



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0519783-0 B1

(22) Data do Depósito: 29/12/2005

(45) Data de Concessão: 03/01/2017



(54) **Título:** PROCESSO PARA RECUPERAR UMA PROTEÍNA EXPRESSA PELO QUADRO ABERTO DE LEITURA 2 DE PCV2, PARA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA INVOCAR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA PCV2, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO REFERIDO MATERIAL E USO DA MESMA, BEM COMO RECIPIENTES COMPREENDENDO AS REFERIDAS COMPOSIÇÕES, PROCESSO PARA PRODUZIR UM KIT E O REFERIDO KIT

(51) **Int.Cl.:** C12Q 1/68

(30) **Prioridade Unionista:** 13/01/2005 US 11/034,797, 29/12/2005 US 11/319,975, 30/12/2004 US 60/640,510

(73) **Titular(es):** BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

(72) **Inventor(es):** GREG NITZEL; MERRILL SCHAEFFER; MARC A. EICHMEYER

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA RECUPERAR UMA PROTEÍNA EXPRESSA PELO QUADRO ABERTO DE LEITURA 2 DE PCV2, PARA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA INVOCAR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA PCV2, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO REFERIDO MATERIAL E USO DA MESMA, BEM COMO RECIPIENTES COMPREENDENDO AS REFERIDAS COMPOSIÇÕES, PROCESSO PARA PRODUZIR UM KIT E O REFERIDO KIT"**.

Pedidos de Patente Relacionados

[001] Este pedido de patente reivindica o benefício do pedido provisório número 60/640.510, depositado em 30 de dezembro de 2004, e pedido de patente número 11/034.737, depositado em 13 de janeiro de 2005, os ensinamentos e conteúdos destes são aqui incorporados por referência.

Listagem de Sequência

[002] Este pedido de patente contém uma listagem de sequência em formato de papel e em formato legível por computador, os ensinamentos e conteúdo desta são aqui incorporados por referência.

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

[003] Um aspecto da presente invenção diz respeito ao restabelecimento de uma proteína expressa pelo quadro aberto de leitura 2 (ORF2) do circovírus porcino tipo 2 (PCV2). Mais particularmente, a proteína é uma proteína recombinante expressa por um vírus transfectado contendo sequências de codificação recombinantes para o circovírus porcino tipo 2, quadro aberto de leitura 2. Ainda mais particularmente, o vírus transfectado é permitido infectar células em meios de crescimento e a proteína expressa pelo quadro aberto de leitura 2 é restabelecida no sobrenadante, ao invés de dentro das células. Até mesmo mais particularmente, o método envolve as etapas de amplifi-

car o gene do quadro aberto de leitura 2 do circovírus porcino tipo 2, clonando esta porção amplificada em um primeiro vetor, excisando a porção de quadro aberto de leitura 2 deste primeiro vetor e clonando-a em um vetor de transferência, co-transfectando o vetor de transferência com um vetor viral em células nos meios de crescimento, levando as células a ser infectadas pelo vetor viral e assim expressar o quadro aberto de leitura 2 e restabelecendo a proteína recombinante expressa codificada para o quadro aberto de leitura 2 no sobrenadante.

[004] Em outro aspecto, trata-se a presente invenção de uma composição imunogênica eficaz para induzir uma resposta imune contra PCV2 e métodos para produzir aquelas composições imunogênicas. Mais particularmente, trata-se a presente invenção de uma composição imunológica eficaz para fornecer uma resposta imune que protege um animal de receber a composição e reduz, ou diminui a severidade, dos sintomas clínicos associados à infecção de PCV2. Ainda mais particularmente, a presente invenção está relacionada a uma composição imunológica com base em proteína que confere proteção eficaz contra infecção por PCV2. Até mesmo mais particularmente, a presente invenção está relacionada a uma composição imunológica compreendendo ORF2 de PCV2, em que a administração de PCV2-ORF2 resulta em proteção contra infecção por PCV2. O mais particularmente, trata-se a presente invenção de uma composição imunológica eficaz para conferir imunidade eficaz a um suíno recebendo a composição imunológica, e em que a composição compreende a proteína expressa por ORF2 de PCV2.

Descrição da Técnica Anterior

[005] Tipo de circovírus porcino 2 (PCV2) é um vírus de DNA pequeno (17 -22 nm em diâmetro), icosaédrico, não-envelopado contendo um genoma circular unifilamentar. PCV2 compartilha aproximadamente 80 % de identidade de sequência com o circovírus porcino tipo

1 (PCV1). Porém, em contraste com PCV1 que é em geral não-virulento, suínos infectados com PCV2 exibem uma síndrome comumente referida como Síndrome de Definhamento Multissistêmico Pós-Desmame (PMWS). PMWS é caracterizada clinicamente por definhamento, palidez da pele, debilidade, angústia respiratória, diarreia, icterícia e amarelamento. Em alguns suínos afetados, uma combinação de todos os sintomas será evidente enquanto outros suínos terão apenas um ou dois destes sintomas. Durante necropsia, lesões microscópicas e macroscópicas também aparecem em múltiplos tecidos e órgãos, com órgãos linfóides sendo o sítio mais comum para lesões. Uma correlação forte foi observada entre a quantidade de ácido nucléico de PCV2 ou antígeno e a severidade de lesões linfóides microscópicas. Taxas de mortalidade para suínos infectados com PCV2 podem chegar a 80 %. Além de PMWS, PCV2 foi associado a várias outras infecções incluindo pseudo-raivas, síndrome reprodutora e respiratória porcina (PRRS), doença de Glasser, meningite estreptocócica, salmonelose, colibacilose pós-desmame, hepatose dietética e broncopneumonia supurativa.

[006] Proteína de quadro aberto de leitura 2 (ORF2) de PCV2, tendo um peso molecular aproximado de 30 kDa quando passada em gel de SDS-PAGE, foi utilizada no passado como um componente antígeno em vacinas para PCV2. Métodos típicos de obter ORF2 para uso em tais vacinas em geral consistem em amplificar o DNA de PCV2 que codifica para ORF2, transfectar um vetor viral com o DNA de ORF2, infectar as células com o vetor viral contendo o DNA de ORF2, permitir o vírus expressar proteína de ORF2 dentro da célula e extrair a proteína de ORF2 da célula por meio de lise de célula. Estes procedimentos em geral tomam até cerca de quatro dias após infecção das células pelo vetor viral. Porém, estes procedimentos têm uma desvantagem em que os procedimentos de extração são caros e demorados.

Adicionalmente, a quantidade de ORF2 restabelecida das células não é muito alta; por conseguinte, um número grande de células necessita ser infectado por um número grande de vetores virais para obter quantidades suficientes da proteína expressa recombinante para o uso em vacinas e outros.

[007] Métodos atuais para imunização de PCV2 incluem vacinas com base em DNA, como aquelas descritas na Patente U. S. Nº 6.703.023. Porém, tais vacinas foram ineficazes para conferir imunidade protetora contra infecção de PCV2 e os sinais clínicos associados a ela.

[008] Consequentemente, o que é necessário na técnica é um método de obter proteína de ORF2, que não requer extração da proteína de ORF2 de dentro das células infectadas. O que é também necessário são métodos de obter proteína de ORF2 recombinante em quantidades suficientes para preparar as composições de vacina eficazmente. O que ainda é necessário também são métodos para obter proteína de ORF2 que não requer os métodos complicados e intensivos de mão-de-obra requeridos pelos protocolos de extração de proteína de ORF2 atuais. Por fim, com respeito às composições, o que é necessário na técnica é uma composição imunogênica que confere imunidade protetora contra infecção de PCV2 e diminui a severidade ou impede os sinais clínicos associados a ela.

Sumário da Invenção

[009] A presente invenção supera os problemas inerentes na técnica anterior e fornece um avanço eminente no estado da técnica. Especificamente, um aspecto da presente invenção fornece métodos melhorados de produzir e/ou restabelecer proteína de ORF2 de PCV2 recombinante, i) permitindo infecção de células suscetíveis em cultura com um vetor viral recombinante contendo sequências de codificação de DNA de ORF2 de PCV2, em que a proteína de ORF2 é expressada

pelo vetor viral recombinante, e ii) depois disso restabelecer a ORF2 no sobrenadante. Foi inesperadamente descoberto que ORF2 é liberado no sobrenadante em quantidades grandes se a infecção e incubação subsequente das células infectadas for permitidas progredir além do processo de restabelecimento de ORF2 de PCV 2 anterior típico, que extrai a ORF2 de PCV2 de dentro das células. Além disso, foi surpreendentemente descoberto que proteína de ORF2 de PCV é robusta contra degradação prototípica fora das células de produção. Ambos achados juntos permitem um restabelecimento de quantidades altas de proteína de ORF2 de PCV2 do sobrenadante de culturas de célula infectadas com vetores virais recombinantes contendo um DNA de ORF2 de PCV2 e expressando a proteína de ORF2 de PCV2. Quantidades altas de proteína de ORF2 de PCV2 significa mais que cerca de 20 µg/mL de sobrenadante, preferivelmente mais que cerca de 25 µg/mL, até mesmo mais preferido mais que cerca de 30 µg/mL, até mesmo mais preferido mais que cerca de 40 µg/mL, até mesmo mais preferido mais que cerca de 50 µg/mL, até mesmo mais preferido mais que cerca de 60 µg/mL, até mesmo mais preferido mais que cerca de 80 µg/mL, até mesmo mais preferido mais que cerca de 100 µg/mL, até mesmo mais preferido que cerca de 150 µg/mL, mais preferido que cerca de 190 µg/mL. Aquelas taxas de expressão podem também ser alcançadas por exemplo pelos métodos como descritos nos Exemplos 1 a 3.

[0010] Culturas de célula preferidas têm uma contagem de célula entre cerca de $0,3 - 2,0 \times 10^6$ células/mL, mais preferivelmente de cerca de $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, ainda mais preferivelmente de cerca de $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, até mesmo mais preferivelmente de cerca de $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL e o mais preferivelmente de cerca de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. Células preferidas são determináveis por aqueles versados na técnica. Células preferidas são aquelas suscetíveis

veis à infecção com um vetor viral recombinante apropriado, contendo um DNA de ORF2 de PCV2 e expressando proteína de ORF2 de PCV2. Preferivelmente as células são células de inseto, e mais preferivelmente, elas incluem as células de inseto vendidas sob a marca registrada células de inseto Sf⁺ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT).

[0011] Meios de crescimento apropriados também serão determináveis por aqueles versados na técnica com um meio de crescimento preferido sendo meio de célula de inseto livre de soro como Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) e outros. Vetores virais preferidos incluem baculovírus como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), em particular se as células de produção forem células de inseto. Embora o sistema de expressão de baculovírus seja preferido, é entendido por aqueles versados na técnica que outros sistemas de expressão trabalharão para propósitos da presente invenção, a saber a expressão de ORF2 de PCV2 no sobrenadante de uma cultura de célula. Tais outros sistemas de expressão podem requerer o uso de uma sequência sinal para causar expressão de ORF2 nos meios. Foi surpreendentemente descoberto que quando ORF2 for produzida por um sistema de expressão de baculovírus, não requer qualquer sequência sinal ou outra modificação para causar expressão de ORF2 nos meios. É acreditado que esta proteína possa independentemente formar partículas semelhantes a vírus (Journal of General Virology Vol. 81, págs. 2281-2287 (2000) e ser segregada no sobrenadante de cultura. O vetor viral recombinante contendo as sequências de DNA de ORF2 de PCV2 tem uma multiplicidade preferida de infecção (MOI) de entre cerca de 0,03 - 1,5, mais preferivelmente de cerca de 0,05 - 1,3, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,09 - 1,1 e o mais preferivelmente de cerca de 0,1 - 1,0, quando usado para a infecção das células suscetíveis. Preferivelmente as MOIs mencionadas acima dizem res-

peito a um ml de fluido de cultura de célula. Preferivelmente, o método descrito aqui compreende a infecção de $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, ainda mais preferivelmente de cerca de $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, até mesmo mais preferivelmente de cerca de $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL e o mais preferivelmente de cerca de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL com um vetor viral recombinante contendo um DNA de ORF2 de PCV2 e expressando proteína de ORF tendo uma MOI (multiplicidade de infecção) para o PCV2 de entre cerca de 0,03 - 1,5, mais preferivelmente de cerca de 0,05 - 1,3, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,09 - 1,1 e o mais preferivelmente de cerca de 0,1 - 1,0.

[0012] As células infetadas são depois incubadas em um período de até dez dias, mais preferivelmente de cerca de dois dias a cerca de dez dias, ainda mais preferivelmente de cerca de quatro dias a cerca de nove dias e o mais preferivelmente de cerca de cinco dias a cerca de oito dias. Condições de incubação preferidas incluem uma temperatura entre cerca de 22 - 32°C, mais preferivelmente de cerca de 24 - 30° C, ainda mais preferivelmente de cerca de 25 - 29°C, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 26 - 28° C e o mais preferivelmente cerca de 27° C. Preferivelmente, as células de Sf+ são observadas seguindo inoculação para alterações características induzidas por baculovírus. Tal observação pode incluir monitorar tendências de densidade de célula e a diminuição na viabilidade durante o período de pós-infecção. Foi descoberto que a titulação viral de pico é observada 3-5 dias após infecção e liberação de ORF2 de pico das células no sobrenadante é obtida entre os dias 5 e 8, e/ou quando a viabilidade da célula diminui para menos que 10 %.

[0013] Desse modo, um aspecto da presente invenção fornece um método melhorado de produzir e/ou restabelecer proteína de ORF2 de PCV2 recombinante, preferivelmente em quantidades descritas acima, i) permitindo infecção de várias células suscetíveis (vide acima) em

cultura com um vetor viral recombinante com uma MOI como definida acima, ii) expressando a proteína de ORF2 de PCV2 pelo vetor viral recombinante, e iii) depois disso restabelecimento da ORF2 de PCV2 no sobrenadante das células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou viabilidade da célula diminui para menos de 10 %. Preferivelmente, o vetor viral recombinante é um baculovírus recombinante contendo sequências de codificação de DNA de ORF2 de PCV2 e as células são células de Sf+. Adicionalmente, é preferido que a cultura seja examinada periodicamente para evidência macroscópica e microscópica de contaminação ou para alterações atípicas na morfologia das células durante o período de pós-infecção. Qualquer cultura que exibe alguma contaminação deveria ser descartada. Preferivelmente, a proteína recombinante de ORF2 expressa é segregada pelas células nos meios de crescimento circunvizinhos que mantêm a viabilidade das células. O ORF2 é depois é restabelecido no sobrenadante que circunda as células ao invés das células em si.

[0014] O processo de restabelecimento preferivelmente começa com a separação dos restos de célula da ORF2 expressa em meios por meio de uma etapa de separação. Etapas de separação preferidas incluem filtração, centrifugação em velocidades até cerca de 20.000xg, centrifugação de fluxo contínuo, separação cromatográfica usando permuta de íons ou filtração em gel, e métodos de imunoafinidade convencionais. Aqueles métodos são conhecidos às pessoas versadas na técnica, por exemplo por (Harris e Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL press Oxford 1995). Os métodos de separação mais preferidos incluem centrifugação em velocidades até cerca de 20.000xg e filtração. Métodos de filtração preferidos incluem microfiltração convencional e filtração de fluxo tangencial (ou fluxo transversal) incluindo microfiltração convencional de filtração de fibra oca. Destes, microfiltração convencional é preferido. Tamanhos

de poro preferidos para microfiltração convencional são entre cerca de 0,30 - 1,35 μm , mais preferivelmente entre cerca de 0,35 - 1,25 μm , ainda mais preferivelmente entre cerca de 0,40 - 1,10 μm e o mais preferivelmente entre cerca de 0,45 - 1,0 μm . É acreditado que qualquer membrana de filtração convencional trabalhará para propósitos da presente invenção e membranas de polietersulfona são preferidas. Qualquer espécie de ácido nucléico de peso baixo é removida durante a etapa de filtração.

[0015] Desse modo, um outro aspecto da presente invenção fornece um método melhorado de produzir e/ou é restabelecer proteína de ORF2 de PCV2 recombinante, preferivelmente em quantidades descritas acima, i) permitindo infecção de várias células suscetíveis (vide acima) em cultura com um vetor viral recombinante com uma MOI como definida acima, ii) expressando a proteína de ORF2 de PCV pelo vetor viral recombinante, iii) restabelecimento da ORF2 de PCV2 no sobrenadante das células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou viabilidade das células diminui para menos de 10 %, e, iv) separando restos de célula da ORF2 de PCV2 expressa por meio de uma etapa de separação. Preferivelmente, o vetor viral recombinante é um baculovírus contendo sequências de codificação de DNA de ORF2 e as células são células de SF+. Etapas de separação preferidas são aquelas descritas acima. A mais preferida é uma microfiltração convencional usando uma membrana tendo um tamanho de poro entre cerca de 0,30 - 1,35 μm , mais preferivelmente entre cerca de 0,35 - 1,25 μm , ainda mais preferivelmente entre cerca de 0,40 - 1,10 μm e o mais preferivelmente entre cerca de 0,45 - 1,0 μm .

[0016] Para restabelecimento de ORF2 de PCV2 que será usado em uma composição imunogênica ou imunológica como uma vacina, a inclusão de uma etapa de inativação é preferida para inativar o vetor viral. Uma "composição imunogênica ou imunológica" refere-se a uma

composição de substância compreendendo pelo menos um antígeno que suscita uma resposta imunológica no hospedeiro de uma resposta imune celular e / ou mediada por anticorpo para a composição ou vacina de interesse. Usualmente, uma "resposta imunológica" inclui mas não é limitada a um ou mais dos efeitos a seguir: a produção ou ativação de anticorpos, células B, células auxiliares T, células T supressoras e/ou células T citotóxicas e/ou células T yd, especificamente direcionados a um antígeno ou antígenos incluídos na composição ou vacina de interesse. Preferivelmente, o hospedeiro exibirá uma resposta imunológica terapêutica ou protetora de modo que a resistência à infecção nova será intensificada e/ou a severidade clínica da doença reduzida. Tal proteção normalmente será demonstrada por uma redução ou carência de sintomas exibidos por um hospedeiro infectado, um tempo de restabelecimento mais rápido e/ou uma titulação viral diminuída no hospedeiro infectado. Desse modo, a presente invenção também diz respeito ao método de produzir e/ou restabelecer proteína de ORF2 de PCV2 recombinante, preferivelmente em quantidades descritas acima, i) permitindo infecção de várias células suscetíveis (vide acima) em cultura com um vetor viral recombinante com uma MOI como definida acima, ii) expressando a proteína de ORF2 de PCV pelo vetor viral recombinante, iii) restabelecimento da ORF2 de PCV2 no sobrenadante das células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou viabilidade das células diminui para menos de 10 %, iv) separando restos de célula da ORF2 de PCV2 expressa por meio de uma etapa de separação, e v) inativando o vetor viral recombinante.

[0017] Preferivelmente, esta inativação é feita logo antes ou logo após a etapa de filtração, com após a etapa de filtração sendo o tempo preferido para inativação. Qualquer método de inativação convencional pode ser usado para propósitos da presente invenção. Desse modo, inativação pode ser executada por tratamentos químicos e/ou físicos.

Em formas preferidas, o volume de fluidos de coleta é determinado e a temperatura é trazida para entre cerca de 32 - 42° C, mais preferivelmente entre cerca de 34 - 40° C e o mais preferivelmente entre cerca de 35 - 39° C. Métodos de inativação preferidos incluem a adição de etilenonimina binária ciclizada (BEI), preferivelmente em uma concentração de cerca de 1 a cerca de 20 mM, preferivelmente de cerca de 2 a cerca de 10 mM, ainda mais preferivelmente de cerca de 2 a cerca de 8 mM, ainda mais preferivelmente de cerca de 3 a cerca de 7 mM, o mais preferivelmente de cerca de 5 mM. Por exemplo a inativação inclui a adição de uma solução de hidrobrometo de 2-bromoetilenoamina, preferivelmente de cerca de 0,4 M, que foi ciclizado a 0,2 M de etilenoimina binária (BEI) em 0,3 N de NaOH, para os fluidos darem uma concentração final de cerca de 5 mM de BEI. Preferivelmente, os fluidos são depois agitados continuamente por 72 - 96 horas e os fluidos inativados da coleta congelados a -40° C ou abaixo ou entre cerca de 1 - 7° C. Após inativação ser concluída, uma solução de tiosulfato de sódio, preferivelmente a 1,0 M é adicionada para neutralizar qualquer BEI residual. Preferivelmente, o tiosulfato de sódio é adicionado em quantidade equivalente como comparado ao BEI adicionado antes da inativação. Por exemplo, no evento BEI ser adicionado a uma concentração final de 5 mM, uma solução a 1,0 M de tiosulfato de sódio é adicionada para dar uma concentração mínima final de 5 mM para neutralizar qualquer BEI residual.

[0018] Desse modo, um outro aspecto da presente invenção diz respeito a um método de produzir proteína de ORF2 de PCV2 recombinante, preferivelmente em quantidades descritas acima, i) permitindo infecção de várias células suscetíveis (vide acima) em cultura com um vetor viral recombinante com uma MOI como definida acima, ii) expressando a proteína de ORF2 de PCV pelo vetor viral recombinante, iii) restabelecimento da ORF2 de PCV2 no sobrenadante das células

obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou viabilidade das células diminui para menos de 10 %, iv) separando restos de célula da ORF2 de PCV2 expressa por meio de uma etapa de separação, e v) inativando o vetor viral recombinante. Preferivelmente, o vetor viral recombinante é um baculovírus contendo sequências de codificação de DNA de ORF2 e as células são células de SF+. Etapas de separação preferidas são aquelas descritas acima, mais preferida é a etapa de filtração. Etapas de inativação preferidas são aquelas descritas acima. Preferivelmente, inativação é executada entre cerca de 35 - 39° C e na presença de 2 a 8 mM de BEI, ainda mais preferido na presença de cerca de 5 mM de BEI. Foi surpreendentemente descoberto que concentrações mais altas de BEI afetam a proteína de ORF2 de PCV2 negativamente.

[0019] De acordo com um outro aspecto da presente invenção, o método descrito acima também inclui uma etapa de neutralização após a etapa v). Esta etapa vi) compreende adicionar uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inativação dentro da solução. Preferivelmente, se o agente de inativação for BEI, adição de tiosulfato de sódio a uma quantidade equivalente é preferida. Desse modo, de acordo com um outro aspecto, etapa vi) compreende adicionar uma solução de tiosulfato de sódio a uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM, preferivelmente de cerca de 2 a cerca de 10 mM, ainda mais preferivelmente de cerca de 2 a cerca de 8 mM, ainda mais preferivelmente de cerca de 3 a cerca de 7 mM, o mais preferivelmente de cerca de 5 mM, quando o agente de inativação for BEI.

[0020] Em formas preferidas e especialmente em formas que usam a proteína de ORF2 de PCV2 recombinante em uma composição imunogênica como uma vacina, cada lote de ORF2 colhido será testado para inativação através de passagem nas células de Sf+ suscetíveis.

veis de baculovírus dependentes de ancoradouro. Em uma forma preferida deste teste, 150 cm² de monocamada de cultura de célula apropriada é inoculada com 1,0 mL de fluidos de PCV2 inativados e mantidas a 25 - 29° C durante 14 dias com pelo menos duas passagens. Ao término do período de manutenção, as monocamadas de célula são examinadas para efeitos citopatogênicos (CPE) típicos de baculovírus de ORF2 de PCV2. Preferivelmente, controles de vírus positivos são também usados. Tais controles podem consistir em uma cultura de células de Sf+ inoculada com um baculovírus de ORF2 de PCV2 não-inativado de referência e um frasco de células de Sf+ que permanecem inoculadas. Após incubação e passagem, a ausência de células infectadas pelo vírus nos fluidos virais tratados com BEI constituiria um teste de inativação satisfatório. As células de controle inoculadas com o vírus de referência deveriam exibir CPE típico de baculovírus de ORF2 de PCV2 e o frasco inoculado não deveria exibir qualquer evidência de CPE de baculovírus de ORF2 de PCV2. Alternativamente, ao término do período de manutenção, as amostras de sobrenadante poderiam ser colhidas e inoculadas sobre uma placa de Sf+ de 96 cavidades que foi carregada com células de Sf+ e depois mantida a 25 - 29° C por 5 - 6 dias. A placa é depois fixada e tingida com anticorpo de ORF2 de anti-PCV2 conjugado com FITC. A ausência de CPE e expressão de ORF2, como detectada por microscopia de IFA, nos fluidos virais tratados de BEI constitui um teste de inativação satisfatório. As células de controle inoculadas com o vírus de referência deveriam apresentar CPE e atividade de IFA e o frasco inoculado não deveria exibir qualquer evidência de CPE de baculovírus de ORF2 de PCV2 e não deveria conter nenhuma atividade de IFA.

[0021] Desse modo um outro aspecto da presente invenção diz respeito a um teste de inativação para determinar a eficácia da inativação da recombinação vetor viral, compreende as etapas: i) contatar

pelo menos uma porção do fluido de cultura contendo o vetor viral recombinante com um agente de inativação, preferivelmente como descrito acima, ii) adicionar um agente de neutralização para neutralizar o agente de inativação, preferivelmente como descrito acima, e iii) determinar a infecciosidade residual pelos ensaios como descritos acima.

[0022] Após inativação, a quantidade relativa de proteína de ORF2 de PCV2 recombinante em uma amostra pode ser determinada de vários modos. Métodos preferidos de quantificação incluem densitometria de SDS-PAGE, ELISA e estudos de vacinação em animais que correlatam quantidades conhecidas de vacina com resultados clínicos (sorologia, etc.). Quando SDS-PAGE for utilizada para quantificação, o material de amostra contendo uma quantidade desconhecida de proteína de ORF2 de PCV2 recombinante é passado em um gel, junto com amostras contendo quantidades conhecidas diferentes de proteína de ORF2 de PCV2 recombinante. Uma curva padrão pode depois ser produzida com base nas amostras conhecidas e a quantidade de ORF2 de PCV2 recombinante na amostra desconhecida pode ser determinada através de comparação com esta curva padrão. Porque ELISAs são em geral reconhecidos como o padrão da indústria para quantificação de antígeno, eles são preferidos para quantificação.

[0023] Desse modo, de acordo com um outro aspecto, a presente invenção também diz respeito a um ELISA para a quantificação de proteína de ORF2 de PCV2 recombinante. Um ELISA preferido como fornecido aqui em geral começará com diluição do anticorpo de captura 1:6000 ou uma diluição de funcionamento apropriada em tampão de revestimento. Um anticorpo de captura preferido é Prot. G purificada de PAb de anti-PCV2 de suíno, e um tampão de revestimento preferido é tampão de Carbonato a 0,05 M, que pode ser feito combinando 2,93 g de NaHCO_3 (Sigma Cat. Nº S-6014, ou equivalente) e 1,59 g de NaCO_3 (Sigma Cat. Nº S-6139, ou equivalente). A mistura é combina-

da com água destilada, ou equivalente, para fazer um litro a um pH de $9,6 \pm 0,1$. Em seguida, o anticorpo de captura é diluído 1:6000, ou qualquer outra diluição de funcionamento apropriada, em tampão de revestimento. Por exemplo, para quatro placas, precisaria-se de 42 mL de tampão de revestimento e sete μ l de anticorpo de captura. Usando um método de pipetagem reversa, 100 μ l de anticorpo de captura diluído são adicionados a cada uma das cavidades. Para obter um revestimento uniforme, os lados de cada placa deveriam ser batidos suavemente. As placas são depois vedadas com aferidores de placa, antes de empilhar as placas e tampar a pilha com uma placa de 96 cavidades vazia. As placas são incubadas durante a noite (14-24 horas) a 35-39°C. Cada placa é depois lavada três vezes com tampão de lavagem usando a ultralavagem mais lavadora de placa de microtitulação ajustada a 250 μ L/lavagem com três lavagens e nenhum tempo de molho. Após a última lavagem, as placas deveriam ser batidas sobre uma toalha de papel. Novamente, usando a técnica de pipetagem reversa, 250 μ l de solução de bloqueio deveriam ser adicionados a cada uma das cavidades. As placas de teste deveriam ser vedadas e incubadas durante aproximadamente uma hora ($\pm$ cinco minutos) a 35-37° C. Preferivelmente, as placas não serão empilhadas após esta etapa. Durante a etapa de bloqueio, todas as amostras de teste deveriam ser arrancadas e descongeladas para temperatura ambiente. Em seguida, quatro placas de diluição separadas deveriam ser preparadas adicionando 200 μ l de solução de diluente a cada uma das cavidades restantes com exceção da fileira A e fileira H, colunas 1-3. Em seguida, seis tubos de teste deveriam ser marcados como segue, titulação baixa, titulação média, titulação alta, inativada/filtrada (1 :240), inativada/filtrada (1 :480), e controle interno. Nos tubos designados, uma diluição apropriada deveria ser preparada para as amostras de teste a seguir. As amostras de teste descongeladas deveriam ser submetidas

a vórtice antes do uso. Para quatro placas, as diluições a seguir serão feitas: A) a titulação baixa não será pré-diluída: 3,0 mL de titulação baixa; B) controle negativo a uma diluição de 1:30 (células de SF+): 3,77 mL de diluente + 130 µl do controle negativo; C) titulação média a uma diluição de 1:30 (8 µg/mL): 3,77 mL de diluente + 130 µl da titulação média; D) titulação alta a uma diluição de 1:90 (16 µg/mL): 2,967 mL de diluente + 33 µl de titulação alta; E) inativada / filtrada a uma diluição de 1:240: 2,39 mL de diluente + 10 µl de amostra inativada / filtrada; F) inativada / filtrada a uma diluição de 1:480: 1,0 ml de diluente + 1,0 ml de amostra intacta / filtrada (1:240) preparada de E acima; G) controle interno a diluição de 1:30: 3,77 mL de diluente + 130 µl do controle interno. Em seguida, adicionar 300 µl das amostras preparadas às cavidades vazias correspondentes nas placas de diluição às placas 1 a 4. O pipetador de multicanal é depois ajustado em 100 µl, e os conteúdos na Fileira A são misturados para cima e para baixo através de pipetação para pelo menos 5 vezes e depois 100 µl são transferidos para Fileira B usando a técnica de pipetação reversa. As pontas deveriam ser alteradas e este mesmo procedimento é seguido abaixo a placa para a Fileira G. As amostras nestas placas de diluição estão agora prontas para transferência para as placas de teste uma vez as placas de teste foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem usando a ultralavagem mais lavadora de placa de microtitulação (ajustes em 250 µL/lavagem, 3 lavagens, nenhum tempo de molho). Após a última lavagem, as placas deveriam ser batidas sobre uma toalha de papel. Em seguida, os conteúdos da placa de diluição são transferidos para a placa de teste usando um procedimento de transferência simples. Mais especificamente, iniciando a fileira H, 100 µL/cavidade são transferidos da(s) placa(s) de diluição para as cavidades correspondentes da(s) placa(s) de teste usando técnica de pipetação reversa. Após cada transferência, as pontas da pipeta deveriam ser alteradas.

Da Fileira G, 100 μ L/cavidade na(s) placa(s) de diluição são transferidos para cavidades correspondentes da(s) placa(s) de teste usando técnica de pipetação reversa. O mesmo conjunto de pontas da pipeta pode ser usado para a transferência restante. Para assegurar uma solução homogênea para a transferência, a solução deveria ser pipetada para cima e para baixo pelo menos 3 vezes antes da transferência. Em seguida, a(s) placa(s) de teste é(são) vedada(s) e incubada(s) por 1,0 hora $\pm$ 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Novamente, é preferível não empilhar as placas. As placas são depois lavadas 3 vezes com tampão de lavagem usando a ultralavagem mais lavadora de placa de microtitulação (ajuste em 250 μ L/lavagem, 3 lavagens e nenhum tempo de molho). Após a última lavagem, as placas são batidas sobre uma toalha de papel. Usando técnica de pipetação reversa, 100 μ l de anticorpo de detecção diluído 1:300, ou diluição de funcionamento apropriada, em solução de diluente são adicionados a cada uma das cavidades da(s) placa(s) de teste. Por exemplo, para quatro placas, precisaria-se de 42 mL de solução de diluente com 140 μ l de anticorpo de captura. A(s) placa(s) de teste é(são) depois vedada(s) e incubada(s) por 1,0 hora $\pm$ 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Novamente, as placas são lavadas 3 vezes com tampão de lavagem usando a ultralavagem mais lavadora de placa de microtitulação (ajuste em 250 μ L/lavagem, 3 lavagens e nenhum tempo de molho). Após a última lavagem, as placas são batidas sobre uma toalha de papel. Em seguida, o diluente conjugado é preparado adicionando 1 % de soro de coelho normal ao diluente. Por exemplo, para quatro placas, 420 μ l de soro de coelho normal são adicionados a 42 ml de diluente. O anticorpo conjugado é diluído a 1:10.000, ou qualquer outra diluição de funcionamento apropriada, em uma solução de diluente conjugado recentemente preparada em cada uma das cavidades da(s) placa(s) de teste. Usando uma técnica de pipetação reversa, 100 μ l deste anticorpo conjugado diluído são adicionados a ca-

da uma das cavidades. A(s) placa(s) de teste é(são) depois vedada(s) e incubada(s) por 45 ± 5 minutos a $37^\circ \text{C} \pm 2,0^\circ \text{C}$. Preferivelmente, as placas não são empilhadas. As placas são depois lavadas 3 vezes com tampão de lavagem usando a ultralavagem mais lavadora de placa de microtitulação (ajuste em $250 \mu\text{L}$ /lavagem, 3 lavagens e nenhum tempo de molho). Após a última lavagem, as placas são batidas sobre uma toalha de papel. A seguir, volumes iguais de Substrato de Peroxidase de TMB (Reagente A) com Solução de Peroxidase B (Reagente B) são imediatamente misturados antes do uso. A quantidade misturada variará, dependendo da quantidade de placas mas cada placa requererá $10 \text{ mL/placa} + 2 \text{ mL}$. Portanto, para 4 placas, serão 21 mL de Reagente A + 21 mL de Reagente B. Usando uma técnica de pipetagem reversa, $100 \mu\text{L}$ de substrato são adicionados a cada uma das cavidades da(s) placa(s) de teste. As placas são depois incubadas em temperatura ambiente durante $15 \text{ minutos} + 15 \text{ segundos}$. A reação é parada pela adição de $100 \mu\text{L}$ de 1 N de solução de HCl a cada uma das cavidades usando uma técnica de pipetagem reversa. A leitora de placa de ELISA é depois ligada e deixada prosseguir através de suas fases diagnósticas e de teste de uma maneira convencional.

[0024] Um outro aspecto da invenção diz respeito a um método para construir um vetor viral recombinante contendo o DNA de ORF2 de PCV2 e expressando proteína de ORF2 de PCV2 em quantidades altas, quando infectado em células suscetíveis. Foi surpreendentemente descoberto que o vetor viral recombinante como fornecido aqui expressa quantidades altas, como definidas acima, de ORF2 de PCV2 após infectar células suscetíveis. Portanto, a presente invenção também diz respeito a um método melhorado para produzir e/ou restabelecer proteína de ORF2 de PCV2, preferivelmente compreende a etapa: construir um vetor viral recombinante contendo o DNA de ORF2 de PCV2 e expressar a proteína de ORF2 de PCV2. Preferivelmente, o

vetor viral é um baculovírus recombinante. Detalhes do método para construir vetores virais recombinantes contendo DNA de ORF2 de PCV2 e expressando proteína de ORF2 de PCV2, como fornecida aqui, são descritos no seguinte: Em formas preferidas o vetor viral recombinante contendo DNA de ORF 2 de PCV2 e expressando a proteína de ORF2 de PCV2 usada para infectar as células é gerado transfectando um vetor de transferência que tinha um gene de ORF2 clonado nele em um vetor viral. Preferivelmente, apenas a porção do vetor de transferência é transfectado no vetor viral contendo o DNA de ORF2. O termo "transfectado em um vetor viral" significa, e é usado como um sinônimo para "introduzir" ou "clonar" um DNA heterólogo em um vetor viral, como por exemplo em um vetor de baculovírus. O vetor viral é preferivelmente mas não necessariamente um baculovírus.

[0025] Desse modo, de acordo com um outro aspecto da presente invenção, o vetor viral recombinante é gerado através de recombinação entre um vetor de transferência contendo o DNA de ORF2 de PCV2 heterólogo e um vetor viral, preferivelmente um baculovírus, até mesmo mais preferivelmente um baculovírus deficiente de replicação linearizado (como DNA de Baculo Gold). Um "vetor de transferência" significa uma molécula de DNA que inclui pelo menos uma origem de replicação, o gene heterólogo, no presente caso ORF2 de PCV2, e sequências de DNA que permitem a clonagem do referido gene heterólogo no vetor viral. Preferivelmente as sequências que permitem clonagem do gene heterólogo no vetor viral estão flanqueando o gene heterólogo. Até mesmo mais preferivelmente aquelas sequências de flanqueamento são pelo menos homólogas em partes às sequências do vetor viral. A homologia de sequência depois permite recombinação de ambas as moléculas, o vetor viral e o vetor de transferência para gerar um vetor viral recombinante contendo o gene heterólogo. Vetor de transferência preferido é o vetor de pVL1392 (BD Biosciences

Pharmingem) que é projetado para co-transfecção com o DNA de BáculoGold na linhagem celular de Sf+ preferida. Preferivelmente, o referido vetor de transferência compreende um DNA de ORF2 de PCV2. O construto co-transfectado é aproximadamente 10.387 pares de base em comprimento.

[0026] Em formas mais preferidas, os métodos da presente invenção começarão com o isolamento de DNA de ORF2 de PCV2. Em geral, este pode ser de uma cepa conhecida ou desconhecida como o DNA de ORF2 parece ser altamente conservado com pelo menos cerca de 95 % de identidade de sequência entre diferentes isolados. Qualquer gene de ORF2 de PCV2 conhecido na técnica pode ser usado para propósitos da presente invenção como cada um seria expresso no sobrenadante. O PCV DNA de ORF2 é preferivelmente amplificado usando métodos de PCR, até mesmo mais preferido junto com a introdução de uma sequência de consenso de Kozak de flanqueamento de 5' (CCGCCAUG) (SEQ ID NO 1) e/ou um sítio de EcoR1 de flanqueamento de 3' (GAATTC) (SEQ ID NO 2). Tal introdução de um consenso de Kozak de 5' preferivelmente remove o códon de partida de ocorrência natural AUG de ORF2 de PCV2. O sítio de EcoR1 de 3' é preferivelmente introduzido a jusante do códon de parada da ORF2 de PCV2. Mais preferivelmente ele é introduzido a jusante de uma sequência de terminação de transcrição de poli A, que em si está localizada a jusante do códon de parada de ORF2 de PCV2. Foi descoberto, que o uso de uma sequência de consenso de Kozak, em particular como descrito acima, aumenta o nível de expressão da proteína de ORF2 de PCV2 subsequente. O DNA de ORF2 de PCV2 amplificado, com estas sequências adicionais, é clonado em um vetor. Um vetor preferido para esta etapa de clonagem inicial é o Vetor pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). O DNA de ORF2 de PCV2 incluindo algumas sequências de vetor de pGEM (SEQ ID NO: 7) é preferivelmente exci-

sado do vetor no sítio de restrição de Not1. O DNA resultante é depois clonado no vetor de transferência.

[0027] Desse modo, em um aspecto da presente invenção, um método para construir um vetor viral recombinante contendo o DNA de ORF2 de PCV2 é fornecido. Este método compreende as etapas: i) clonar um ORF2 de PCV2 recombinante em um vetor de transferência; e ii) transfectar a porção do vetor de transferência contendo a ORF2 de PCV2 recombinante em um vetor viral, gerar o vetor viral recombinante. Preferivelmente, o vetor de transferência é aquele descrito acima ou é construído como descrito acima ou como exemplarmente mostrado na Figura 1. Desse modo de acordo com um outro aspecto, o vetor de transferência, usado para a construção do vetor viral recombinante como descrito aqui, contém a sequência da SEQ ID NO: 7.

[0028] De acordo com um outro aspecto, este método também compreende antes da etapa i) a etapa a seguir: amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências de flanqueamento do DNA de ORF2 de PCV2 são modificadas como descrito acima. Métodos *in vitro* para amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 e modificar as sequências de flanqueamento, clonar *in vitro* o DNA de ORF2 de PCV2 amplificado em um vetor de transferência e vetores de transferência adequados são descritos acima, exemplarmente mostrados na Figura 1, ou conhecidos a uma pessoa versada na técnica. Desse modo de acordo com um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um método para construir um vetor viral recombinante contendo o DNA de ORF2 de PCV2 e expressando proteína de ORF2 de PCV2, compreende as etapas de: i) amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências de flanqueamento do referido DNA de ORF2 de PCV2 são modificadas, ii) clonar o DNA de ORF2 de PCV2 amplificado em um vetor de transferência; e iii) transfectar o vetor de transferência ou uma porção deste contendo o DNA de ORF2 de

PCV2 recombinante em um vetor viral para gerar o vetor viral recombinante. Preferivelmente, a modificação das sequências de flaqueamento do DNA de ORF2 de PCV2 é executada como descrita acima, por exemplo introduzindo uma sequência de Kozak de 5' e / ou um sítio de EcoR1, preferivelmente como descrito acima.

[0029] De acordo com um outro aspecto, um método de produzir e/ou restabelecer proteína recombinante expressa pelo quadro aberto de leitura 2 de PCV2 é fornecida. O método em geral compreende as etapas de: i) clonar um ORF2 de PCV2 recombinante em um vetor de transferência; ii) transfectar a porção do vetor de transferência contendo a ORF2 de PCV2 recombinante em um vírus; iii) infectar as células em meios com o vírus transfectado; iv) fazer o vírus transfectado expressar a proteína recombinante de ORF2 de PCV2; v) separar as células do sobrenadante; e vi) restabelecer a proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante.

[0030] Métodos de como clonar um DNA de ORF2 de PCV2 recombinante em um vetor de transferência são descritos acima. Preferivelmente, o vetor de transferência contém a sequência da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7. Porém, o vetor de transferência pode conter qualquer DNA de ORF2 de PCV2, inalterado ou modificado, contanto que o DNA de ORF2 de PCV2, quando transfectado em um vetor viral recombinante, é expressado em cultura de célula. Preferivelmente, o vetor viral recombinante compreende a sequência da SEQ ID NO: 8. Além disso, métodos de como infectar células, preferivelmente como infectar células de inseto com um número definido de baculovírus recombinante contendo o DNA de ORF2 de PCV2 e expressar a proteína de ORF2 de PCV2 são descritos acima em detalhes. Além disso, etapas de separar as células do sobrenadante como também etapas para restabelecer a proteína de ORF2 de PCV2 expresso são também descritas acima em detalhes. Quaisquer destas etapas de

processo específicas, como descritas aqui, fazem parte do método de produzir e/ou restabelecer proteína recombinante expressa por quadro aberto de leitura 2 de PCV2 como descrito acima. Preferivelmente, as células são células de SF+. Ainda mais preferivelmente, culturas de célula têm uma contagem de célula entre cerca de $0,3 - 2,0 \times 10^6$ células/mL, mais preferivelmente de cerca de $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, ainda mais preferivelmente de cerca de $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, até mesmo mais preferivelmente de cerca de $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL e o mais preferivelmente de cerca de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. Preferivelmente, o vetor viral recombinante contendo o DNA de ORF2 de PCV2 tem uma multiplicidade preferida de infecção (MOI) de entre cerca de 0,03 - 1,5, mais preferivelmente de cerca de 0,05 - 1,3, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,09 - 1,1, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,1 - 1,0 e o mais preferivelmente a cerca de 0,5, quando usado para a infecção das células suscetíveis. Preferivelmente, restabelecimento da proteína de ORF2 de PCV2 no sobrenadante das células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou viabilidade das células diminui para menos de 10 %. Preferivelmente, para produzir proteína de ORF2 de PCV2, as células são cultivadas a 25 a 29° C. Preferivelmente, a etapa de separação é uma centrifugação ou uma etapa de filtração.

[0031] Opcionalmente, este método pode incluir a etapa de amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 de uma cepa de PCV2 antes de clonar o DNA de ORF2 de PCV2 no vetor de transferência, em formas preferidas, uma sequência de Kozak de 5', um sítio de EcoR1 de 3' e combinações destes podem também ser adicionados à sequência amplificada, preferivelmente antes ou durante a amplificação. A sequência de um Kozak de 5' preferido compreende SEQ ID NO: 1. Um sítio de EcoR1 de 3' preferido compreende SEQ ID NO: 2, DNA de ORF2 de PCV2 preferido compreende a sequência de nucleotídeo Acesso de

Genbank No. AF086834 (SEQ ID NO: 3) e SEQ ID NO: 4. A proteína de ORF2 de PCV2 recombinante preferida compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5, que é a proteína codificada pela SEQ ID NO: 3 (Acesso de Genbank No. AF086834) e SEQ ID NO: 6 que é a proteína codificada pela SEQ ID NO: 4. Um meio preferido compreende meios de célula de inseto livres de soro, ainda mais preferivelmente meio Excell 420. Quando a etapa de amplificação opcional for executada, é preferível primeiro clonar o quadro aberto de leitura amplificada 2 em um primeiro vetor, excisar o quadro aberto de leitura 2 do primeiro vetor e usar o quadro aberto de leitura excisado para clonar no vetor de transferência. Uma linhagem celular preferida para cotransfecção é a linhagem celular de SF+. Um vírus preferido para cotransfecção é baculovírus. Em formas preferidas deste método, a porção transfectada do vetor de transferência compreende SEQ ID NO: 8. Por fim, para este método, preferiu-se restabelecer a proteína de quadro aberto de leitura 2 (ORF2) de PCV2 no sobrenadante de cultura de célula pelo menos 5 dias após infetar as células com o vírus.

[0032] Desse modo, um outro aspecto da invenção diz respeito a um método para produzir e/ou restabelecer o quadro aberto de leitura 2 de PCV2, compreende as etapas: i) amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 *in vitro*, preferivelmente adicionar uma sequência de Kozak de 5' e/ou adicionar um sítio de restrição de EcoR1 de 3', H) clonar a ORF2 de PCV2 amplificada em um vetor de transferência; iii) transfectar a porção do vetor de transferência contendo a ORF2 de PCV2 recombinante em um vírus; iv) infetar as células em meios com o vírus transfectado; v) fazer o vírus transfectado expressar a proteína recombinante de ORF2 de PCV2; vi) separa as células do sobrenadante; e vii) restabelecer a proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante.

[0033] Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a um método para preparar uma composição compreendendo proteína de

ORF2 de PCV2, e vetor viral inativado. Este método compreende as etapas: i) clonar a ORF2 de PCV2 amplificada em um vetor de transferência; ii) transfectar a porção do vetor de transferência contendo a ORF2 de PCV2 recombinante em um vírus; iii) infectar as células em meios com o vetor viral transfectado; iv) fazer o vetor viral transfectado expressar a proteína recombinante de ORF2 de PCV2; v) separar as células do sobrenadante; vi) restabelecer a proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante; e vii) inativar o vetor viral recombinante. Preferivelmente, o vetor viral recombinante é um baculovírus contendo sequências de codificação de DNA de ORF2 e as células são células de SF+. Etapas de separação preferidas são aquelas descritas acima, mais preferida é a etapa de filtração. Etapas de inativação preferidas são aquelas descritas acima. Preferivelmente, inativação é executada entre cerca de 35 - 39° C e na presença de 2 a 8 mM de BEI, ainda mais preferido na presença de cerca de 5 mM de BEI. Foi surpreendentemente descoberto, que concentrações mais altas de BEI afetam proteína de ORF2 de PCV2 negativamente, e concentrações inferiores não são eficazes para inativar o vetor viral dentro de 24 a 72 horas de inativação. Preferivelmente, inativação é executada por pelo menos 24 horas, até mesmo mais preferido durante 24 a 72 horas.

[0034] De acordo com um outro aspecto, o método para preparar uma composição compreendendo proteína de ORF2 de PCV2, e vetor viral inativado, como descrito acima, também inclui uma etapa de neutralização após a etapa vii). Esta etapa viii) compreende adição de uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inativação dentro da solução. Preferivelmente, se o agente de inativação for BEI, adição de tiosulfato de sódio a uma quantidade equivalente é preferida. Desse modo, de acordo com um outro aspecto, etapa viii) compreende adição de uma solução de tiosulfato de sódio a uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM, preferivel-

mente de cerca de 2 a cerca de 10 mM, ainda mais preferivelmente de cerca de 2 a cerca de 8 mM, ainda mais preferivelmente de cerca de 3 a cerca de 7 mM, o mais preferivelmente de cerca de 5 mM, quando o agente de inativação for BEI.

[0035] De acordo com um outro aspecto, o método para preparar uma composição compreendendo proteína de ORF2 de PCV2, e vetor viral inativado, como descrito acima, compreende antes da etapa i) a etapa a seguir: amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências de flanqueamento do DNA de ORF2 de PCV2 são modificadas como descritas acima. Métodos *in vitro* para amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 e modificar as sequências de flanqueamento, clonar *in vitro* DNA de ORF2 de PCV2 amplificado em um vetor de transferência e vetores de transferência adequados são descritos acima, exemplarmente mostrados na Figura 1, ou conhecidos a uma pessoa versada na técnica. Desse modo de acordo com um outro aspecto, este método compreende as etapas: i) amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências de flanqueamento do referido DNA de ORF2 de PCV2 são modificadas, ii) clonar o DNA de ORF2 de PCV2 amplificado em um vetor de transferência; e iii) transfectar o vetor de transferência ou uma porção deste contendo o DNA de ORF2 de PCV2 recombinante em um vetor viral para gerar o vetor viral recombinante, iv) infectar as células em meios com o vírus transfectado; v) fazer o vírus transfectado expressar a proteína recombinante de ORF2 de PCV2; vi) separar as células do sobrenadante; vii) restabelece a proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante; viii) inativar o vetor viral recombinante, preferivelmente, na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de BEI, mais preferido na presença de cerca de 5 mM de BEI; e ix) adicionar uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inativação dentro da solução, preferivelmente, adicionar uma solução de tiosulfato de sódio a uma concentração fi-

nal de cerca de 1 a cerca de 20 mM, preferivelmente de cerca de 5 mM, quando o agente de inativação for BEI.

[0036] Em outro aspecto da presente invenção, um método para preparar uma composição, preferivelmente uma composição antigênica, como por exemplo uma vacina, para invocar uma resposta imune contra PCV2 é fornecido. Em geral, este método inclui as etapas de transfectar uma construção em um vírus, em que a construção compreende i) DNA recombinante de ORF2 de PCV2, ii) infectar células em meios de crescimento com o vírus transfectado, iii) fazer o vírus expressar a proteína recombinante de ORF2 de PCV2, iv) restabelecer a proteína de ORF2 expressa do sobrenadante, v) e preparar a composição combinando a proteína restabelecida com um adjuvante adequado e/ou outro veículo farmacêuticamente aceitável.

[0037] "Adjuvantes" como aqui usado, pode incluir hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, saponinas por exemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI - 0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsão de água-em-óleo, emulsão de óleo-em-água, emulsão de água-em-óleo-em-água. A emulsão pode ser em particular com base em óleo de óleo de parafina leve (tipo da Farmacopéia européia); óleo de isoprenóide como esqualano ou esqualeno; óleo resultante de teoligomerização de alquenos, em particular de isobuteno ou deceno; ésteres de ácidos ou de alcoóis contendo um grupo alquila linear, mais particularmente óleos vegetais, oleato de etila, di-(caprilato/caprato) de propileno glicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerila ou dioleato de propileno glicol; ésteres ou alcoóis de ácidos graxos ramificados, em particular ésteres de ácido isosteárico. O óleo é usado em combinação com emulsificantes para formar a emulsão. Os emulsificantes são preferivelmente tensoativos não-iônicos, em particular ésteres de sorbitan, de manida (por exemplo, oleato de anidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propileno glicol e de ácido

oléico, isosteárico, ricinoléico ou hidroxiesteárico que são opcionalmente etoxilados, e copolímero bloco de polioxipropileno-polioxietileno, em particular os produtos Pluronic, especialmente L121. Vide Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, págs 51-94 (1995) e Todd et al., *Vacina* 15:564-570 (1997).

[0038] Por exemplo, é possível usar a emulsão de SPT descrita na página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editado por M. Powell e M. Newman, Plenum Press, 1995, e a emulsão MF59 descrita na página 183 deste mesmo livro.

[0039] Uma outra circunstância de um adjuvante é um composto selecionado dos polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e os copolímeros de anidrido maléico e derivado de alquenila. Compostos adjuvantes vantajosos são os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico que são reticulados, especialmente com éteres de polialquenila de açúcares ou poliálcoois. Estes compostos são conhecidos pelo termo carbômero (Phameuropa Vol. 8, No. 2, junho de 1996). Pessoas versadas na técnica podem também referir-se à Patente U. S. No. 2.909.462 que descreve tais polímeros acrílicos reticulados com um composto poliidroxiado tendo pelo menos 3 grupos hidroxila, preferivelmente não mais que 8, os átomos de hidrogênio de pelo menos três hidroxilas sendo substituídos por radicais alifáticos insaturados tendo pelo menos 2 átomos de carbono. Os radicais preferidos são aqueles contendo de 2 a 4 átomos de carbono, por exemplo vinilas, alilas e outros grupos etilenicamente insaturados. Os radicais insaturados podem por si só conter outros substituintes, como metila. Os produtos vendidos sob o nome Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EUA) são particularmente apropriados. Eles são reticulados com uma sacarose de alila ou com pentaeritritol de alila. Entre eles, podem ser mencionados Carbopol 974P, 934P e 971P. O mais preferido é o uso de Cabopol 971P.

Entre os copolímeros de anidrido maléico e derivado de alquenila, os copolímeros EMA (Monsanto) que são copolímeros de anidrido maléico e etileno. A dissolução destes polímeros em água leva a uma solução de ácido que será neutralizada, preferivelmente para pH fisiológico, para dar a solução de adjuvante à qual a composição imunogênica, imunológica ou de vacina será incorporada.

[0040] Outros adjuvantes adequados incluem, mas não são limitados a, o sistema de adjuvante de RIBI (Ribi Inc.), Co-polímero de bloco (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), lipídio de monofosforila A, adjuvante de lipídio-amina de Avridina, enterotoxina lábil a calor de *E. coli* (recombinante ou diferente), toxina de cólera, IMS 1314 ou dipeptídeo de muramila entre muitos outros.

[0041] Preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. Até mesmo mais preferido o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. Até mesmo mais preferido o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose. Até mesmo mais preferido o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose. O mais preferido o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 1 mg por dose.

[0042] Desse modo, de acordo com um outro aspecto, o método para preparar uma composição antigênica, como por exemplo uma vacina, para invocar uma resposta imune contra PCV2 compreende i) preparar e restabelecer a proteína de ORF2 de PCV2, e ii) misturar esta com um adjuvante adequado. Preferivelmente, o adjuvante é Carbopol 971P. Até mesmo mais preferido, Carbopol 971P é adicionado em uma quantidade de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, até mesmo mais preferido em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e o mais preferido em uma quantidade de

cerca de 1 mg por dose. Preferivelmente, a etapa de processo i) inclui as etapas de processo como descritas para a preparação e restabelecimento de ORF2 de PCV2. Por exemplo, em formas preferidas deste método, o constructo compreendendo o DNA de ORF2 de PCV2 é obtida em um vetor de transferência. Vetores de transferência e métodos adequados de preparação são descritos acima. Opcionalmente, o método pode incluir a etapa de amplificar a ORF2 de uma cepa de PCV2 através de PCR antes de clonar a ORF2 no vetor de transferência. Sequências de quadro aberto de leitura preferidas, as sequências de Kozak, sequências de sítio de EcoR1 de 3', sequências de proteína recombinante, sequências de construção transfectada, meios, células e vírus são como descritos nos métodos anteriores. Outra etapa opcional para este método inclui clonagem do DNA de ORF2 de PCV2 amplificado em um primeiro vetor, excisão do DNA de ORF2 deste primeiro vetor e uso deste DNA de ORF2 de PCV2 excisado para clonagem no vetor de transferência. Como com os outros métodos, é preferido aguardar por pelo menos 5 dias após infecção das células pelo baculovírus transfectado antes do restabelecimento da proteína de ORF2 recombinante do sobrenadante. Preferivelmente, a etapa de restabelecer deste método também inclui a etapa de separar os meios das células e restos de célula. Isto pode ser feito em uma variedade de modos mas para facilidade e conveniência, é preferido filtrar as células, restos de célula e meios de crescimento através de um filtro tendo poros que variam em tamanho de cerca de 0,45 μM a cerca de 1,0 μM . Por fim, para este método, preferiu-se incluir uma etapa de inativação de vírus antes de combinar a proteína de ORF2 de PCV2 recombinante restabelecida em uma composição. Isto pode ser feito em uma variedade de modos, mas é preferido na prática da presente invenção usar BEI.

[0043] Desse modo de acordo com um outro aspecto, este método

compreende as etapas: i) amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências de flanqueamento do referido DNA de ORF2 de PCV2 são modificadas, ii) clonar o DNA de ORF2 de PCV2 amplificado em um vetor de transferência; e iii) transfectar o vetor de transferência ou uma porção deste contendo o DNA de ORF2 de PCV2 recombinante em um vetor viral para gerar o vetor viral recombinante, iv) infectar as células em meios com o vírus transfectado; v) fazer o vírus transfectado expressar a proteína recombinante de ORF2 de PCV2; vi) separar as células do sobrenadante; vii) restabelecer a proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante; viii) inativar o vetor viral recombinante, preferivelmente, na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de BEI, mais preferido na presença de cerca de 5 mM de BEI; ix) adicionar uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inativação dentro da solução, preferivelmente, adicionando uma solução de tiosulfato de sódio a uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM, preferivelmente de cerca de 5 mM, quando o agente de inativação for BEI, e x) adicionar uma quantidade adequada de um adjuvante, preferivelmente adicionar Carbopol, mais preferivelmente Carbopol 971P, até mesmo mais preferido em quantidades como descritas acima (por exemplo, de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, até mesmo mais preferido em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e o mais preferido em uma quantidade de cerca de 1 mg por dose).

[0044] Adicionalmente, a composição pode incluir um ou mais veículos farmacêuticos aceitáveis. Como aqui usado, "veículo farmacêutico aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos, agentes retardantes de adsorção e outros. O mais preferido, a composição fornecida aqui, contém proteína de ORF2 de PCV2 restabelecida do so-

sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, em que as ditas células foram infectadas com um vetor viral recombinante contendo o DNA de ORF2 de PCV2 e expressando proteína de ORF2 de PCV2, e em que a referida cultura de célula foi tratada com aproximadamente 2 a cerca de 8 mM de BEI, preferivelmente com aproximadamente 5 mM de BEI para inativar o vetor viral, e uma concentração equivalente de um agente de neutralização, preferivelmente solução de tiosulfato de sódio para uma concentração final de cerca de 2 a cerca de 8 mM, preferivelmente de cerca de 5 mM, Carbopol, mais preferivelmente Carbopol 971P, preferivelmente em quantidades de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, até mesmo mais preferido em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e o mais preferido em uma quantidade de cerca de 1 mg por dose, e solução salina fisiológica, preferivelmente em uma quantidade de cerca de 50 a cerca de 90 % (v/v), mais preferivelmente a cerca de 60 a 80 % (v/v), ainda mais preferivelmente de cerca de 70 % (v/v).

[0045] Desse modo, um outro aspecto diz respeito a um método para preparar uma composição antigênica, como por exemplo uma vacina, para invocar uma resposta imune contra PCV2 compreendendo as etapas: i) amplificar o DNA de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências de flanqueamento do referido DNA de ORF2 de PCV2 são modificadas, ii) clonar o DNA de ORF2 de PCV2 amplificado em um vetor de transferência; e iii) transfectar o vetor de transferência ou uma porção deste contendo o DNA de ORF2 de PCV2 recombinante em um vetor viral para gerar o vetor viral recombinante, iv) infectar as células em meios com o vírus transfectado; v) fazer o vírus transfectado expressar a proteína recombinante de ORF2 de PCV2; vi) separar as células do sobrenadante; vii) restabelecer a proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante; viii) inativar o vetor viral recombinante, preferivelmente, na presença de cerca de 2 a cerca de 20 mM de

BEI, mais preferido na presença de cerca de 5 mM de BEI; ix) adicionar uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inativação dentro da solução, preferivelmente, adicionar uma solução de tiosulfato de sódio a uma concentração final de cerca de 0,5 a cerca de 20 mM, preferivelmente de cerca de 5 mM, quando o agente de inativação for BEI, x) adicionar uma quantidade adequada de uns adjuvantes, preferivelmente adicionar Carbopol, mais preferivelmente Carbopol 97 IP, ainda mais preferido em quantidades como descritas acima (por exemplo, de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, até mesmo mais preferido em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e o mais preferido em uma quantidade de cerca de 1 mg por dose); e xi) adicionar solução salina fisiológica, preferivelmente em uma quantidade de cerca de 50 a cerca de 90 % (v/v), mais preferivelmente a cerca de 60 a 80 % (v/v), ainda mais preferivelmente de cerca de 70 % (v/v). Opcionalmente, este método pode também incluir a adição de um protetor. Um protetor como aqui usado, refere-se a um agente ativo antimicrobiológico, como por exemplo Gentamicina, Mertiolo e outros. Em particular adição de um protetor é o mais preferido para a preparação de uma composição de multidose. Aqueles agentes ativos antimicrobiológicos são adicionados em concentrações eficazes para impedir a composição de interesse de qualquer contaminação microbiana ou para inibição de qualquer crescimento microbiano dentro da composição de interesse.

[0046] Além disso, este método pode também compreender adição de qualquer agente estabilizante, como por exemplo sacarídeos, trealose, manitol, sacarose e outros, para aumentar e/ou manter a vida de prateleira do produto. Porém, foi surpreendentemente descoberto, que a formulação resultante é imunologicamente eficaz em um período de pelo menos 24 meses, sem adicionar qualquer outro agente estabilizante.

[0047] Um outro aspecto da presente invenção diz respeito aos produtos resultantes dos métodos como descritos acima. Em particular, a presente invenção diz respeito a uma composição de substância que compreende proteína de ORF2 de PCV2 recombinantemente expressa. Além disso, a presente invenção também diz respeito a uma composição de substância compreendendo proteína de ORF2 recombinantemente expressa, restabelecida do sobrenadante de uma cultura de célula de inseto, para PCV2. Além disso, a presente invenção também diz respeito a uma composição de substância que compreende proteína de ORF2 recombinantemente expressa, restabelecida do sobrenadante de uma cultura de célula de inseto, para PCV2. Preferivelmente, esta composição de substância também compreende um agente adequado para a inativação dos vetores virais.

[0048] Preferivelmente, o referido agente de inativação é BEI. Além disso, a presente invenção também diz respeito a uma composição de substância compreendendo proteína de ORF2 recombinantemente expressa, restabelecida do sobrenadante de uma cultura de célula de inseto, para PCV2 e compreende um agente, adequado para a inativação de vetores virais, preferivelmente BEI e um agente de neutralização para neutralização do agente de inativação. Preferivelmente, o agente de neutralização é tiosulfato de sódio, quando BEI for usado como um agente de inativação.

[0049] Em ainda outro aspecto da presente invenção, uma composição imunogênica que induz uma resposta imune e, mais preferivelmente, confere imunidade protetora contra os sinais clínicos de infecção de PCV2, é fornecida. A composição em geral compreende o polipeptídeo, ou um fragmento deste, expresso por Quadro aberto de leitura 2 (ORF2) de PCV2, como o componente antigênico da composição.

[0050] O DNA de ORF2 de PCV2 e a proteína, como aqui usados

para a preparação das composições e também como usados dentro dos processos fornecidos aqui, são um domínio altamente conservado dentro de isolados de PCV2 e assim, qualquer ORF2 de PCV2 seria eficaz como a fonte do PCV DNA de ORF2 e/ou polipeptídeo como aqui usado. Uma proteína de ORF2 de PCV2 preferida é aquela da SEQ ID NO. 11. Um polipeptídeo de ORF2 de PCV preferido é fornecido aqui como SEQ ID NO. 5, mas é entendido por aqueles versados na técnica que esta sequência poderia variar em até 6 - 10 % em homologia de sequência e ainda reter as características antigênicas que a tornam útil em composições imunogênicas. As características antigênicas de uma composição imunológica podem ser, por exemplo, estimadas pelo experimento de desafio como fornecido pelo Exemplo 4. Além disso, a característica antigênica de um antígeno modificado ainda é retida, quando o antígeno modificado conferir pelo menos 70 %, preferivelmente 80 %, mais preferivelmente 90 % da imunidade protetora quando comparado à proteína de ORF 2 de PCV2, codificada pela sequência de polinucleotídeo da SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:4. Uma "composição imunogênica" como aqui usada, significa uma proteína de ORF2 de PCV2 que suscita uma "resposta imunológica" no hospedeiro de uma resposta celular e/ou imune mediada por anticorpo para proteína de ORF2 de PCV2. Preferivelmente, esta composição imunogênica é capaz de conferir imunidade protetora contra infecção de PCV2 e os sinais clínicos associados a ela. Em algumas formas, porções imunogênicas de proteína de ORF2 de PCV2 é usada como o componente antigênico na composição. O termo "porção imunogênica" como aqui usado refere-se às formas truncadas e/ou substituídas, ou fragmentos de proteína de ORF2 de PCV2 e/ou polinucleotídeo, respectivamente. Preferivelmente, tais formas truncadas e/ou substituídas, ou fragmentos compreenderão pelo menos 6 aminoácidos contíguos do polipeptídeo de ORF2 de comprimento total. Mais preferivelmente,

as formas truncadas ou substituídas, ou fragmentos terão pelo menos 10, mais preferivelmente pelo menos 15 e ainda mais preferivelmente pelo menos 19 aminoácidos contíguos do polipeptídeo de ORF2 de comprimento total. Duas sequências preferidas neste respeito são fornecidas aqui como SEQ ID NOs. 9 e 10. É também entendido que tais sequências podem ser uma parte de fragmentos maiores ou formas truncadas. Um PCV2 preferido também polipeptídeo de ORF2 fornecido aqui é codificado pelas sequências de nucleotídeo da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4. Mas é entendido por aqueles versados na técnica que esta sequência poderia variar em sequência por até 6-20 % de homologia e ainda poderia reter as características antigênicas que a tornam útil nas composições imunogênicas. Em algumas formas, uma forma truncada ou substituída, ou fragmento de ORF2, é usada como o componente antigênico na composição. Preferivelmente, tais formas truncadas ou substituídas, ou fragmentos compreenderão pelo menos 18 nucleotídeos contíguos da sequência de nucleotídeo de ORF2 de comprimento total, por exemplo da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4. Mais preferivelmente, as formas truncadas ou substituídas, ou fragmentos terão pelo menos 30, mais preferivelmente pelo menos 45 e ainda mais preferivelmente pelo menos 57 nucleotídeos contíguos à sequência de nucleotídeo de ORF2 de comprimento total, por exemplo da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

[0051] "Identidade de sequência" como é conhecida na técnica refere-se a uma relação entre duas ou mais sequências de polipeptídeo ou duas ou mais sequências de polinucleotídeo, a saber uma sequência de referência e uma sequência dada a ser comparada com a sequência de referência. Identidade de sequência é determinada comparando a sequência dada à sequência de referência após as sequências terem sido otimamente alinhadas para produzir o grau mais alto de similaridade de sequência, como determinado pelo emparelhamen-

to entre as cadeias de tais sequências. Em tal alinhamento, identidade de sequência é averiguada em uma base de posição-por-posição, por exemplo, as sequências são "idênticas" a uma posição particular se naquela posição, os nucleotídeos ou resíduos de aminoácido forem idênticos. O número total de tais identidades de posição é depois dividido pelo número total de nucleotídeos ou resíduos na sequência de referência para dar % de identidade de sequência. Identidade de sequência pode ser calculada facilmente através de métodos conhecidos, incluindo, mas não limitado a, aqueles descritos em Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nova Iorque (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nova Iorque (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., e Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nova Jérsei (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nova Iorque (1991); e Carillo, H., e Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), os ensinamentos destes são incorporados aqui por referência. Métodos preferidos para determinar a identidade de sequência são designados para dar o emparelhamento maior entre as sequências testadas. Os métodos são classificados para determinar a identidade de sequência em programas de computação publicamente disponíveis que determinam a identidade de sequência entre as sequências dadas. Exemplos de tais programas incluem, mas não são limitados a, o pacote de programa de GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). O programa de BLASTX está publicamente disponível de NCBI e outras fontes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)), os ensinamentos destes são

incorporados aqui por referência). Estes programa otimamente alinham as sequências usando pesos de intervalo predefinidos para produzir o nível mais alto de identidade de sequência entre as sequências dadas e de referência. Como uma ilustração, por um polinucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeo tendo pelo menos, por exemplo, 85 %, preferivelmente 90 %, até mesmo mais preferivelmente 95 % de "identidade de sequência" a uma sequência de nucleotídeo de referência, é intencionado que a sequência de nucleotídeo do polinucleotídeo dado seja idêntica à sequência de referência exceto que a sequência de polinucleotídeo dada pode incluir até 15, preferivelmente até 10, até mesmo mais preferivelmente até 5 mutações de ponto por cada 100 nucleotídeos da sequência de nucleotídeo de referência, em outras palavras, em um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeo tendo pelo menos 85 %, preferivelmente 90 %, até mesmo mais preferivelmente 95 % de identidade com relação à sequência de nucleotídeo de referência, até 15 %, preferivelmente 10 %, até mesmo mais preferivelmente 5 % dos nucleotídeos na sequência de referência podem ser deletados ou substituídos com outro nucleotídeo, ou vários nucleotídeos até 15 %, preferivelmente 10 %, até mesmo mais preferivelmente 5 % dos nucleotídeos totais na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência. Estas mutações da sequência de referência podem ocorrer nas posições terminais 5' ou 3' da sequência de nucleotídeo de referência ou em qualquer lugar entre aquelas posições terminais, entremeadas ou individualmente entre os nucleotídeos na sequência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência de referência. Analogamente, por um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido dado tendo pelo menos, por exemplo, 85 %, preferivelmente 90 %, até mesmo mais preferivelmente 95 % de identidade de sequência a uma sequência de aminoácido de referência, é intencionado que a sequência de aminoá-

cido dada do polipeptídeo seja idêntica à sequência de referência exceto que a sequência de polipeptídeo dada pode incluir até 15, preferivelmente até 10, até mesmo mais preferivelmente até 5 alterações de aminoácido por cada 100 aminoácidos da sequência de aminoácido de referência. Em outras palavras, para obter uma sequência de polipeptídeo dada tendo pelo menos 85 %, preferivelmente 90 %, até mesmo mais preferivelmente 95 % de identidade de sequência a uma sequência de aminoácido de referência, até 15 %, preferivelmente até 10 %, até mesmo mais preferivelmente até 5 % dos resíduos de aminoácido na sequência de referência podem ser deletados ou substituídos com outro aminoácido, ou vários aminoácidos até 15 %, preferivelmente até 10 %, até mesmo mais preferivelmente até 5 % do número total de resíduos de aminoácido na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência. Estas alterações da sequência de referência podem ocorrer nas posições terminais amino ou carbóxi da sequência de aminoácido de referência ou em qualquer lugar entre aquelas posições terminais, entremeadas ou individualmente entre os resíduos na sequência de referência ou no um ou mais grupos contíguos dentro da sequência de referência. Preferivelmente, posições de resíduo que não são idênticas diferem pelas substituições de aminoácido conservadoras. Porém, substituições conservadoras não são incluídas como um emparelhamento ao determinar a identidade de sequência.

[0052] "Homologia de sequência", como aqui usado, refere-se a um método de determinar a relação de duas sequências. Para determinar a homologia de sequência, duas ou mais sequências são otimamente alinhadas, e são introduzidos intervalos se necessário. Porém, em contraste com a "identidade de sequência", substituições de aminoácido conservadoras são contadas como um emparelhamento ao determinar a homologia de sequência. Em outras palavras, para obter um polipeptídeo ou polinucleotídeo tendo 95 % de homologia de

sequência com uma sequência de referência, 85 %, preferivelmente 90 %, até mesmo mais preferivelmente 95 % dos resíduos de aminoácido ou nucleotídeos na sequência de referência têm que emparelhar ou têm compreender uma substituição conservadora com outro aminoácido ou nucleotídeo, ou vários aminoácidos ou nucleotídeos até 15 %, preferivelmente até 10 %, até mesmo mais preferivelmente até 5 % dos resíduos de aminoácido totais ou nucleotídeos, não incluindo substituições conservadoras, na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência. Preferivelmente a sequência homóloga compreende pelo menos uma extensão de 50, até mesmo mais preferido de 100, até mesmo mais preferido de 250, até mesmo mais preferido de 500 nucleotídeos.

[0053] Uma "substituição conservadora" refere-se à substituição de um resíduo de aminoácido ou nucleotídeo com outro resíduo de aminoácido ou nucleotídeo tendo características ou propriedades similares incluindo tamanho, hidrofobicidade, etc., de modo que a funcionalidade geral não altere significativamente.

[0054] "Isolado" significa alterado "pela mão do homem" de seu estado natural, isto é, se ocorrer na natureza, foi alterado ou removido de seu ambiente original, ou ambos. Por exemplo, um polinucleotídeo ou polipeptídeo naturalmente presente em um organismo vivo não é "isolado", mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo separado dos materiais coexistentes de seu estado natural é "isolado", como é empregado o termo aqui.

[0055] Desse modo, um outro aspecto da presente invenção diz respeito a uma composição imunogênica eficaz para diminuir a severidade dos sintomas clínicos associados à infecção de PCV2 compreendendo proteína de ORF2 de PCV2. Preferivelmente, a proteína de ORF2 de PCV2 é qualquer uma daquelas descritas acima. Preferivelmente, a referida proteína de ORF2 de PCV2 é:

i) um polipeptídeo compreendendo a sequência da SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11;

ii) qualquer polipeptídeo que é pelo menos 80 % homólogo ao polipeptídeo de i),

iii) qualquer porção imunogênica dos polipeptídeos de i) e/ou ii)

iv) a porção imunogênica de iii), compreendendo pelo menos 10 aminoácidos contíguos incluídos nas sequências da SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11,

v) um polipeptídeo que é codificado por um DNA compreendendo a sequência da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4,

vi) qualquer polipeptídeo que é codificado por um polinucleotídeo que é pelo menos 80 % homólogo ao polinucleotídeo de v),

vii) qualquer porção imunogênica dos polipeptídeos codificada pelo polinucleotídeo de v) e/ou vi)

viii) a porção imunogênica de vii), em que o polinucleotídeo que codifica para a referida porção imunogênica compreende pelo menos 30 nucleotídeos contíguos incluídos nas sequências da SEQ ID NO: 3, ou SEQ ID NO: 4.

[0056] Preferivelmente qualquer uma daquelas porções imunogênicas tendo as características imunogênicas da proteína de ORF2 de PCV2 que é codificada pela sequência SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

[0057] De acordo com um outro aspecto, proteína de ORF2 de PCV2 é provida na composição imunológica a um nível de inclusão de antígeno eficaz para induzir a resposta imune desejada, a saber reduzir a incidência ou diminuir a severidade de sinais clínicos resultantes da infecção de PCV2. Preferivelmente, o nível de inclusão de proteína ORF2 de PCV2 é pelo menos 0,2 µg de antígeno / ml da composição

imunogênica final ($\mu\text{g/ml}$), mais preferivelmente de cerca de 0,2 a cerca de 400 $\mu\text{g/ml}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,3 a cerca de 200 $\mu\text{g/ml}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 0,35 a cerca de 100 $\mu\text{g/ml}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,4 a cerca de 50 $\mu\text{g/ml}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,45 a cerca de 30 $\mu\text{g/ml}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,6 a cerca de 15 $\mu\text{g/ml}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 0,75 a cerca de 8 $\mu\text{g/ml}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 1,0 a cerca de 6 $\mu\text{g/ml}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 3,0 $\mu\text{g/ml}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 1,4 a cerca de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 1,5 a cerca de 2,0 $\mu\text{g/ml}$, e o mais preferivelmente cerca de 1,6 $\mu\text{g/ml}$.

[0058] De acordo com um outro aspecto, o nível de inclusão de antígeno de ORF2 é pelo menos 0,2 μg de proteína de ORF2 de PCV2 como descrito acima por dose da composição antigênica final ($\mu\text{g/dose}$), mais preferivelmente de cerca de 0,2 a cerca de 400 $\mu\text{g/dose}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,3 a cerca de 200 $\mu\text{g/dose}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 0,35 a cerca de 100 $\mu\text{g/dose}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,4 a cerca de 50 $\mu\text{g/dose}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,45 a cerca de 30 $\mu\text{g/dose}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,6 a cerca de 15 $\mu\text{g/dose}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 0,75 a cerca de 8 $\mu\text{g/dose}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 1,0 a cerca de 6 $\mu\text{g/dose}$, ainda mais preferivelmente de cerca de 1,3 a cerca de 3,0 $\mu\text{g/dose}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 1,4 a cerca de 2,5 $\mu\text{g/dose}$, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 1,5 a cerca de 2,0 $\mu\text{g/dose}$ e o mais preferivelmente cerca de 1,6 $\mu\text{g/dose}$.

[0059] O polipeptídeo de ORF2 de PCV2 usado em uma composição imunogênica de acordo com a presente invenção pode ser derivado em qualquer maneira incluindo isolamento e purificação de ORF2

de PCV2, síntese de proteína padrão e metodologia recombinante. Métodos preferidos para obter polipeptídeo de ORF2 de PCV2 são descritos aqui acima e são também fornecidos no Pedido de patente U. S. No. 11/034.797, os ensinamentos e conteúdo deste são aqui incorporados por referência. Brevemente, células suscetíveis são infectadas com um vetor viral recombinante contendo sequências de codificação de DNA de ORF2 de PCV2, polipeptídeo de ORF2 de PCV2 é expresso pelo vírus recombinante, e o polipeptídeo de ORF2 de PCV2 expresso é restabelecido do sobrenadante através de filtração e inativado por qualquer método convencional, preferivelmente usando etilenoimina binária que é depois neutralizada para parar o processo de inativação.

[0060] Desse modo, de acordo com um outro aspecto a composição imunogênica compreende i) qualquer uma da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, preferivelmente em concentrações descritas acima, e ii) pelo menos uma porção do vetor viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, preferivelmente de um baculovírus recombinante. Além disso, de acordo com um outro aspecto, a composição imunogênica compreende i) qualquer uma da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, preferivelmente em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma porção do vetor viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, preferivelmente de um baculovírus recombinante e iii) uma porção do sobrenadante de cultura de célula.

[0061] De acordo com uma modalidade específica da produção e processo de restabelecimento para proteína de ORF2 de PCV2, o sobrenadante de cultura de célula é filtrado através de uma membrana que tem um tamanho de poro, preferivelmente entre cerca de 0,45 a 1 μm . Desse modo, um outro aspecto diz respeito a uma composição imunogênica compreendendo i) qualquer uma da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, preferivelmente em concentrações descritas

acima, ii) pelo menos uma porção do vetor viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, preferivelmente de um baculovírus recombinante, e iii) uma porção da cultura de célula; em que cerca de 90 % dos componentes têm um tamanho menor que 1 μ m.

[0062] De acordo com um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma composição imunogênica compreendendo i) qualquer uma da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, preferivelmente em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma porção do vetor viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, iii) uma porção da cultura de célula, iv) e inativando o agente para inativar o vetor viral recombinante preferivelmente BEI, em que cerca de 90 % dos componentes i) a iii) têm um tamanho menor que 1 μ m. Preferivelmente, BEI está presente em concentrações eficazes para inativar o baculovírus. Concentrações eficazes são descritas acima.

[0063] De acordo com um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma composição imunogênica compreendendo i) qualquer uma da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, preferivelmente em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma porção do vetor viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, iii) uma porção da cultura de célula, iv) um agente de inativação para inativar o vetor viral recombinante preferivelmente BEI, e v) um agente de neutralização para parar a inativação mediada pelo agente de inativação, em que cerca de 90 % dos componentes i) a iii) têm um tamanho menor que 1 μ m. Preferivelmente, se o agente de inativação for BEI, a referida composição compreende tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes a BEI.

[0064] O polipeptídeo é incorporado em uma composição que pode ser administrada a um animal suscetível à infecção de PCV2. Em formas preferidas, a composição pode também incluir componentes adicionais conhecidos àqueles versados na técnica (vide também Re-

mington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18^a ed. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, a composição pode incluir um ou mais veículos veterinários aceitáveis. Como aqui usado, "veículo veterinário aceitável" inclui quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, adjuvantes, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos, agentes de retardo de adsorção e outros.

[0065] Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica compreende proteína de ORF2 de PCV2 como fornecida aqui, preferivelmente em concentrações descritas acima como um componente antigênico que é misturado com um adjuvante preferivelmente Carbo-pol, e solução salina fisiológica.

[0066] Aqueles versados na técnica entenderão que a composição aqui pode incorporar soluções estéreis injetáveis, fisiologicamente aceitáveis conhecidas. Para preparar uma solução pronta-para-uso para injeção ou infusão parenteral, soluções isotônicas aquosas, como por exemplo soluções salinas de proteína de plasma ou correspondentes estão facilmente disponíveis, além disso, as composições imunogênicas e de vacina da presente invenção podem incluir diluentes, agentes isotônicos, estabilizantes ou adjuvantes. Diluentes podem incluir água, solução salina, dextrose, etanol, glicerol e outros. Agentes isotônicos podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose, entre outros. Estabilizantes incluem albumina e sais de álcali de ácido etilenodiaminotetracético, entre outros. Adjuvantes adequados são aqueles descritos acima. O mais preferido é o uso de Carbo-pol, em particular o uso de Carbopol 971P, preferivelmente em quantidades como descritas acima (por exemplo de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, até mesmo mais preferido em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e o mais preferido em uma quantidade de cerca de 1 mg por dose).

[0067] Desse modo, a presente invenção também diz respeito a uma composição imunogênica que compreende i) qualquer uma das proteínas de ORF2 de PCV2 descritas acima, preferivelmente em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma porção do vetor viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, iii) uma porção da cultura de célula, iv) um agente de inativação para inativar o vetor viral recombinante preferivelmente BEI, e v) um agente de neutralização para parar a inativação mediada pelo agente de inativação, preferivelmente tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes a BEI; e vi) um adjuvante adequado, preferivelmente Carbopol 971 em quantidades descritas acima; em que cerca de 90 % dos componentes i) a iii) têm um tamanho menor que 1 μ m. De acordo com um outro aspecto, esta composição imunogênica também compreende um sal aceitável farmacêutico, preferivelmente um sal de fosfato em fisiologicamente concentrações aceitáveis. Preferivelmente, o pH da referida composição imunogênica é ajustado para um pH fisiológico, significando entre cerca de 6,5 e 7,5.

[0068] Desse modo, a presente invenção também diz respeito a uma composição imunogênica compreende por um ml i) pelo menos 1,6 μ g de proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, ii) pelo menos uma porção de baculovírus expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, iii) uma porção da cultura de célula, iv) cerca de 2 a 8 mM de BEI, v) tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes a BEI; e vi) cerca de 1 mg de Carbopol 971, e vii) sal de fosfato em uma concentração fisiologicamente aceitável; em que cerca de 90 % dos componentes i) a iii) têm um tamanho menor que 1 μ m e o pH da referida composição imunogênica é ajustado em cerca de 6,5 a 7,5.

[0069] As composições imunogênicas podem também incluir um ou mais outros agentes imunomoduladores como, e. g., interleucinas, interferonas, ou outras citocinas. As composições imunogênicas po-

dem também incluir Gentamicina e Mertiolo. Embora quantidades e concentrações de adjuvantes e aditivos úteis no contexto da presente invenção possam ser determinadas facilmente pelo artesão versado, a presente invenção contempla composições compreendendo de cerca de 50 µg a cerca de 2000 µg de adjuvante e preferivelmente cerca de 250 µg / ml de dose da composição de vacina. Em outra modalidade preferida, a presente invenção contempla composições de vacina compreendendo de cerca de 1 µg/ml a cerca de 60 µg/ml de antibióticos, e mais preferivelmente menos que cerca de 30 µg/ml de antibióticos.

[0070] Desse modo, a presente invenção também diz respeito a uma composição imunogênica compreendendo i) qualquer uma das proteínas de ORF2 de PCV2 descritas acima, preferivelmente em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma porção do vetor viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, iii) uma porção da cultura de célula, iv) um agente de inativação para inativar o vetor viral recombinante preferivelmente BEI, e v) um agente de neutralização para parar a inativação mediada pelo agente de inativação, preferivelmente tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes a BEI; vi) um adjuvante adequado, preferivelmente Carbopol 971 em quantidades descritas acima; vii) uma concentração aceitável farmacêutica de um tampão salino, preferivelmente de um sal de fosfato, e viii) um agente ativo antimicrobiológico; em que cerca de 90 % dos componentes i) a iii) têm um tamanho menor que 1 µm.

[0071] Foi surpreendentemente descoberto, que a composição imunogênica fornecida aqui foi altamente estável em um período de 24 meses. Foi também descoberto que as composições imunogênicas fornecidas aqui, compreendendo proteína de ORF2 de PCV2 expressada com baculovírus recombinante como fornecida aqui, são muito eficazes em reduzir os sintomas clínicos associados às infecções de

PCV2. Foi surpreendentemente descoberto, que as composições imunogênicas, compreendendo a proteína de ORF2 de PCV2 expressada com baculovírus recombinante como fornecida aqui, são mais eficazes que uma composição imunogênica compreendendo o vírus de PCV2 inteiro em uma forma inativada, ou antígeno de ORF2 de PCV2 viral isolado. Em particular, foi surpreendentemente descoberto, que a proteína de ORF2 de PCV2 expressada com baculovírus recombinante é eficaz em concentrações muito baixas, o que significa em concentrações até 0,25 µg/dose. Este potencial imunogênico alto inesperado da proteína de ORF2 de PCV2 poderia ser também aumentado pela adição de Carbopol.

[0072] Um outro aspecto diz respeito a um recipiente compreendendo pelo menos uma dose da composição imunogênica de proteína de ORF2 de PCV2 como fornecido com aqui, em que uma dose compreende pelo menos 2 µg de proteína de ORF2 de PCV2, preferivelmente 2 a 16 µg de proteína de ORF2 de PCV2. O referido recipiente pode compreender 1 a 250 doses da composição imunogênica, preferivelmente contém 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ou 250 doses da composição imunogênica de proteína de ORF2 de PCV2. Preferivelmente, cada um dos recipientes compreendendo mais de uma dose da composição imunogênica de proteína de ORF2 de PCV2 também compreende um agente ativo antimicrobiológico. Aqueles agentes são por exemplo para antibióticos incluindo Gentamicina e Mertiolato e outros. Desse modo, um aspecto da presente invenção diz respeito a um recipiente compreendendo 1 a 250 doses da composição imunogênica de proteína de ORF2 de PCV2, em que uma dose compreende pelo menos 2 µg de proteína de ORF2 de PCV2, e Gentamicina e/ou Mertiolato, preferivelmente de cerca de 1 µg/ml a cerca de 60 µg/ml de antibióticos, e mais preferivelmente menos que cerca de 30 µg/ml.

[0073] Um outro aspecto diz respeito a um kit, compreendendo

quaisquer dos recipientes, descritos acima, e um manual de instrução, incluindo a informação para a aplicação intramuscular de pelo menos uma dose da composição imunogênica de proteína de ORF2 de PCV2 em um leitão para diminuir a severidade de sintomas clínicos associados à infecção de PCV2. Além disso, de acordo com um outro aspecto, o referido manual de instrução compreende a informação de um segunda ou outra(s) administração(ões) de pelo menos uma dose da composição imunogênica de ORF2 de PCV2, em que a segunda administração ou qualquer outra administração é pelo menos 14 dias depois da administração inicial ou qualquer outra anterior. Preferivelmente, o referido manual de instrução também inclui a informação para administrar um estimulante imune. Preferivelmente, o referido estimulante imune será dado pelo menos duas vezes. Preferivelmente, pelo menos 3, mais preferivelmente pelo menos 5, até mesmo mais preferivelmente pelo menos 7 dias estão entre a primeira e a segunda ou qualquer outra administração do estimulante imune. Preferivelmente, o estimulante imune é dado pelo menos 10 dias, preferivelmente 15, até mesmo mais preferivelmente 20, até mesmo mais preferivelmente pelo menos 22 dias depois da administração inicial da composição imunogênica de proteína de ORF2 de PCV2. Um estimulante imune preferido é por exemplo hemocianina de lapa (KLH), ainda preferivelmente emulsificado com o adjuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA). Porém, é aqui entendido, que qualquer outro estimulante imune conhecido a uma pessoa versada na técnica pode também ser usado. "Estimulante imune" como aqui usado, significa qualquer agente ou composição que pode desencadear a resposta imune, preferivelmente sem iniciar ou aumentar uma resposta imune específica, por exemplo a resposta imune contra um patógeno específico. É também instruído para administrar o estimulante imune em uma dose adequada. Além disso, o kit pode também compreender um recipiente, incluindo pelo

menos uma dose do estimulante imune, preferivelmente uma dose de KLH, ou KLH/ICFA.

[0074] Além disso, foi também surpreendentemente descoberto que o potencial imunogênico das composições imunogênicas compreendendo proteína de ORF2 de PCV2 expressa por baculovírus recombinante, preferivelmente em combinação com Carbopol, pode ser também intensificado pela administração da vacina de IngelVac PRRS MLV (vide Exemplo 5). Sinais clínicos de PCV2 e manifestações de doença são grandemente aumentados quando infecção de PRRS está presente. Porém, as composições imunogênicas e estratégias de vacinação como fornecidas aqui diminuem este efeito grandemente, e mais que o esperado. Em outras palavras, um efeito sinérgico inesperado foi observado quando animais, preferivelmente porcos, são tratados com qualquer um da composição imunogênica de ORF2 de PCV2, como fornecida aqui, e da vacina de Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

[0075] Desse modo, um outro aspecto da presente invenção diz respeito ao kit como descrito acima, compreendendo a composição imunogênica de ORF2 de PCV2 como fornecida aqui e o manual de instrução, em que o manual de instrução também inclui a informação para administrar a composição imunogênica de ORF2 de PCV2 junto com a composição imunogênica compreendendo antígeno de PRRS, preferivelmente antígeno de PRRS em adjuvante. Preferivelmente, o antígeno de PRRS é IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

[0076] Um outro aspecto da presente invenção também diz respeito a um kit compreendendo i) um recipiente contendo pelo menos uma dose de uma composição imunogênica de ORF2 de PCV2 como fornecida aqui, e ii) um recipiente contendo uma composição imunogênica compreendendo antígeno de PRRS, preferivelmente antígeno de PRRS em adjuvante. Preferivelmente o antígeno de PRRS é In-

gelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Mais preferivelmente, o kit também compreende um manual de instrução, incluindo a informação para administrar ambas as composições farmacêuticas. Preferivelmente, ele contém informação que a composição contendo ORF2 de PCV2 é administrada temporariamente antes da composição contendo PRRS.

[0077] Um outro aspecto, diz respeito ao uso de quaisquer das composições fornecidas aqui como um medicamento, preferivelmente como um medicamento veterinário, até mesmo mais preferido como uma vacina. Além disso, a presente invenção também diz respeito ao uso de quaisquer das composições descritas aqui, para a preparação de um medicamento para diminuir a severidade de sintomas clínicos associados à infecção de PCV2. Preferivelmente, o medicamento é para a prevenção de uma infecção de PCV2, até mesmo mais preferivelmente em leitão.

[0078] Um outro aspecto diz respeito a um método para (i) a prevenção de uma infecção, ou reinfeção com PCV2 ou (ii) a redução ou eliminação de sintomas clínicos causados por PCV2 em um indivíduo, compreendendo administrar quaisquer das composições imunogênicas fornecidas aqui a um indivíduo em necessidade deste. Preferivelmente, o indivíduo é um porco. Preferivelmente, a composição imunogênica é administrada intramuscular. Preferivelmente, uma dose ou duas doses da composição imunogênica são administradas, em que uma dose preferivelmente compreende pelo menos cerca de 2 µg de proteína de ORF2 de PCV2, até mesmo mais preferivelmente cerca de 2 a cerca de 16 µg e pelo menos cerca de 0,1 a cerca de 5 mg de Carbopol, preferivelmente cerca de 1 mg de Carbopol. Um outro aspecto diz respeito ao método de tratamento como descrito acima, em que uma segunda aplicação da composição imunogênica é administrada. Preferivelmente, a segunda administração é feita com a mesma composição

imunogênica, preferivelmente tendo a mesma quantidade de proteína de ORF2 de PCV2. Preferivelmente a segunda administração é também dada intramuscular. Preferivelmente, a segunda administração é feita pelo menos 14 dias depois da administração inicial, até mesmo mais preferivelmente pelo menos 4 semanas depois da administração inicial.

[0079] De acordo com um outro aspecto, o método de tratamento também compreende a administração de um estimulante imune. Preferivelmente, o referido estimulante imune é administrado pelo menos duas vezes. Preferivelmente, pelo menos 3, mais preferivelmente pelo menos 5 dias, até mesmo mais preferivelmente pelo menos 7 dias estão entre a primeiro e a segunda administração do estimulante imune. Preferivelmente, o estimulante imune é administrado pelo menos 10 dias, preferivelmente 15, até mesmo mais preferivelmente 20, até mesmo mais preferivelmente pelo menos 22 dias além da administração inicial da composição imunogênica de ORF2 de PCV2. Um estimulante imune preferido é por exemplo é hemocianina de lapa (KLH), ainda preferivelmente emulsificado com o adjuvante de Freund incompleto (KLH/ICFA). Porém, é aqui entendido, que qualquer outro estimulante imune conhecido a uma pessoa versada na técnica pode também ser usado. Está dentro do conhecimento geral de uma pessoa versada na técnica administrar o estimulante imune em uma dose adequada.

[0080] De acordo com um outro aspecto, o método de tratamentos descrito acima também compreende a administração de antígeno de PRRS. Preferivelmente o antígeno de PRRS é IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Preferivelmente, o referido antígeno de PRRS é administrado temporariamente depois da administração da composição imunogênica de proteína de ORF2 de PCV2.

Breve Descrição dos Desenhos

[0081] Figura 1 é um diagrama de fluxo esquemático de uma construção preferida de baculovírus recombinante de ORF2 de PCV2; e

[0082] Figuras 2a e 2b são um diagrama de fluxo esquemático de como produzir uma composição de acordo com a presente invenção.

Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

[0083] Os exemplos a seguir determinam materiais e procedimentos preferidos de acordo com a presente invenção. Porém, é para ser entendido que estes exemplos são fornecidos por via de ilustração apenas, e nada deveria ser julgado uma limitação no escopo geral da invenção.

Exemplo 1

[0084] Este exemplo compara os rendimentos relativos de ORF2 usando métodos da presente invenção com métodos que são conhecidos na técnica anterior. Quatro frascos *spinner* de 1000 mL foram cada um semeados com aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL de Sf+ em 300 mL de meio livre de soro de inseto, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). A cultura de célula principal é identificada como Substância de Célula Principal de SF+ (*Spodoptera frugiperda*), passagem 19, Lot#N112-095W. As células usadas para gerar Substância de Célula Principal de SF+ foram obtidas de Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. A linhagem celular de SF+ para este exemplo foi confinada entre as passagens 19 e 59. Outras passagens trabalharão para propósitos da presente invenção, mas para aumentar o processo para produção em grande escala, pelo menos 19 passagens provavelmente serão necessárias e passagens além de 59 podem ter um efeito na expressão, embora isto não foi investigado. Em mais detalhes, as culturas iniciais de célula de SF+ de armazenamento de nitrogênio líquido foram crescidas em meio de Excell 420 em suspensão em frascos *spinner* estéreis com agitação constante. As culturas foram crescidas em frascos *spinner* de 100 ml a 250 mL com 25 a 150 ml de

meio de Excell 420 livre de soro. Quando as células tinham se multiplicado a uma densidade de célula de $1,0 - 8,0 \times 10^6$ células/mL, elas foram divididas em vasos novos com uma densidade de plantação de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. Culturas de expansão subsequentes foram crescidas em frascos *spinner* até 36 litros em tamanho ou em biorreatores de aço inoxidável de até 300 litros durante um período de 2-7 dias a 25 - 29° C.

[0085] Após semear, os frascos foram incubados a 27° C durante quatro horas. Subsequentemente, cada frasco foi semeado com um baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2 (SEQ ID NO: 4). O baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2 foi gerado como segue: o gene de ORF2 de PCV2 de uma cepa norte americana de PCV2 foi amplificado por PCR para conter a sequência de um Kozak de 5' (SEQ ID NO: 1) e um sítio de EcoR1 de 3' (SEQ ID NO: 2), clonado no vetor pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Depois, foi subsequentemente excisado e subclonado no vetor de transferência pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). A porção subclonada é representada aqui como SEQ ID NO: 7. O plasmídeo de pVL1392 contendo o gene de ORF2 de PCV2 foi designado N47-064Y e depois co-transfectado com DNA de baculovírus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) em células de inseto de Sf+ (Protein Sciences, Meriden, CT) para gerar o baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2. O constructo nova é fornecida aqui como SEQ ID NO: 8. O baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2 foi purificado em placa e Vírus de Semente Principal (MSV) foi propagado na linhagem celular de SF+, aliquotado, e armazenado a -70° C. O MSV foi identificado positivamente como baculovírus de ORF2 de PCV2 por PCR-RFLP usando iniciadores baculovírus-específicos. Células de inseto infetadas com baculovírus de ORF2 de PCV2 para gerar MSV ou Vírus de Semente de Trabalho

PCV2 expressam antígeno de ORF2 como detectado por anticorpos de soro policlonal ou monoclonais em um ensaio de anticorpo fluorescente indireto. Adicionalmente, a identidade do baculovírus de ORF2 de PCV2 foi confirmada através de sequenciação de aminoácido N-terminal. O MSV de baculovírus de ORF2 de PCV2 foi também testado para pureza de acordo com 9 C.F.R. 113,27 (c), 113,28 e 113,55. Cada baculovírus recombinante semeado nos frascos *spinner* teve multiplicidades variadas de infecção (MOIs). Frasco 1 foi semeado com 7,52 mL de 0,088 semente de MOI; frasco 2 foi semeado com 3,01 mL de 0,36 semente de MOI; frasco 3 foi semeado com 1,5 mL de 0,18 semente de MOI; e frasco 4 foi semeado com 0,75 mL de 0,09 semente de MOI. Um fluxograma esquemático ilustrando as etapas básicas usado para construir um baculovírus recombinante de ORF2 de PCV2 é fornecido aqui como Figura 1.

[0086] Após serem semeados com o baculovírus, os frascos foram depois incubados a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 7 dias e foram também agitados a 100 rpm durante aquele tempo. Os frascos usaram tampas ventiladas para permitir fluxo de ar. As amostras de cada frasco foram tiradas a cada 24 horas durante os próximos 7 dias. Após extração, cada amostra foi centrifugada, e o pélete e o sobrenadante foram separados e depois microfiltrados através de uma membrana de tamanho de poro de 0,45-1,0 μm .

[0087] As amostras resultantes depois tiveram a quantidade de ORF2 presente dentro delas quantificada por meio de um ensaio de ELISA. O ensaio de ELISA foi conduzido com Prot. G purificada de IgG de Pab de anti-PCV2 suíno de anticorpo (diluída 1:250 em PBS) diluída a 1:6000 em 0,05M de tampão de Carbonato (pH 9,6). 100 μL do anticorpo foram depois colocados nas cavidades da placa de microtitulação, vedados e incubados durante a noite a 37°C . A placa foi depois lavada três vezes com uma solução de lavagem compreendendo 0,5

mL de Tween 20 (Sigma, St., Louis, MO), 100 mL de 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) e 899,5 mL de água destilada. Subsequentemente, 250 µl de uma solução de bloqueio (5 g de Leite não-desnatado Carnation (Nestle, Glendale, CA) em 10 mL de D-PBS QS a 100 mL com água destilada) foram adicionados a cada uma das cavidades. A próxima etapa foi lavar a placa de teste e depois adicionar antígeno pré-diluído. O antígeno pré-diluído foi produzido adicionando 200 µl de solução de diluente (0,5 mL de Tween 20 em 999,5 mL de D-PBS) a cada uma das cavidades em uma placa de diluição. A amostra foi depois diluída a uma razão de 1:240 e uma razão de 1:480, e 100 µl de cada uma destas amostras diluídas foram depois adicionados a uma das cavidades de topo na placa de diluição (isto é, uma cavidade de topo recebeu 100 µl da diluição 1 :240 e o outro recebeu 100 µl da diluição 1:480). Diluições seriais foram depois feitas para o restante da placa removendo 100 µl de cada cavidade sucessiva e transferindo-os para a próxima cavidade na placa. Cada cavidade foi misturada antes de fazer a próxima transferência. A lavagem da placa de teste incluiu lavar a placa três vezes com o tampão de lavagem. A placa foi depois vedada e incubada durante uma hora a 37° C antes de ser lavada três vezes mais com o tampão de lavagem. O anticorpo de detecção usado foi anticorpo monoclonal para ORF2 de PCV. Foi diluído a 1:300 em solução de diluente, e 100 µl do anticorpo de detecção diluído foram depois adicionados as cavidades. A placa foi depois vedada e incubada durante uma hora a 37° C antes de ser lavada três vezes com o tampão de lavagem. Diluente conjugado foi depois preparado adicionando soro de coelho normal (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) à solução de diluente para 1 % de concentração. Anticorpo conjugado cabra anticamundongo (H+1)-HRP (Jackson Immunoresearch) foi diluído no diluente conjugado a 1:10.000, 100 µl do anticorpo conjugado diluído foram depois adicionados a cada uma das cavidades. A

placa foi depois vedada e incubada durante 45 minutos a 37° C antes de ser lavada três vezes com o tampão de lavagem. 100 µl de substrato (TMB Peroxidase Substrate, Kirkgaard e Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), misturados com um volume igual de Substrato de Peroxidase B (KPL) foram adicionados a cada uma das cavidades. A placa foi incubada em temperatura ambiente durante 15 minutos. 100 µl de 1 N de solução de HCl foram depois adicionados a cada uma das cavidades para parar a reação. A placa foi depois passada em uma leitora de ELISA. Os resultados deste ensaio estão fornecidos na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1

Dia	Frasco	ORF2 em pélete (µg)	ORF2 em 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

Dia	Frasco	ORF2 em pélete (μg)	ORF2 em sobrenadante (μg)
7	2	12,09	190
7	3	15,84	158
7	4	15,19	152

[0088] Estes resultados indicam que quando o tempo de incubação for estendido, expressão de ORF2 no sobrenadante das células centrifugadas e meio é maior que a expressão no pélete das células centrifugadas e meio. Consequentemente, permitindo a expressão de ORF2 prosseguir por pelo menos 5 dias e restabelecendo-a no sobrenadante ao invés de permitir a expressão prosseguir por menos de 5 dias e restabelecendo ORF2 das células, fornece um grande aumento no rendimento de ORF2, e uma melhoria significativa sobre os métodos anteriores.

Exemplo 2

[0089] Este exemplo fornece dados sobre a eficácia da invenção reivindicada aqui. Um frasco *spinner* de 1000 mL foi semeado com aproximadamente 10×10^6 células/ml de Sf+ em 300 mL de meio de Excell 420. O frasco foi depois incubado a 27° C e agitado a 100 rpm. Subsequentemente, o frasco foi semeado com 10 ml de semente de vírus de ORF2 de PCV2/Bac p+6 (o baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2 passado 6 vezes adicionais nas células de inseto de Sf9) com um 0,1 MOI após 24 horas de incubação.

[0090] O frasco foi depois incubado a 27° C para um total de 6 dias. Após incubação, o frasco foi depois centrifugado e três amostras foram colhidas do sobrenadante resultante e inativadas. O sobrenadante foi inativado trazendo sua temperatura para $37 \pm 2^\circ \text{C}$. Para a primeira amostra, uma solução de 0,4 M de hidrobrometo de 2-bromoetilenoamina que tinham sido ciclizado a 0,2 M de etilenonimina binária (BEI) em 0,3 N de NaOH é adicionada ao sobrenadante para

dar uma concentração final de BEI de 5 mM. À segunda amostra, 10 mM de BEI foram adicionados ao sobrenadante. À terceira amostra, nenhuma BEI foi adicionada ao sobrenadante. As amostras foram depois agitadas continuamente por 48 h. Uma solução a 1,0 M de tiosulfato de sódio para dar uma concentração mínima final de 5 mM foi adicionada para neutralizar qualquer BEI residual. A quantidade de ORF2 em cada amostra foi depois quantificada usando o mesmo procedimento de ensaio de ELISA como descrito no Exemplo 1. Os resultados deste podem ser vistos na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2

Amostra	ORF2 em sobrenadante (µg)
1	78,71
2	68,75
3	83,33

[0091] Este exemplo demonstra que neutralização com BEI não remove ou degrada quantidades significativas do produto de proteína de ORF2 de PCV2 recombinante. Isto é comprovado pelo fato que não há nenhuma perda grande de ORF2 no sobrenadante da BEI ou temperaturas elevadas. Aqueles versados na técnica reconhecerão que a ORF2 restabelecida é um produto de proteína estável.

Exemplo 3

[0092] Este exemplo demonstra que a presente invenção é escalável de produção de escala pequena de ORF2 de PCV2 recombinante para produção em grande escala de ORF2 de PCV2 recombinante. 5,0 x 10⁵ células/ml de células de SF+/ml em 7000 mL de meio de ExCell 420 foram plantadas em um Biorreator de 20000 mL Applikon. O meio e células foram depois incubados a 27° C e agitados a 100 RPM durante as próximas 68 horas. Na 68ª hora, 41,3 mL de Baculovírus de ORF2 de PCV2 MSV+3 foram adicionados a 7000 mL de meio de Ex-Cell 420. A mistura resultante foi depois adicionada ao biorreator. Du-

rante os próximos sete dias, a mistura foi incubada a 27° C e agitada a 100 RPM. As amostras do biorreator foram extraídas a cada 24 horas começando no dia 4, pós-infecção, e cada amostra foi centrifugada. O sobrenadante das amostras foi preservado e a quantidade de ORF2 foi depois quantificada usando densitometria de SDS-PAGE. Os resultados deste podem ser vistos na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3

Dia após infecção	ORF2 em sobrenadante (µg/mL)
4	29,33
5	41,33
6	31,33
7	60,67

Exemplo 4

[0093] Este exemplo testa a eficácia de sete vacinas de PCV2 candidatas e também define parâmetros de eficácia seguindo exposição a uma cepa virulenta de PCV2. Cem e oito (108) leitões privados de colostro derivado de cesárea (CDCD), 9-14 dias de idade, foram divididos fortuitamente em 9 grupos de tamanho igual. Tabela 4 expõe o Projeto de Estudo Geral para este Exemplo.

Tabela 4. Projeto de Estudo Geral

Grupo	Nº de porcos	Tratamento	Dia de tratamento	KLH/IC F A no dia 21 e dia 27	Desafio com PCV2 virulento no dia 24	Ne-crop-sia no dia 49
1	12	Vacina de PCV2 Nº 1 (vORF2 16 µg)	0	+	+	+
2	12	Vacina de PCV2 Nº 2 (vORF2 8	0	+	+	+

Grupo	Nº de porcos	Tratamento	Dia de tratamento	KLH/IC F A no dia 21 e dia 27	Desafio com PCV2 virulento no dia 24	Ne-crop-sia no dia 49
		αg)				
3	12	Vacina de PCV2 Nº 3 (vORF2 4 αg)	0	+	+	+
4	12	Vacina de PCV2 Nº 4 (rORF2 16 αg)	0	+	+	+
5	12	Vacina de PCV2 Nº 5 (rORF2 8 αg)	0	+	+	+
6	12	Vacina de PCV2 Nº 6 (rORF2 4 αg)	0	+	+	+
7	12	Vacina de PCV2 Nº 7 (morto vírus de célula inteira)	0	+	+	+
8	12	Nenhum - controles de desafio	N/A	+	+	+
9	12	Nenhum – grupo de controle negativo rígido	N/A	+	-	+

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; morto vírus de célula inteira = vírus de PCV2 crescendo em cultura de célula adequada

[0094] Sete dos grupos (Grupos 1 - 7) receberam doses de polipeptídeo de ORF2 de PCV2, um dos grupos agiu como um controle de desafio e não recebeu nenhuma ORF2 de PCV2, e outro grupo agiu como o grupo de controle negativo rígido e também não recebeu nenhuma ORF2 de PCV2. No Dia 0, Grupos 1 a 7 foram tratados com vacinas atribuídas. Leitões no Grupo 7 foram dados um tratamento de reforço no Dia 14. Leitões foram observados para eventos adversos e reações do sítio de injeção seguindo vacinação e no Dia 19, os leitões foram movidos para o segundo sítio de estudo. No segundo sítio de estudo, Grupos 1-8 foram alojados em uma estrutura enquanto o Grupo 9 foi alojado em uma estrutura separada. Todos os porcos receberam hemocianina de lapa (KLH)/adjuvante incompleto de Freund (ICFA) nos Dias 21 e 27 e no Dia 24. Grupos 1-8 foram desafiados com um PCV2 virulento.

[0095] Pré e pós-desafio, amostras de sangue foram colhidas para sorologia de PCV2. Pós-desafio, dados de peso do corpo para determinação de ganho de peso diário médio (ADWG), e sintomas clínicos, como também amostras de chumaços nasais para determinar proteção nasal contra PCV2, foram colhidos. No Dia 49, todos porcos sobreviventes foram submetidos à necropsia, pulmões foram registrados para lesões e tecidos selecionados foram preservados em formalina para teste de Imunoistoquímica (IHC) em uma data posterior.

Materiais e Métodos

[0096] Este foi um estudo de viabilidade de vacinação-desafio parcialmente cego conduzido em porcos de CDCD, 9 a 14 dias de idade no Dia 0. A ser incluído no estudo, titulações de IFA de PCV2 de porcas foram $\leq$ 1:1000. Adicionalmente, os estados sorológicos das porcas foram de um rebanho negativo de PRRS conhecido. Vinte e oito (28) porcas foram testadas para estado sorológico de PCV2. Quatorze (14) porcas

tiveram uma titulação de PCV2 de ≤ 1000 e foram transferidas para o primeiro sítio de estudo. Cento e dez (110) leitões foram liberados através de cirurgias de parto cesariano e estavam disponíveis para este estudo no Dia -4. No Dia -3, 108 porcos de CDCD no primeiro sítio de estudo foram pesados, identificados com marcadores de orelha, bloqueados em peso e fortuitamente atribuídos a 1 de 9 grupos, como exposto acima na tabela 4. Se qualquer animal de teste satisfazendo os critérios de inclusão fosse inscrito no estudo e fosse excluído depois por qualquer razão, o Investigador e Monitor consultaria a fim de determinar o uso de dados colhidos do animal na análise final. Os dados deste leitão inscrito foram excluídos e a razão para exclusão foi documentada. Inicialmente, nenhuma porca foi excluída. Um total de 108 de 110 porcos disponíveis foi atribuído fortuitamente a um dos 9 grupos no Dia -3. Os dois porcos menores (No. 17 e 19) não foram atribuídos a um grupo e estavam disponíveis como suplementares, se necessário. Durante o curso do estudo, vários animais foram removidos. Porco 82 (Grupo 9) no Dia -1, Porco No. 56 (grupo 6) no Dia 3, Porco No. 53 (grupo 9) no Dia 4, Porco No. 28 (grupo 8) no Dia 8, Porco No. 69 (grupo 8) no Dia 7, e Porco No. 93 (grupo 4) no Dia 9, foram cada um encontrados mortos antes do desafio. Estes seis porcos não foram incluídos nos resultados do estudo final. Porco no 17 (um dos porcos extras) foi atribuído ao Grupo 9. O porco extra restante, No. 19, foi excluído do estudo.

[0097] As formulações dadas a cada um dos grupos foram como segue: Grupo 1 foi projetado para administrar 1 ml de ORF2 viral (vORF2) contendo 16 μg de ORF2/ml. Isto foi feito misturando 10,24 ml de ORF2 viral (256 $\mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 10,24 \text{ ml de vORF2}$) com 3,2 ml de 0,5 % de Carbopol e 2,56 ml de solução salina de fosfato tamponada a um pH de 7,4. Isto produziu 16 ml de formulação para o grupo 1. O Grupo 2 foi projetado para administrar 1 mL de vORF2 contendo 8

μg de vORF2/ml. Isto foi feito misturando 5,12 ml de vORF2 ($128 \mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 5,12 \text{ ml de vORF2}$) com 3,2 ml de 0,5 % de Carbopol e 7,68 ml de solução salina de fosfato tamponada a um pH de 7,4. Isto produziu 16 ml de formulação para o grupo 2. Grupo 3 foi projetado para administrar 1 mL de vORF2 contendo $4 \mu\text{g}$ de vORF2/ml. Isto foi feito misturando 2,56 ml de vORF2 ($64 \mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 2,56 \text{ ml de vORF2}$) com 3,2 ml de 0,5 % de Carbopol e 10,24 ml de solução salina de fosfato tamponada a um pH de 7,4. Isto produziu 16 ml de formulação para o grupo 3. Grupo 4 foi projetado para administrar 1 mL de ORF2 recombinante (rORF2) contendo $16 \mu\text{g}$ de rORF2/ml. Isto foi feito misturando 2,23 ml de rORF2 ($512 \mu\text{g}/230 \mu\text{g}/\text{ml} = 2,23 \text{ ml de rORF2}$) com 6,4 ml de 0,5 % de Carbopol e 23,37 ml de solução salina de fosfato tamponada a um pH de 7,4. Isto produziu 32 ml de formulação para o grupo 4. Grupo 5 foi projetado para administrar 1 mL de rORF2 contendo $8 \mu\text{g}$ de rORF2/ml. Isto foi feito misturando 1,11 ml de rORF2 ($256 \mu\text{g}/230 \mu\text{g}/\text{ml} = 1,11 \text{ ml de rORF2}$) com 6,4 ml de 0,5 % de Carbopol e 24,49 ml de solução salina de fosfato tamponada a um pH de 7,4. Isto produziu 32 ml de formulação para o grupo 5. Grupo 6 foi projetado para administrar 1 mL de rORF2 contendo $8 \mu\text{g}$ de rORF2/ml. Isto foi feito misturando 0,56 ml de rORF2 ($128 \mu\text{g}/230 \mu\text{g}/\text{ml} = 0,56 \text{ ml de rORF2}$) com 6,4 ml de 0,5 % de Carbopol e 25,04 ml de solução salina de fosfato tamponada a um pH de 7,4. Isto produziu 32 ml de formulação para o grupo 6. Grupo 7 foi projetado para administrar 2 ml de vacina de célula morta inteira de PCV2 (PCV2 KV) contendo MAX PCV2 KV. Isto foi feito misturando 56 ml de PCV2 KV com 14 ml de 0,5 % de Carbopol. Isto produziu 70 ml de formulação para o grupo 7. Por fim grupo 8 foi projetado para administrar KLH a $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ou $1,0 \mu\text{g}/\text{ml}$ por dose de 2 ml. Isto foi feito misturando 40,71 ml de KLH ($7,0 \mu\text{g de proteína}/\text{ml a } 0,5 \mu\text{g}/\text{ml} = 570 \text{ ml } (7,0 \mu\text{g}/\text{ml})(x) = (0,5)(570 \text{ ml}))$), 244,29 ml de solução salina de fosfato tamponada a um pH de 7,4, e

285 ml de adjuvante de Freund. Tabela 5 descreve os prazos para as atividades fundamentais deste Exemplo.

Tabela 5. Atividades do estudo

Dia do estudo	Atividade do estudo
-4, 0 a 49	Observações gerais para sintomas de saúde e clínicos gerais
-3	Pesados; Randomizado em grupos; Colhidas amostras de sangue de todos os porcos
0	Examinação de saúde; Administrado IVP Nos. 1-7 para Grupos 1-7, respectivamente
0-7	Observados leitões para reações do sítio de injeção
14	Grupo reforçado 7 com vacina de PCV2 No. 7; amostra de sangue de todos os porcos
14-21	Observado Grupo 7 para reações do sítio de injeção
16-19	Tratados todos porcos com antibióticos (dados perdidos)
19	Porcos transportados do primeiro sítio de teste para um segundo sítio de teste
21	Grupos tratados 1-9 com KLH/ICFA
24	Colhidas amostras de sangue e de chumaço nasal de todos os porcos; Pesados todos os porcos; Desafiados Grupos 1-8 com material de desafio de PCV2
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47	Colhidas as amostras de chumaço nasal de todos os porcos
27	Tratados os Grupos 1-9 com KLH/ICFA
31	Colhidas as amostras de sangue de todos os porcos
49	Colhidas as amostras de sangue e de chumaço nasal

Dia do estudo	Atividade do estudo
	de todos os porcos; Pesados todos os porcos; Submetidos à necropsia todos os porcos; Lesões grandes observadas com ênfase dada às úlceras icterícias e gástricas; Pulmões avaliados para lesões; Amostras de tecido frescas e fixas em formalina salvas; Fase em-vida do estudo completada.

[0098] Seguindo conclusão da fase em-vida do estudo, tecidos fixos em formalina examinados por Imunoistoquímica (IHC) para detecção de antígeno de PCV2 por um patologista, amostras de sangue foram avaliadas para sorologia de PCV2, amostras de chumaço nasal foram avaliadas para proteção contra PCV2 e ganho de peso diário médio (ADWG) foi determinado do Dia 24 ao Dia 49.

[0099] Animais foram alojados no primeiro sítio de estudo em gaiolas de indivíduo em cinco quartos do nascimento a aproximadamente 11 dias de idade (aproximadamente Dia 0 do estudo). Cada quarto era idêntico em layout e consistiu em gaiolas de aço inoxidável individuais empilhadas com ar aquecido e filtrado provido separadamente a cada unidade de isolamento. Cada quarto tinha calor e ventilação separados, assim impedindo contaminação secundária de ar entre os quartos. Os animais foram alojados em duas estruturas diferentes no segundo sítio de estudo. Grupo 9 (O grupo de controle negativo rígido) foi alojado separadamente em uma estrutura de acabamento convertida e Grupos 1-8 foram alojados em estrutura de berçário convertida. Cada grupo foi alojado em um chiqueiro separado (11-12 porcos por chiqueiro) e cada chiqueiro forneceu aproximadamente 0,279 m² (3,0 pés quadrados) por porco. Cada chiqueiro estava em um assoalho elevado com chãos com ripas de plástico. Uma cavidade abaixo dos chiqueiros serviu como um tanque de contenção para excremento e restos. Cada estrutura

tinha seus próprios sistemas de aquecimento e de ventilação separados, com pouca probabilidade de contaminação secundária de ar entre as estruturas.

[00100] No primeiro sítio de estudo, leitões foram alimentados com uma ração de leite especialmente formulada do nascimento até aproximadamente 3 semanas de idade. Todos os leitões estavam consumindo ração misturada especial sólida pelo Dia 19 (aproximadamente 4 ½ semanas de idade). No segundo sítio de estudo, todos os leitões foram alimentados com uma ração de mistura comercial não-medicativa de costume apropriada para sua idade e peso, ad libitum. Água em ambos os sítios de estudo estava também disponível ad libitum.

[00101] Todos os porcos de teste foram tratados com Vitamina E no Dia -2, com injeções de ferro no Dia -1 e com NAXCEL® (1,0 ml, IM, em coxas revezadas) nos Dias 16, 17, 18 e 19. Além disso, Porco No. 52 (grupo 9) foi tratado com uma injeção de ferro no Dia 3, Porco 45 (Grupo 6) foi tratado com uma injeção de ferro no Dia 11, Porco No. 69 (grupo 8) foi tratado com NAXCEL® no Dia 6, Porco No. 74 (grupo 3) foi tratado com dexametazona e penicilina no Dia 14 e Porco No. 51 (grupo 1) foi tratado com dexametazona e penicilina no Dia 13 e com NAXCEL® no Dia 14 por várias razões de saúde.

[00102] Durante em ambos os sítios de estudo, os porcos estavam sob cuidado veterinário. Exames de saúde dos animais foram conduzidos no Dia 0 e foram registrados no Formulário de Registro de Exame de Saúde. Todos os animais estavam em estado saúde e nutricional bom antes da vacinação como determinado por observação no Dia 0. Todos os animais testados foram observados estar em estado de saúde e nutricional bom antes do desafio. Carcaças e tecidos foram descartados mediante farinação. Descarte final dos animais de estudo foi registrado no Registro de Disposição do Animal.

[00103] No Dia 0, os porcos atribuídos aos Grupos 1-6 receberam 1,0 ml de Vacinas de PCV2 1-6, respectivamente, IM na região esquerda do pescoço usando uma seringa de trava Luer estéril de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x 1,27 cm (20g x ½"). Porcos atribuídos ao Grupo 7 receberam 2,0 ml de Vacina de PCV2 No. 7 IM na região esquerda do pescoço usando uma seringa de trava Luer estéril de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x 1,27 cm (20g x ½"). No Dia 14, os porcos atribuídos ao Grupo 7 receberam 2,0 ml de Vacina de PCV2 No. 7 IM na região esquerda do pescoço usando uma seringa de trava Luer estéril de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x 1,27 cm (20g x ½").

[00104] No Dia 21 todos os porcos de teste receberam 2,0 ml de KLH/ICFA IM na região direita da coxa usando uma seringa de trava Luer estéril de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x ½" (20g x 1,27 cm). No Dia 27 todos os porcos de teste receberam 2,0 ml de KLH/ICFA na região esquerda da coxa usando uma seringa de trava Luer estéril de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x ½" (20g x 1,27 cm).

[00105] No Dia 24, porcos atribuídos a Grupos 1-8 receberam 1,0 ml de PCV2 ISUVDL desafio material (5,11 log₁₀ TCID₅₀/mL) EVI na região esquerda do pescoço usando uma seringa de trava Luer estéril de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x 1,27 cm (20g x ½"). Um adicional de 1,0 ml do mesmo material foi administrado IN a cada porco (0,5 ml por narina) usando uma seringa de trava Luer estéril de 3,0 ml e uma cânula nasal.

[00106] Os porcos de teste foram observados diariamente para saúde geral e eventos adversos no Dia -4 e do Dia 0 ao Dia 19. Observações foram registradas no Registro de Observação Clínica. Todos os porcos de teste foram observados do Dia 0 ao Dia 7, e o Grupo 7 foi também observado do Dia 14 a 21, para reações do sítio de injeção. Ganho de peso diário médio foi determinado pesando cada porco em uma escala calibrada nos Dias -3, 24 e 49, ou no dia que um porco foi

encontrado morto após o desafio. Os pesos do corpo foram registrados no Formulário de Peso do Corpo. Dia -3 os pesos do corpo foram utilizados para bloquear os porcos antes da randomização. Dados de peso do Dia 24 e Dia 49 foram utilizados para determinar o ganho de peso diário médio (ADWG) para cada porco durante estes pontos de tempo. Para porcos que morreram após desafio e antes do Dia 49, o ADWG foi determinado para representar o ADWG do Dia 24 até o dia da morte.

[00107] Sangue total venoso foi colhido de cada leitão do seio venoso orbital nos Dias -3 e 14 para determinar sorologia de PCV2. Para cada leitão, o sangue foi colhido do seio venoso orbital inserindo um tubo capilar estéril no canto mediano de um dos olhos e escoando aproximadamente 3,0 ml de sangue total em um Tubo Separador de Soro de 4,0 ml (SST). Nos Dias 24, 31 e 49, sangue total venoso de cada porco foi colhido da cava da veia anterior usando uma agulha estéril de 18g x 38,1 mm (18g x 1 ½") Vacutainer (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey), um retentor de agulha Vacutainer e um SST de 13 ml. Coletas de sangue em cada ponto de tempo foram registradas no Registro de Coleta de Amostra. Sangue em cada SST foi deixado coagular, cada SST foi depois girado e o soro colhido. Soro colhido foi transferido para um tubo de pressão estéril e armazenado a $-70 \pm 10^{\circ}$ C até testado em uma data posterior. As amostras de soro foram testadas para a presença de anticorpos de PCV2 através de pessoal de BIVI-R&D.

[00108] Os porcos foram observados uma vez diariamente do Dia 20 ao Dia 49 para sintomas clínicos e observações clínicas foram registradas no Registro de Observação Clínica.

[00109] Para testar para proteção nasal contra PCV2, nos Dias 24, 25, e depois a cada dois dias pares de estudo até e incluindo o Dia 49, um chumaço de Dacron estéril foi inserido intra nasalmente dentro da

narina esquerda ou direita de cada porco (um chumaço por porco) tão assepticamente quanto possível, assoprado durante alguns segundos e depois removido. Cada chumaço foi depois colocado em um tubo de tampa sob pressão estéril simples contendo 1,0 ml de meios de EMEM com 2 % de IFBS, 500 unidades/mL de Penicilina, 500 µg/mL de Estreptomicina e 2,5 µg/mL de Fungizona. O chumaço foi rompido dentro do tubo, e o tubo de pressão foi vedado e apropriadamente marcado com número do animal, número de estudo, data de coleta, dia do estudo e "chumaço nasal". Os tubos de pressão vedados foram armazenados a $-40 \pm 10^{\circ}$ C até transportados durante a noite em gelo para BIVI-St. Joseph. As coletas de chumaço nasal foram registradas no Formulário de Coleta de Amostra de Chumaço Nasal. BIVI-R&D conduziu isolamento de vírus quantitativo (VI) testando para PCV2 em amostras de chumaço nasal. Os resultados foram expressos em valores de $\log_{10}$. Um valor de 1,3 log ou menos foi considerado negativo e qualquer valor maior que 1,3 log foi considerado positivo.

[00110] Porcos que morreram (Nos. 28, 52, 56, 69, 82 e 93) no primeiro sítio de estudo foram submetidos à necropsia ao nível necessário para determinar uma diagnose. Quaisquer lesões graves foram registradas e nenhum tecido foi retido destes porcos. No segundo sítio de estudo, os porcos que morreram antes do Dia 49 (Nos. 45, 23, 58, 35), porcos encontrados mortos no Dia 49 antes da eutanásia (Nos. 2, 43) e porcos eutanisados no Dia 49 foram submetidos à necropsia. Quaisquer lesões graves foram observadas e as porcentagens dos lóbulos pulmonares com lesões foram registradas no Formulário de Relatório de Necropsia.

[00111] De cada um dos 103 porcos submetidos à necropsia no segundo sítio de estudo, uma amostra de tecido da amígdala, pulmão, coração, fígado, linfonodo mesentérico, rim e linfonodo inguinal foi colocada em um recipiente simples tamponado com 10 % de formalina;

enquanto outra amostra de tecido dos mesmos órgãos acima mencionados foi colocada em um Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK) e cada Whirl-pak foi colocado em gelo. Cada recipiente foi corretamente marcado. As coletas de amostra foram registradas no Formulário de Relatório de Necropsia. Depois, as amostras de tecido fixadas em formalina e um Formulário de Solicitação do Diagnóstico foram submetidos para teste de IHC. Teste de IHC foi conduzido de acordo com procedimentos laboratoriais de ISU padrão para receber amostras, preparação da amostra e da lâmina e técnicas de tingimento. Os tecidos frescos em Whirl-paks foram transportados com sacos de gelo para o Monitor do Estudo para armazenamento ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ} \text{ C}$) e possível uso futuro. Tecidos fixos em formalina foram examinados por um patologista para detecção de PCV2 por IHC e classificados usando o sistema de contagem a seguir: 0 = Nenhum; 1 = tingimento positivo escasso, poucos sítios; 2 = tingimento positivo moderado, sítios múltiplos; e 3 = tingimento positivo abundante, difuso ao longo do tecido. Devido ao fato que o patologista não pôde positivamente diferenciar LN inguinal de LN mesentérico, resultados para estes tecidos foram simplesmente marcados como Linfonodo e a classificação dada a classificação mais alta para cada um dos dois tecidos por animal.

Resultados

[00112] Resultados para este exemplo são dados abaixo. É observado que um porco do Grupo 9 morreu antes do Dia 0, e 5 mais porcos morreram pós-vacinação (1 porco do Grupo 4; 1 porco do Grupo 6; 2 porcos do Grupo 8; e 1 porco do Grupo 9). Autópsia indicou todos os seis morreram devido a infecções subjacentes que não estavam associadas à vacinação ou PMWS. Adicionalmente, nenhum evento adverso ou reações do sítio de injeção foram observadas com qualquer grupo.

[00113] Resultados de ganho de peso diário médio (ADWG) são

apresentados abaixo na Tabela 6. Grupo 9, o grupo de controle negativo rígido, teve o ADWG mais alto $480,80 \pm 77,11$ g/dia ($1,06 \pm 0,17$ lb/dia), seguido pelo Grupo 5 $426,37 \pm 99,79$ g/dia ($0,94 \pm 0,22$ lb/dia), que recebeu uma dose de 8 µg de rORF2. Grupo 3, que recebeu uma dose de 4 µg de vORF2, teve o ADWG mais baixo $222,26 \pm 95,25$ g/dia ($0,49 \pm 0,21$ lb/dia), seguido pelo Grupo 7 $226,79 \pm 68,03$ g/dia ($0,50 \pm 0,15$ lb/dia), que recebeu 2 doses de vacina morta.

Tabela 6. Sumário do ganho de peso diário médio do grupo (ADWG)

Grupo	Tratamento	N	ADWG – g/dia (lb/dia) (Dia 24 ao Dia 49) ou ajustado para porcos mortos antes do Dia 29
1	vORF2 – 16 µg (1 dose)	12	$394,65 \pm 131,54$ g/dia ($0,87 \pm 0,29$ lb/dia)
2	vORF2 – 8 µg (1 dose)	12	$317,51 \pm 145,15$ g/dia ($0,70 \pm 0,32$ lb/dia)
3	vORF2 – 4 µg (1 dose)	12	$222,26 \pm 95,25$ g/dia ($0,49 \pm 0,21$ lb/dia)
4	rORF2 – 16 µg (1 dose)	11	$381,01 \pm 136,07$ g/dia ($0,84 \pm 0,30$ lb/dia)
5	rORF2 – 8 µg (1 dose)	12	$426,37 \pm 99,79$ g/dia ($0,94 \pm 0,22$ lb/dia)
6	rORF2 – 4 µg (1 dose)	11	$326,58 \pm 113,39$ g/dia ($0,72 \pm 0,25$ lb/dia)
7	KV (2 doses)	12	$226,79 \pm 68,03$ g/dia ($0,50 \pm 0,15$ lb/dia)
8	controles de desafio	10	$344,73 \pm 86,18$ g/dia ($0,76 \pm 0,19$ lb/dia)
9	controles negativos rígidos	11	$480,80 \pm 77,11$ g/dia ($1,06 \pm 0,17$ lb/dia)

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculoví-

rus recombinante; vírus de célula inteira morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada.

[00114] Os resultados da sorologia de PCV2 são apresentados na Tabela 7. Todos os nove grupos foram soronegativos para PCV2 no Dia -3. No Dia 14, os Grupos recebendo vacinas de vORF2 tiveram as titulações mais altas, que variaram de 187,5 a 529,2. Porcos recebendo vacina viral morta tiveram as próximas titulações mais altas, seguidos pelos grupos recebendo vacinas de rORF2. Grupos 8 e 9 permaneceram soronegativos nesta hora. No Dia 24 e Dia 31, os porcos recebendo vacinas de vORF2 continuaram demonstrando uma resposta sorológica forte, seguido estritamente pelo grupo que recebeu duas doses de uma vacina viral morta. Porcos recebendo vacinas de rORF2 foram mais lentos para responder sorologicamente e os Grupos 8 e 9 continuaram permanecendo soronegativos. No Dia 49, os porcos recebendo vacina de vORF2, 2 doses da vacina viral morta e a dose de rORF2 mais baixa demonstraram as respostas sorológicas mais fortes. Porcos recebendo 16 µg e 8 µg de vacinas de rORF2 tiveram titulações de IFA ligeiramente mais altas que os controles de desafio. Grupo 9 no Dia 49 demonstrou uma resposta sorológica forte.

Tabela 7. Sumário das titulações de IFA de PCV2 do grupo

Titulação de IFA Média

Grupo	Tratamento	Dia-3	Dia-14	Dia-24	Dia-31**	Dia-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

	dose)					
5	rORF2-8 α g (1 dose)	50,0	75,0	887,5	2266,7	7416,7
6	rORF2-4 α g (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	controles de desafio	50,0	55,0	50,0	50,0	5433,3
9	controles negativos rígidos	50,0	59,1	59,1	54,5	6136,4

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

* Para propósitos de cálculo, uma titulação de IFA de ≤ 100 foi designada como uma titulação de "50"; uma titulação de IFA de ≥ 6400 foi designada como uma titulação de "12.800".

** Dia do Desafio

*** Dia da Necropsia

[00115] Os resultados das observações clínicas pós-desafio são apresentados abaixo na Tabela 8. Este sumário de resultados inclui observações para Comportamento Anormal, Respiração Anormal, Tosse e Diarréia. Tabela 9 inclui os resultados do Sumário da Incidência Geral no Grupo de Sintomas Clínicos e Tabela 10 inclui resultados do Sumário das Taxas de Mortalidade do Grupo Pós-desafio. O sintoma clínico mais comum observado neste estudo foi comportamento anormal que foi registrado como letargia moderada a severa. Porcos recebendo as 2 doses mais baixas de vORF2, porcos recebendo 16 μ g de rORF2 e porcos recebendo 2 doses de vacina de KV tiveram taxas de incidência de $\geq 27,3$ %. Porcos recebendo 8 μ g de rORF2 e o grupo de controle negativo rígido não tiveram nenhum comportamento anor-

mal. Nenhum dos porcos neste estudo demonstrou qualquer respiração anormal. Tosse foi frequentemente observada em todos os grupos (0 a 25 %), como também diarreia (0-20 %). Nenhum dos sintomas clínicos observados foi patognômico para PMWS.

[00116] A incidência geral de sintomas clínicos variou entre os grupos. Grupos recebendo quaisquer das vacinas de vORF2, o grupo recebendo 16 µg de rORF2, o grupo recebendo 2 doses de vacina de KV e o grupo de controle de desafio tiveram a incidência mais alta de sintomas clínicos gerais ($\geq 36,4$ %). O grupo de controle negativo rígido, o grupo recebendo 8 µg de rORF2 e o grupo recebendo 4 µg de rORF2 tiveram taxas de incidência gerais de sintomas clínicos de 0 %, 8,3 % e 9,1 %, respectivamente.

[00117] Taxas de mortalidade gerais entre os grupos variaram também. O grupo recebendo 2 doses de vacina de KV teve a taxa de mortalidade mais alta (16,7 %); enquanto os grupos que receberam 4 µg de vORF2, 16 µg de rORF2 ou 8 µg de rORF2 e o grupo de controle negativo rígido todos tiveram taxas de mortalidade 0 %.

Tabela 8. Sumário das observações do grupo para comportamento anormal, respiração anormal, tosse e diarreia

grupo	tratamento	N	Comportamento anormal ¹	Comportamento anormal ²	Tosse ³	Diarreia 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 α g (1 dose)	11	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	1/11 (0%)	2/11 (18,2%)
5	rORF2 – 8 α g (1 dose)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)
6	rORF2 – 4 α g (1 dose)	11	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	1/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 doses)	12	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)
8	controles de desafio	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	controles negativos rígidos	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

¹ Número total de porcos em cada grupo para que demonstrou qualquer comportamento anormal por menos um dia

² Número total de porcos em cada grupo que demonstraram qualquer respiração anormal por pelo menos um dia

³ Número total de porcos em cada grupo que demonstraram uma tosse por pelo menos um dia

⁴ Número total de porcos em cada grupo que demonstraram diarreia por pelo menos um dia

Tabela 9. Sumário da Incidência Geral do Grupo de Sintomas Clínicos

Grupo	Tratamento	N	Incidência de porcos com sintomas clínicos ¹	Taxa de incidência
1	vORF2-16 α g (1 dose)	12	5	41,7 %
2	vORF2-8 α g (1 dose)	12	5	41,7 %
3	vORF2-4 α g (1 dose)	12	8	66,7 %
4	rORF2-16 α g (1 dose)	11	4	36,4 %
5	rORF2-8 α g (1 dose)	12	1	8,3 %
6	rORF2-4 α (1dose)	11	1	9,1 %
7	KV (2 doses)	12	7	58,3 %
8	Controles de desafio	10	4	40 %
9	Controles negativos rígidos	11	0	0 %

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

¹ Número total de porcos em cada grupo que demonstraram qualquer sintoma clínico por pelo menos um dia

Tabela 10. Sumário das Taxas de mortalidade do Grupo Pós-desafio

Grupo	Tratamento	N	Morte pós-desafio	Taxa de mortalidade
1	vORF2 – 16 α g (1 dose)	12	1	8,3 %
2	vORF2 – 8 α g (1 dose)	12	1	8,3 %
3	vORF2 – 4 α g (1 dose)	12	0	0 %
4	rORF2 – 16 α g (1 dose)	11	0	0 %
5	rORF2 – 8 α g (1 dose)	12	0	0 %
6	rORF2 – 4 α g (1 dose)	11	1	9,1 %
7	KV (2 doses)	12	2	16,7 %

8	Controles de desafio	10	1	10 %
9	Controles negativos rígidos	11	0	0 %

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

[00118] Resultados de proteção nasal contra PCV2 são apresentados abaixo na Tabela 11. Seguindo desafio no Dia 24, 1 porco no Grupo 7 começou proteger-se contra PCV2 no Dia 27. Nenhum dos outros grupos experimentou proteção até Dia 33. O volume de proteção nasal foi observado do Dia 35 ao Dia 45. Grupos recebendo quaisquer das três vacinas de vORF2 e grupos recebendo 4 ou 8 µg de rORF2 tiveram a incidência de proteção nasal mais baixa de PCV2 ($\leq 9,1$ %). O grupo de controle de desafio (Grupo 8) teve a taxa de proteção mais alta (80 %), seguido pelo grupo de controle negativo rígido (Grupo 9) que teve uma taxa de incidência de 63,6 %.

Tabela 11. Sumário de incidência do grupo de proteção nasal contra PCV2

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que ficaram protegidos por pelo menos um dia	Taxa de incidência
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 α g (1 dose)	11	1	9,1 %
7	KV (2 doses)	12	5	41,7 %
8	Controles de desafio	10	8	80 %
9	Controles negativos rígidos	11	7	63,6 %

VORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

[00119] O Sumário de Incidência do Grupo de Icterícia, Incidência do Grupo de Úlceras gástricas, Contagens Médias de Lesões Pulmonares do Grupo e Incidência do Grupo de Lesões Pulmonares abaixo são mostrados abaixo na Tabela 12. Seis porcos morreram no primeiro sítio de teste durante a fase de pós-vacinação do estudo (Grupo 4, N=1; Grupo 6, N=1; Grupo 8, N=2; Grupo 9, N=2). Quatro entre seis porcos tiveram lesões fibrinosas em uma ou mais cavidades do corpo, um porco (Grupo 6) teve lesões consistentes com doença clostridial e um porco (Grupo 9) não teve nenhuma lesão grave. Nenhum dos porcos que morreram durante a fase pós-vacinação do estudo teve lesões consistentes com PMWS.

[00120] Porcos que morreram pós-desafio e porcos eutanisados no Dia 49 foram submetidos à necropsia. Na necropsia, icterícia e úlceras gástricas não estavam presentes em qualquer grupo. Com respeito a % média de lesões pulmonares, Grupo 9 teve a % média mais baixa de lesões pulmonares (0 %), seguido pelo Grupo 1 com $0,40 \pm 0,50$ % e Grupo 5 com $0,68 \pm 1,15$ %. Grupos 2, 3, 7 e 8 tiveram a % média mais alta de lesões pulmonares ($\geq 7,27$ %). Cada um destes quatro grupos continha um porco com % de lesões pulmonares $\geq 71,5$ %, que inclinaram os resultados mais altos para estes quatro grupos. Com a exceção do Grupo 9 com 0 % de lesões pulmonares observado, os 8 grupos restantes tiveram ≤ 36 %

de lesões pulmonares. Quase todas lesões pulmonares observadas foram descritas como vermelhas/roxas e consolidadas.

Tabela 12. Sumário de incidência de icterícia do grupo, incidência de úlceras gástricas do grupo, contagens de % média de lesões pulmonares do grupo e incidência de lesões pulmonares observadas do grupo

Gru- po	Tratamento	Icterícia	Úlceras gástri- cas	% média de lesões pulmona- res	Incidência de lesões pulmona- res obser- vadas
1	vORF2 – 16 α g (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,40 $\pm$ 0,50%	10/12 (83%)
2	vORF2 – 8 α g (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,41 $\pm$ 20,2%	10/12 (83%)
3	vORF2 – 4 α g (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	9,20 $\pm$ 20,9%	10/12 (83%)
4	rORF2 – 16 α g (1 dose)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	1,5 $\pm$ 4,74%	4/11 (36%)
5	rORF2 – 8 α g (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,68 $\pm$ 1,15%	9/12 (75%)
6	rORF2 – 4 α 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	Controles de desafio	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9,88 $\pm$ 29,2%	8/10 (80%)
9	Controles nega- tivos rígidos	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculoví-
rus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2

crescido em cultura de célula adequada

[00121] O Sumário dos Resultados de Incidência Positiva de IHC do Grupo na Tabela 13. Grupo 1 (vORF2 - 16 µg) e Grupo 5 (rORF2 - 8 µg) tiveram a taxa mais baixa de resultados positivos de IHC (16,7 %). Grupo 8 (Controles de Desafio) e Grupo 9 (Controles Negativos Rígidos) tiveram a taxa mais alta de resultados positivos de IHC, 90 % e 90,9 %, respectivamente.

Tabela 13. Sumário da taxa de incidência positiva de IHC do grupo

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que tiveram pelo menos um tecido positivo para PCV2	Taxa de incidência
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	Controles de desafio	10	9	90,0 %
9	Controles negativos rígidos	11	10	90,9 %

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

[00122] Pós-desafio, Grupo 5, que recebeu uma dose de 8 µg de

antígeno de rORF2, superou os outros 6 grupos de vacina. Grupo 5 teve o ADWG mais alto $426,37 \pm 99,79$ g/dia ($0,94 \pm 0,22$ lb/dia), a incidência mais baixa de comportamento anormal (0 %), a segunda incidência mais baixa de tosse (8,3 %), a incidência mais baixa de sintomas clínicos gerais (8,3 %), a taxa de mortalidade mais baixa (0 %), a taxa mais baixa de proteção nasal contra PCV2 (8,3 %), a segunda taxa mais baixa para % média de lesões pulmonares ($0,68 \pm 1,15$ %) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos positivos (16,7 %). Grupos recebendo vários níveis de antígeno de rORF2 superaram em tudo os grupos gerais recebendo vários níveis de vORF2 e o grupo recebendo 2 doses de vacina de PCV2 célula inteira morta desempenhar-se pior. Tabelas 14 e 15 contêm sumários de dados de pós-desafio do grupo.

Tabela 14. Sumário de dados de pós-desafio do grupo - parte 1

Gru- po	N	Tratamento	ADWG g/dia (lb/dia)	compor- tamento anormal	tosse	incidên- cia geral de sin- tomas clínicos
1	12	vORF2 – 16 αg (1 dose)	$394,65 \pm 131,54$ g/dia ($0,87 \pm 0,29$)	2/12 (16,7%)	3/12 (25%)	41,7%
2	12	vORF2 – 8 αg (1 dose)	$317,51 \pm 145,15$ g/dia ($0,70 \pm 0,32$)	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)	41,7%
3	12	vORF2 – 4 αg (1 dose)	$222,26 \pm 95,25$ g/dia ($0,49 \pm$	8/12 (66,7 %)	2/12 (16,7 %)	66,7%

			0,21)			
4	11	rORF2 – 16 αg (1 dose)	381,01 ± 136,07 g/dia (0,84 ± 0,30)	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	36,4%
5	12	rORF2 – 8 αg (1 dose)	426,37 ± 99,79 g/dia (0,94 ± 0,22)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	8,3%
6	11	rORF2 – 4 αg (1 dose)	326,58 ± 113,39 g/dia (0,72 ± 0,25)	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	9,1%
7	12	KV (2 doses)	226,79 ± 68,03 g/dia (0,50 ± 0,15)	7/12 (58,3%)	0/12 (0%)	58,3 %
8	10	Controles de desafio	344,73 ± 86,18 g/dia (0,76 ± 0,19)	1/10 (10%)	2/10 (20 %)	40 %
9	11	Controles negativos rígidos	480,80 ± 77,11 g/dia (1,06 ± 0,17)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0 %

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

Tabela 15. Sumário dos dados de pós-desafio do grupo - parte 2

Gru-	N	Tratamento	Taxa de	Prote-	% média	Taxa de in-
------	---	------------	---------	--------	---------	-------------

po			mortali- dade	ção nasal	de le- sões pulmo- nares	cidência de pelo menos um IHC de tecido positi- vo para PCV2
1	12	vORF2 – 16 αg (1 dose)	8,3 %	8,3 %	0,40 ± 0,50 %	16,7 %
2	12	vORF2 – 8 αg (1 dose)	8,3 %	8,3 %	7,41 ± 20,2 %	25,0 %
3	12	vORF2 – 4 αg (1 dose)	0 %	8,3 %	9,20 ± 20,9 %	66,7 %
4	11	rORF2 – 16 αg (1 dose)	0 %	18,2 %	1,50 ± 4,74 %	36,3 %
5	12	rORF2 – 8 αg (1 dose)	0 %	8,3 %	0,68 ± 1,15 %	16,7 %
6	11	rORF2 – 4 αg (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	Controles de desafio	10%	80%	9,88 ± 29,2 %	90,0 %
9	11	Controles negativos rígidos	0 %	63,6 %	0/11 (0%)	90,9 %

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculoví-
rus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2
crescido em cultura de célula adequada

[00123] Resultados deste estudo indicam que todos os esforços de
vacina também deveriam focalizar em uma vacina de rORF2. Em toda

parte, proteção nasal de PCV2 foi detectada pós-desafio e vacinação com uma vacina de PCV2 resultaram em uma redução de proteção. Imunoistoquímica de tecidos linfóides selecionados também serviu como um parâmetro bom para eficácia da vacina, ao passo que diferenças grandes em ADWG, sintomas clínicos e lesões graves não foram detectados entre os grupos. Este estudo foi complicado pelo fato que PCV2 estranho foi introduzido a algum ponto durante o estudo, como comprovado por proteção nasal contra PCV2, soroconversão de PCV2 e tecidos de IHC positivos no Grupo 9, o grupo de controle negativo rígido.

Debate

[00124] Sete vacinas de PCV2 foram avaliadas neste estudo que incluiu três níveis de dose diferentes de antígeno de vORF2 administrados uma vez no Dia 0, três níveis de dose diferentes de antígeno de rORF2 administrados uma vez no Dia 0 e um nível de dose de vacina de PCV2 de célula inteira morta administrada no Dia 0 e Dia 14. No geral, Grupo 5 que recebeu 1 dose de vacina contendo 8 µg de antígeno de rORF2, teve os melhores resultados. Grupo 5 teve o ADWG mais alto, a incidência mais baixa de comportamento anormal, a incidência mais baixa de respiração anormal, a segunda incidência mais baixa de tosse, a incidência mais baixa de sintomas clínicos gerais, a taxa de mortalidade mais baixa, a taxa mais baixa de proteção nasal contra PCV2, a segunda taxa mais baixa para % média de lesões pulmonares e a taxa de incidência mais baixa para tecidos de IHC positivos.

[00125] De forma interessante, Grupo 4 que recebeu uma dose mais alta de antígeno de rORF2 que o Grupo 5, não se desempenhou tão bem ou melhor que o Grupo 5, Grupo 4 teve um ADWG ligeiramente inferior, uma incidência mais alta de comportamento anormal, uma incidência mais alta de sintomas clínicos gerais, uma taxa mais

alta de proteção nasal contra PCV2, uma % média de mais alta de lesões pulmonares e uma taxa mais alta para tecidos de IHC positivos que o Grupo 5. Análise estatística, que pode ter indicado que as diferenças entre estes dois grupos não foram estatisticamente significativas, não foi conduzida nestes dados, mas houve uma tendência observada que o Grupo 4 não se desempenhou tão bem como o Grupo 5.

[00126] Pós-vacinação, 6 porcos morreram no primeiro sítio de estudo. Quatro dos seis porcos foram do Grupo 8 ou Grupo 9 que não receberam nenhuma vacina. Nenhum dos seis porcos demonstrou lesões consistentes com PMWS, nenhum evento adverso foi relatado e geral, todas as sete vacinas pareciam ser seguras quando administradas a porcos aproximadamente 11 dias de idade. Durante a fase de pós-vacinação do estudo, os porcos recebendo qualquer um dos três níveis de dose de vacina de vORF2 ou vacina de célula inteira morta tiveram os níveis de IFAT mais altos, enquanto o Grupo 5 teve os níveis mais baixos de IFAT antes do desafio, dos grupos de vacina.

[00127] Embora não formalmente provado, a rota predominante de transmissão de PCV2 para suínos jovens logo após desmamar é acreditada ser por contato direto oronasal e uma vacina eficaz que reduz proteção nasal contra PCV2 em um cenário de produção ajudaria a controlar a expansão de infecção. Grupos recebendo um de três níveis de antígeno de vORF2 e o grupo recebendo 8 µg de rORF2 tiveram a taxa de incidência mais baixa de proteção nasal contra PCV2 (8,3 %). Presumivelmente, o grupo de controle de desafio teve a taxa de incidência mais alta de proteção nasal (80 %).

[00128] Lesões graves em porcos com PMWS secundário à infecção de PCV2 tipicamente consistem em linfadenopatia generalizada em combinação com um ou um múltiplo dos seguintes: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígados atrofiados mosqueados, (4) úlceras gástricas e (5) nefrite. A

necropsia, icterícia, hepatite, nefrite e úlceras gástricas não foram observadas em qualquer grupo e linfadenopatia não foi especificamente examinada. A % média de contagens de lesões pulmonares variou entre os grupos. O grupo recebendo 16 µg de antígeno de vORF2 teve a % medida mais baixa de contagem de lesões pulmonares ($0,40 \pm 0,50$ %), seguido pelo grupo que recebeu 8 µg de rORF2 ($0,68 \pm 1,15$ %). Como esperado, o grupo de controle de desafio teve a % média mais alta de contagem de lesões pulmonares ($9,88 \pm 29,2$ %). Em todos os quatro grupos, a % média de contagens de lesões pulmonares foi elevada devido a um porco em cada um destes grupos que tinha contagens de lesões pulmonares muito altas. A maioria das lesões pulmonares foi descrita como vermelhas/roxas e consolidadas. Tipicamente, lesões pulmonares associadas a PMWS são descritas como edema interlobular castanho e não-desmanchável. As lesões pulmonares observadas neste estudo não foram associadas à infecção de PCV2 ou um segundo agente infeccioso pulmonar pode ter estado presente. Dentro do contexto deste estudo, a % de contagens de lesões pulmonares provavelmente não refletem uma verdadeira medida da quantidade de infecção pulmonar devido ao PCV2.

[00129] Outros investigadores demonstraram uma correlação direta entre a presença de antígeno de PCV2 por IHC e histopatologia. Histopatologia em tecidos selecionados não foi conduzida com este estudo. Grupo 1 (16 µg de vORF2) e Grupo 5 (8 µg de rORF2) tiveram a taxa de incidência mais baixa de porcos positivos para antígeno de PCV2 (8,3 %), enquanto o Grupo 9 (o grupo de controle negativo rígido - 90,9 %) e o Grupo 8 (o grupo de controle de desafio - 90,0 %) tiveram as taxas de incidência mais altas para porcos positivos para antígeno de PCV2. Devido à natureza não-subjetiva deste teste, os resultados de IHC provavelmente são um dos melhores parâmetros para julgar a eficácia da vacina.

[00130] Desse modo, em um aspecto da presente invenção, a Dosagem Protetora Mínima (MPD) de uma dose de 1 ml/1 de produto recombinante com antígeno de ORF2 de PCV2 extraído (rORF2) no modelo de porco de CDCD em face de um desafio de PCV2 foi determinada. Dos três grupos que receberam níveis variados de antígeno de rORF2, o Grupo 5 (8 µg de antígeno de rORF2) claramente teve o nível mais alto de proteção. Grupo 5 ou teve os melhores resultados ou foi ligado aos resultados mais favoráveis com respeito a todos os parâmetros examinados. Quando o Grupo 5 foi comparado com os outros seis grupos de vacina pós-desafio, o Grupo 5 teve o ADWG mais alto $426,37 \pm 99,79$ g/dia ($0,94 \pm 0,22$ lb/dia), a incidência mais baixa de comportamento anormal (0 %), a segunda incidência mais baixa de tosse (8,3 %), a incidência mais baixa de sintomas clínicos gerais (8,3 %), a taxa de mortalidade mais baixa (0 %), a taxa mais baixa de proteção nasal contra PCV2 (8,3 %), a segunda taxa mais baixa para % média de lesões pulmonares ($0,68 \pm 1,15$ %) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos de IHC positivos (16,7 %).

[00131] Em outro aspecto da presente invenção, a MPD de uma dose de 1 ml/l de produto convencional que é antígeno de ORF2 de PCV2 parcialmente purificado (vORF2) no modelo de porco de CDCD em face a um desafio de PCV2 foi determinada. Dos três grupos que receberam níveis variados de antígeno de vORF2, o Grupo 1 (16 µg de vORF2) teve o nível mais alto de proteção. Grupo 1 superou os Grupos 2 e 3 com respeito ao ADWG, % média de lesões pulmonares e IHC. Grupos 1 e 2 (8 µg de antígeno de vORF2) desempenharam-se igualmente com respeito à incidência geral de sintomas clínicos, Grupo 3 (4 µg de antígeno de vORF2) teve a taxa de mortalidade mais baixa, e todos os três grupos desempenharam-se igualmente com respeito à proteção nasal. No geral, vacinas de vORF não se desempenharam tão bem como as vacinas de rORF.

[00132] Em ainda outro aspecto da presente invenção, a eficácia de uma dose máxima de uma vacina de PCV2 Morto Convencional de 2 ml/2 no modelo de porco de CDCD em face a um desafio de PCV2 foi determinada. Das sete vacinas avaliadas neste estudo, a vacina de PCV2 morto de célula inteira desempenhou-se pior. Leitões recebendo duas doses de vacina de PCV2 morto de célula inteira tiveram o ADWG mais baixo, a segunda taxa mais alta de comportamento anormal (58,3 %), a segunda incidência geral mais alta de sintomas clínicos (58,3 %), a taxa de mortalidade mais alta (16,7 %), a segunda incidência mais alta de proteção nasal (41,7 %), % média mais alta de lesões pulmonares ($9,88 \pm 29,2$ %), uma incidência alta de lesões pulmonares observadas (75 %) e uma Taxa moderada de incidência de IHC em tecidos (41,7 %). Porém, ainda foi eficaz invocar uma resposta imune.

[00133] Em ainda outro aspecto da presente invenção, proteção nasal contra PCV2 foi avaliada como um parâmetro de eficácia e os parâmetros anteriores de eficácia de PCV2 de estudos anteriores foram reconfirmados. Resultados deste estudo indicam que proteção nasal contra PCV2 ocorre seguindo desafio intra nasal e que vacinas de PCV2 reduzem proteção nasal contra PCV2 pós-desafio. Além disso, resultados deste estudo e relatórios na literatura indicam que IHC deveria continuar sendo avaliado em experimentações futuras de vacina de PCV2 também.

[00134] Algumas conclusões adicionais que surgem deste estudo é que linfadenopatia é uma das marcas de PMWS. Outra das marcas de PMWS é depleção linfóide e histócitos multinucleados/gigantes. Adicionalmente, nenhum evento adverso ou reação do sítio de injeção foi observado para quaisquer das 7 vacinas de PCV2 e todas as 7 vacinas de PCV2 pareceram ser seguro quando administradas a porcos jovens.

Exemplo 5

[00135] Este exemplo testa a eficácia de oito vacinas candidatas de PCV2 e reconfirma os parâmetros de desafio de PCV2 dos estudos de desafio anteriores seguindo exposição a uma cepa virulenta de PCV2. Cem e cinquenta (150) leitões privados de colostro derivado de cesárea (CDCD) de 6-16 dias de idade, foram bloqueados no peso e fortuitamente divididos em 10 grupos de tamanho igual. Tabela 16 expõe o Projeto de Estudo Geral para este Exemplo.

Tabela 16. Projeto de estudo geral

Gru- po	Nº de por- quin- hos	Tratamen- to	Dia de trata- mento	KLH/IC FA no Dia 22 e Dia 28	Desa- flo com PCV2 viru- len-to no Dia 25	MLV de PRRS V no Dia 46	Ne- cro- psia no Dia 50
1	15	Vacina de PCV2 1 16 α g rORF2 – IMS 1314	0 & 14	+	+	+	+
2	15	Vacina de PCV2 2 16 α g vORF2 – Car- bopol	0 & 14	+	+	+	+
3	15	Vacina de PCV2 3 16 α g rORF2	0 & 14	+	+	+	+

Grupo	Nº de porquinhos	Tratamento	Dia de tratamento	KLH/IC FA no Dia 22 e Dia 28	Desafio com PCV2 virulento no Dia 25	MLV de PRRS V no Dia 46	Necropsia no Dia 50
		– Carbopol					
4	15	Vacina de PCV2 16 α g vORF2 – Carbopol	0	+	+	+	+
5	15	Vacina de PCV2 3 4 α g rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
6	15	Vacina de PCV2 3 1 α g rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
7	15	Vacina de PCV2 3 0,25 α g rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+

Grupo	Nº de porquinhos	Tratamento	Dia de tratamento	KLH/IC FA no Dia 22 e Dia 28	Desafio com PCV2 virulento no Dia 25	MLV de PRRS V no Dia 46	Necropsia no Dia 50
8	15	Vacina de PCV2 4 >8,0 log KV – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
9	15	Controles de desafio	N/A	+	+	+	+
10	15	Nenhum – Grupo de controle negativo rígido	N/A	+	-	+	+

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovirus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

[00136] A formulação de vacina dada a cada grupo é como segue. Vacina de PCV2 No. 1, administrada em dose de 1 x 2 ml ao Grupo 1, foi uma dose alta (16 ug/2 ml de dose) de antígeno de ORF2 recombinante inativado em adjuvante com IMS 1314 (16 ug de rORF2 - IMS 1314). Vacina de PCV2 No. 2, administrada em dose de 1 x 2 ml ao Grupo 2, foi uma dose alta (16 ug/2 ml de dose) de um antígeno de ORF2 de PCV2 gerado por VIDO R-1 parcialmente purificado em ad-

juvante com Carbopol (16 ug de vORF2 - Carbopol). Vacina de PCV2 No. 3, administrada em dose de 1 x 2 ml ao Grupo 3, foi uma dose alta (16 ug/2 ml de dose) de antígeno de ORF2 recombinante inativado em adjuvante com Carbopol (16 ug de rORF2 - Carbopol). Vacina de PCV2 No. 4, administrada em dose de 1 x 1 ml ao Grupo 4, foi uma dose alta (16 ug /1 ml de dose) de um antígeno de ORF2 de PCV2 gerado por VIDO R-1 parcialmente purificado em adjuvante com Carbopol (16 ug de vORF2 - Carbopol). Vacina No. 5, administrada em dose de 1 x 2 ml ao Grupo 5, foi uma dose de 4 ug/2 ml de um antígeno de ORF2 recombinante inativado em adjuvante com Carbopol (4 ug de rORF2 - Carbopol). Vacina de PCV2 No. 6, administrada em dose de 1 x 2 ml ao Grupo 6, foi uma dose de 1 ug/2 ml de um antígeno de ORF2 recombinante inativado em adjuvante com Carbopol (1 ug de rORF2 - Carbopol). Vacina de PCV2 No. 7, administrada em dose de 1 x 2 ml ao Grupo 7, foi uma dose baixa (0,25 ug/2 ml de dose) de antígeno de ORF2 recombinante inativado em adjuvante com Carbopol (0,25 ug de rORF2 - Carbopol). Vacina de PCV2 No. 8, administrada em dose de 1 x 2 ml ao Grupo 8, foi uma dose alta (titulação de pré-inativação > 8,0 log/2 ml de dose) antígeno de Struve de PCV2 gerado por VIDO- R-1 Morto Convencional Inativado em adjuvante com Carbopol (>8,0 log KV - Carbopol). No Dia 0, Grupos 1-8 foram tratados com suas vacinas atribuídas. Grupos 1-3 e 5-8 receberam reforços de suas respectivas vacinas novamente no Dia 14. A eficácia de uma dose simples de 16 µg de vORF2 - Carbopol foi testada no Grupo 4 que não recebeu um reforço no Dia 14. Os leitões foram observados para eventos adversos e reações do sítio de injeção seguindo ambas as vacinações. No Dia 21, os leitões foram movidos para um segundo sítio de estudo onde os Grupos 1-9 foram alojados em grupos em uma estrutura e o Grupo 10 foi alojado em uma estrutura separada. Todos os porcos receberam hemocianina de lapa emulsificada com o adjuvante de Freund incom-

pleto (KLH/ICFA) nos Dias 22 e 28. No Dia 25, Grupos 1-9 foram desafiados com aproximadamente 4 logs de vírus de PCV2 virulento. Pelo dia 46, pouquíssimas mortes tinham ocorrido no grupo de controle de desafio. Em uma tentativa para imunoestimular os porcos e aumentar a virulência do material de desafio de PCV2, todos os Grupos foram tratados com INGELVAC® MLV de PRRSV (Vacina Reprodutora e Respiratória Porcina, Vírus Vivo Modificado) no Dia 46. Amostras de sangue pré- e pós-desafio foram colhidas para sorologia de PCV2. Pós-desafio, dados de peso do corpo para determinação de ganho de peso de diário médio (ADWG) e observações de sinais clínicos foram colhidos. No Dia 50, todos porcos sobreviventes foram submetidos à necropsia, lesões graves foram registradas, pulmões foram classificados para patologia e tecidos selecionados foram preservados em formalina para exame por Imunoistoquímica (IHC) para detecção de antígeno de PCV2 a uma data posterior.

Materiais e Métodos

[00137] Este foi um estudo de viabilidade de desafio de vacinação parcialmente cego conduzido em porcos de CDCD, 6 a 16 dias de idade no Dia 0. Para ser incluído no estudo, titulações de IFA de PCV2 das porcas foram $\leq 1:1000$. Adicionalmente, os estados sorológicos das porcas foram de um rebanho PRRS-negativo conhecido. Dezesesseis (16) porcas foram testadas para estado de PCV2 sorológico e todas as dezesesseis (16) tinham uma titulação de PCV2 de ≤ 1000 e foram transferidas para o primeiro sítio de estudo. Cento e cinquenta (150) leitões foram liberados através de cirurgias de parto cesariano e estavam disponíveis para este estudo no Dia -3. No Dia -3, 150 porcos de CDCD no primeiro sítio de estudo foram pesados, identificados com marcadores de orelha, bloqueados em peso e fortuitamente atribuídos a 1 de 10 grupos, como exposto acima na tabela 16. Foram colhidas amostras de san-

gue de todos os porcos. Se qualquer animal de teste satisfazendo os critérios de inclusão fosse inscrito no estudo e fosse excluído depois por qualquer razão, o Investigador e Monitor consultariam para determinar o uso dos dados colhido do animal na análise final. A data destes leitões inscritos foi excluída e a razão para exclusão foi documentada. Nenhuma porca satisfazendo os critérios de inclusão, selecionados para o estudo e transportados para o primeiro sítio de estudo foi excluída. Nenhum leitão foi excluído do estudo, e nenhum animal de teste foi removido do estudo antes do término. Tabela 17 descreve os prazos para as atividades fundamentais deste Exemplo.

Tabela 17. Atividades do estudo

Dia do Estudo	Datas Atuais	Atividade do estudo
-3	04-04-03	Leitões pesados; exame de saúde; randomizados em grupos; colhidas amostras de sangue
-3, 0-21	04-04-03 07-04-03 a 27-05-03	Observados para saúde geral e para eventos adversos pós-vacinação
0	07-04-03	Administrados respectivos IVPs aos Grupos 1-8
0-7	07-04-03 a 14-04-03	Observados porcos para reações de sítio de injeção
14	21-04-03	Reforçados Grupos 1-3, 5-8 com respectivos IVPs; tiradas amostras de sangue de todos porcos
14-21	21-04-03 a 28-04-03	Observados os porcos para reações à injeção
19-21	26-04-03 a 28-04-03	Tratados todos os porcos com antibióticos

Dia do Estudo	Datas Atuais	Atividade do estudo
21	28-04-03	Transportados os porcos de Struve Labs, Inc. Para Veterinary Resources, Inc. (VRI)
22-50	28-04-03 a 27-05-03	Observados os porcos para sinais clínicos pós-desafio
22	29-04-03	Tratados os Grupos 1-10 com KLH/ICFA
25	02-05-03	Colhidas as amostras de sangue de todos os porcos; pesados todos os porcos; desafiados os Grupos 1-9 com material de desafio de PCV2
28	05-05-03	Tratados os Grupos 1-10 com KLH/ICFA
32	09-05-03	Colhidas as amostras de sangue de todos os porcos
46	23-05-03	Administrado INGELVAC® PRRS MLV a todos os porcos
50	27-05-03	Colhidas as amostras de sangue, pesados e submetidos à necropsia todos os porcos; lesões graves foram registradas; pulmões foram avaliados para lesões; amostras de tecido fresco e fixado em formalina foram salvas; fase em-vida do estudo foi concluída

[00138] Seguindo conclusão da fase em-vida do estudo, tecidos fixados em formalina foram examinados por Imunoistoquímica (IHC) para detecção de antígeno de PCV2 por um patologista, foram avaliadas as amostras de sangue para sorologia de PCV2 e ganho de peso diário médio (ADWG) foi determinado do Dia 25 ao Dia 50.

[00139] Animais Foram alojados no primeiro sítio de estudo em gaiolas individuais em sete quartos do nascimento a aproximadamente 11 dias de idade (aproximadamente Dia 0 do estudo). Cada quarto foi

idêntico em layout e consistiu em gaiolas de aço inoxidável individuais empilhadas com ar aquecido e filtrado provido separadamente a cada unidade de isolamento. Cada quarto teve calor e ventilação separados, assim impedindo contaminação secundária de ar entre os quartos. Os animais foram alojados em duas estruturas diferentes no segundo sítio de estudo. Grupo 10 (O grupo de controle negativo rígido) foi alojado separadamente em uma estrutura de berçário convertida e Grupos 1-9 foram alojados em uma estrutura de ninhada convertida. Cada grupo foi alojado em um chiqueiro separado (14-15 porcos por chiqueiro) e cada chiqueiro fornecia aproximadamente $0,214 \text{ m}^2$ (02,3 pés quadrados) por porco. Grupos 2, 4 e 8 foram colocados em três chiqueiros adjacentes em um lado da betesga e Grupos 1, 3, 5, 6, 7 e 9 foram colocados em seis chiqueiros adjacentes no outro lado da betesga. A separação do Grupo foi devido à preocupação pelo Monitor do Estudo que as vacinas administradas aos Grupos 2, 4, e 8 não tinham sido inativadas completamente. Cada chiqueiro estava em um assoalho elevado com chãos com ripas de plástico. Uma cavidade abaixo dos chiqueiros serviu como um tanque de contenção para excremento e resíduo. Cada estrutura tinha seus próprios sistemas de aquecimento e de ventilação separados, com pouca probabilidade de contaminação secundária de ar entre as estruturas.

[00140] No primeiro sítio de estudo, os leitões foram alimentados com uma ração de leite especialmente formulada do nascimento até aproximadamente 3 semanas de idade. Todos os leitões estavam consumindo ração misturada especial, sólida pelo dia 21 (aproximadamente 4 ½ semanas de idade). No segundo sítio de estudo, todos os leitões foram alimentados com uma ração de mistura comercial não-medicativa de costume apropriada para sua idade e peso, ad libitum. Água em ambos os sítios de estudo estava também disponível ad libitum.

[00141] Todos os porcos de teste foram tratados com 1,0 ml de NAXCEL®, IM, em coxas revezadas nos Dias 19, 20, e 21, Além disso, Porco No. 11 (grupo 1) foi tratado com 0,5 ml de NAXCEL® IM no Dia 10, Porco No. 13 (grupo 10) foi tratado com 1 ml de Penicilina e 1 ml de PREDEF® 2X no Dia 10, Porco No. 4 (grupo 9) foi tratado com 1,0 ml de NAXCEL® IM no Dia 11 e Porcos 1 (Grupo 1), 4 e 11 foram cada um tratados com 1,0 ml de NAXCEL® no Dia 14 por várias razões de saúde.

[00142] Enquanto em ambos os sítios de estudo, os porcos estavam sob cuidado veterinário. Exames de saúde dos animais foram conduzidos no Dia -3 e foram registrados no Formulário de Registro de Exame de Saúde. Todos os animais estavam em estado saúde e nutricional bom antes da vacinação como determinado por observação no Dia 0. Todos os animais de teste foram observados estar em bom estado de saúde e nutricional antes do desafio. Carcaças e tecidos foram descartados mediante farinação. Descarte final dos animais de estudo foi registrado no Registro de Disposição de Animal.

[00143] Nos Dias 0 e 14, porcos atribuídos aos Grupos 1-3 e 5-8 receberam 2,0 mL de Vacinas 1-4 de PCV2 atribuídas, respectivamente, IM na região direita e esquerda do pescoço, respectivamente, usando uma seringa estéril de trava Luer de 3,0 ml e uma agulha estéril de 20g x 1,27 cm (20g x ½"). Porcos atribuídos ao Grupo 4 receberam 1,0 ml de Vacina de PCV2 No. 2, IM na região direita do pescoço usando uma seringa estéril de trava Luer de 3,0 ml e uma agulha estéril de 20g x 1,27 cm (20g x ½") no Dia 0 apenas.

[00144] No Dia 22 todos os porcos de teste receberam 2,0 ml de KLH/ICFA IM na região esquerda do pescoço usando uma seringa de trava Luer estéril de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x 1,27 cm (20g x ½"). No Dia 28 todos os porcos de teste receberam 2,0 ml de KLH/ICFA na região direita da coxa usando uma seringa estéril de tra-

va Luer de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x 1,27 cm (20g x ½").

[00145] No Dia 25, porcos atribuídos a Grupos 1-9 receberam 1,0 ml de PCV2 ISUVDL desafio material (3,98 log₁₀ TCID₅₀/mL) IM na região direita do pescoço usando uma seringa estéril de trava Luer de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x 1,27 cm (20g x ½"). Um adicional de 1,0 ml do mesmo material foi administrado IN a cada porco (0,5 ml por narina) usando uma seringa estéril de trava Luer de 3,0 ml e cânula nasal.

[00146] No Dia 46, todos os porcos de teste receberam 2,0 ml de INGELVAC® PRRS MLV, IM, na região direita do pescoço usando uma seringa de trava Luer de 3,0 ml e uma agulha estéril 20g x 1,27 cm (20g x ½"). O MLV de PRRSV foi administrado em uma tentativa para aumentar a virulência do material de desafio de PCV2.

[00147] Os porcos de teste foram observados diariamente para saúde geral e eventos adversos no Dia -3 e do Dia 0 ao Dia 21. Cada um dos porcos foi registrado para comportamento normal ou anormal, respiração ou tosse. Observações foram registradas no Registro de Observação Clínica. Todos os porcos de teste foram observados do Dia 0 ao Dia 7, e o Grupo 7 foi também observado do Dia 14 a 21, para reações do sítio de injeção. Ganho de peso diário médio foi determinado pesando cada porco em uma escala calibrada nos Dias -3, 25 e 50, ou no dia que um porco foi encontrado morto após desafio. Foram registrados pesos do corpo no Formulário de Peso do Corpo. Dia -3 pesos do corpo foram utilizados para bloquear os porcos antes da randomização. Dados de peso do Dia 25 e Dia 50 foram utilizados para determinar o ganho de peso diário médio (ADWG) para cada porco durante estes pontos de tempo. Para porcos que morreram após o desafio e antes do Dia 50, o ADWG foi ajustado para representar o ADWG do Dia 25 ao dia de morte.

[00148] Sangue total venoso foi colhido de cada leitão do seio ve-

noso orbital nos Dias -3 e 14 para determinar sorologia de PCV2. Para cada leitão, sangue foi colhido do seio venoso orbital inserindo um tubo capilar estéril no canto mediano de um dos olhos e escoando aproximadamente 3,0 ml de sangue total em um Tubo Separador de Soro de 4,0 ml (SST). Nos Dias 25, 32 e 50, sangue total venoso de cada porco foi colhido da cava da veia anterior usando uma agulha estéril de 20g x 38,1 mm (20g x 1 1/2") de Vacutaniner® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey), um retentor de agulha de Vacutainer® e um SST de 13 ml. Foram registradas coletas de sangue em cada ponto de tempo no Registro de Coleta de Amostra. Sangue em cada SST foi deixado coagular, cada SST foi depois girado e o soro colhido. Soro colhido foi transferido para um tubo de pressão estéril e armazenado a $-70 \pm 10^{\circ} \text{C}$ até testado a uma data posterior. As amostras de soro foram testadas para a presença de anticorpos de PCV2 através de pessoal de BIVI-R&D.

[00149] Os porcos foram observados uma vez diariamente do Dia 22 ao Dia 50 para sintomas clínicos e registrados para comportamento normal ou anormal, respiração ou tosse. Observações clínicas foram registradas no Registro de Observação Clínica.

[00150] Porcos Nos. 46 (grupo 1) e 98 (Grupos 9) morreram no primeiro sítio de estudo. Ambas destas mortes foram categorizadas como mortes por sangramento e necropsia não foi conduzida nestes dois porcos. No segundo sítio de estudo, os porcos que morreram após desafio e antes do Dia 50, e porcos eutanisados no Dia 50, foram submetidos à necropsia. Qualquer lesão grave foi observada e as porcentagens dos lóbulos pulmonares com as lesões foram registradas no Formulário de Relatório de Necropsia.

[00151] De cada um dos porcos submetidos à necropsia no segundo sítio de estudo, uma amostra de tecido da amígdala, pulmão, coração e linfonodo mesentérico foi colocada em um recipiente simples

tamponado com 10 % de formalina; enquanto a outra amostra de tecido dos mesmos órgