The method of any one of claims 1 to 11, wherein said transfected portion comprises SEQ ID NO: 4.

248

13. The method of any one of claims 1 to 12, wherein said open reading frame 2 protein is recovered in said supernate at least 5 days after infecting the cells with said virus.

14. A method of preparing a composition for invoking an immune response against PCV2, said method comprising the steps of:

- i) transfecting a construct into a virus, said construct comprising recombinant DNA from open reading frame 2 of PCV2;
- ii) infecting cells with said transfected virus, said cells being in a growth media;
- iii) causing said virus to express the recombinant protein from said open reading frame 2;
- iv) recovering said expressed open reading frame 2 protein in the supernate; and
- v) combining said recovered protein with a suitable adjuvant or other pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

15. The method of claim 14, wherein said method further includes the step of obtaining said construct from a transfer vector.

16. The method of claim 14 or 15, wherein said method further includes the step of amplifying said open reading frame 2 from a strain of PCV2 prior to cloning said open reading frame 2 into said transfer vector.

249

17. The method of any one of claims 14 to 16, wherein said recombinant open reading frame 2 further comprises a sequence selected from the group consisting of a 5' Kozak's sequence, a 3' EcoR1 site, and combinations thereof.
18. The method of claim 17, said 5' Kozak's sequence comprising SEQ ID No: 1.
19. The method of claim 17, said 3' EcoR1 site comprising SEQ ID No: 2.
20. The method of any one of claims 14 to 19, wherein said PCV2 open reading frame 2 comprises SEQ ID NO: 4.
21. The method of any one of claims 14 to 20, wherein said recombinant protein comprises SEQ ID NO: 6.
22. The method of any one of claims 14 to 21, wherein said media comprises serum-free insect cell media.
23. The method of any one of claims 16 to 22, further comprising the steps of:
- i) cloning said amplified open reading frame 2 into a first vector;
 - ii) excising said open reading frame 2 from said first vector; and
 - iii) using said excised open reading frame 2 for cloning into said transfer vector.
24. The method of any one of claims 14 to 23, wherein said cells comprise SF+ cells.

250

25. The method of any one of claims 14 to 24, wherein said virus comprises basculovirus.

26. The method of any one of claims 14 to 25, wherein said transfected construct comprises SEQ ID NO: 4.

27. The method of any one of claims 14 to 26, wherein said open reading frame 2 protein is recovered at least 5 days after infecting said cells with said virus.

28. The method of any one of claims 14 to 27, wherein said recovery step further comprises the step of separating said media from said cells and cell debris.

29. The method of claim 28, wherein said separating step includes the step of filtering said cells, cell debris, and growth media through a filter having pores ranging in size from about 0.45 μm to about 1.0 μm .

30. The method of any one of claims 14 to 29, wherein said method further includes the step of inactivating said virus prior to combining said recovered protein with a suitable adjuvant.

31. A method of recovering the protein expressed by open reading frame 2 from PCV2, wherein said method includes the steps

- i) infecting cells in growth media with a recombinant viral vector containing said open reading frame 2;

251

- ii) causing said vector to express said protein for at least 5 days; and
- iii) recovering said expressed protein in the supernate.

32. The method of claim 31, wherein said recovering occurs at least 5 days after infection of the cells with said viral vector.

33. A composition of matter obtained by the method of any one of claims 1 to 32.

34. The use of the composition of claim 33 as a medicament.

35. The use of the composition of claim 33 for the preparation of a medicament for the prevention of a PCV2 infection.

36. A method for producing a diagnostic kit for the detection of a PCV2 infection in a sample which comprises

- i) producing a recombinant protein as recited in any one of claims 1 to 30; and
- ii) packaging said recombinant protein into a suitable container.

37. The method of claim 36, further comprising the step of including an instruction manual with the container that packages the recombinant protein.

38. An immunogenic composition effective for lessening the severity of clinical symptoms associated with PCV2 infection comprising PCV2 ORF2 protein, or an

252

immunogenic portion thereof, wherein said immunogenic portion has at least 10 contiguous amino acids from PCV2 ORF2 protein.

39. The immunogenic composition of claim 38, wherein said PCV2 ORF2 protein is

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

253

40. The immunogenic composition of claims 38 or 39, wherein said composition further comprises an inactivated viral vector and cell culture supernate.

41. The immunogenic composition of claim 40, wherein said inactivated viral vector is a recombinant baculovirus coding for the PCV2 ORF2 protein.

42. The immunogenic composition of claim 40 or 41, wherein said composition comprises BEI.

43. The immunogenic composition of claim 42, wherein said composition comprises sodium thiosulfate.

44. The immunogenic composition of any one of claims 39 to 43, wherein said composition comprises an additional ingredient selected from the group consisting of carriers, adjuvants, media, viral inactivators, diluents, isotonic agents, immunomodulatory agents, antibiotics, and combinations thereof.

45. The immunogenic composition of claim 44, wherein said composition comprises an adjuvant, preferably carbopol.

46. The immunogenic composition of claim 45, wherein said composition comprises a pharmaceutical acceptable salt, preferably saline.

47. The immunogenic composition of any one of claims 38 to 46, wherein said composition comprises at least 0.2 mcg/ml PCV2 ORF2 protein.

254

PCT/US2005/047596 14.12.2006

12/14/2006, 17:12

8168800667

ERICKSON & KLEYPAS

PAGE 12/21

IPEA/US

48. The immunogenic composition of any one of claims 38 to 46, wherein said composition comprises at least 2 µg PCV2 ORF2 protein.

49. A container comprising at least one dose of the immunogenic composition of any one of claims 38 to 47, wherein one dose comprises at least 2 µg PCV2 ORF2 protein.

50. A container comprising 10 to 250 doses of the immunogenic composition of any one of claims 38 to 47, wherein one dose comprises at least 2 µg PCV2 ORF2 protein.

51. The container of claims 49 or 50, wherein said container further comprises an anti-microbiological active agent.

52. A kit comprising a container of any one of claims 49 to 51 and an instruction manual, including the information for the intramuscular application of at least one dose of the immunogenic composition into piglets to lessening the severity of clinical symptoms associated with PCV2 infection.

53. The kit of claim 52, wherein the instruction manual comprises the information of a second or further administration(s) of at least one dose of the immunogenic composition, wherein the second administration or any further administration is at least 14 days beyond the last administration.

255

54. A method of recovering recombinant protein expressed by open reading frame 2 of PCV2 comprising the steps of:

- A) cloning said recombinant open reading frame 2 from PCV2 into a transfer vector;
- B) transfecting the portion of said transfer vector containing said recombinant open reading frame 2 into a virus;
- C) infecting cells in media with said virus;
- D) causing said virus to express the protein from said open reading frame 2 for at least 5 days;
- E) separating cells from said vector from the supernate; and
- F) recovering said expressed open reading frame 2 protein in said supernate.

55. A method of preparing a composition for invoking an immune response against PCV2, said method comprising the steps of:

- i) transfecting a construct into a virus, said construct comprising recombinant DNA from open reading frame 2 of PCV2;
- ii) infecting cells with said transfected virus, said cells being in a growth media;
- iii) causing said virus to express the recombinant protein from said open reading frame 2 for at least 5 days;
- iv) recovering said expressed open reading frame 2 protein in the supernate; and

258

PCT/US2005/047596 14.12.2006

12/14/2006. 17:12

8168800667

ERICKSON & KLEYPAS

IPEA/US

PAGE 14/21

- v) combining said recovered protein with a suitable adjuvant or other pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS
PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

259
218**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.

268
279

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.

263
262

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
5 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.

10 22. El método de una cual quiera 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:

15

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;

20

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
25 dichas células comprende células SF+.

261
263

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.
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.
- 10 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 0.45μM a aproximadamente 1.0μM.
- 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:

268
264

i. infectar las células en medio de crecimiento con un vector vírico recombinante que contiene dicho 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

266
265

- 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,

5 v) un polipéptido que se codifica por un ADN que comprende la
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),

10 vii) cualquier porción inmunogénica de los polipéptidos codificados por
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.

25

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.

269
268

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 2µg 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 µg 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 ultima 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 dicha estructura de lectura abierto recombinante 2 del PCV2 dentro de un vector de transferencia;
- 5 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;
- 10 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
- 15 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:
- 20 i) transfectar una construcción dentro de un virus, dicha construcción comprende ADN recombinante de estructura de lectura abierto 2 de PCV2;
- 25 ii) infectar las células con dicho virus transfectado, dichas células están en un medio de crecimiento;

27
270

iii) originar que dicho virus exprese la proteína recombinante de dicho estructura de lectura abierto 2 durante al menos 5 días;

5

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.

10

223
272

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 55,369
FECHA : JULIO 9 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-077615- -00000-0000

Fecha: 2007-07-30 16:47:16 Dep: 2020 NUECREACION
Lib: 11 PATENTE/III Eje: 379 FASLNACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 273

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55767480	09/07/2007	43,215,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06	REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	
		13 NOMBRES Y ENSENAS COMERCIALES, MAR	243,000.00
		TOTAL :	\$ 243,000.00

SON: DOSCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Apl 15149-841-0006-8.

NIT : 800176089-2

SUPLEN EN UNO DE CLINDUS, RAY Y COMPLETO
 No. 07-077615-00000-0000
 Fecha 2007-07-30 16:47:10
 PATENTILYI
 ACT 411 PRESENTACION
 2007-07-30 16:47:10
 L. 10.000 PASIONACIONAL
 2007-07-30

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ARCADIOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55767480	09/07/2007	43,215,000.00

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06	REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	
		13 NOMBRES Y ENSENAS COMERCIALES, MAR	243,000.00
		TOTAL :	\$ 243,000.00

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 15149-841-006-8



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



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M. Navea
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia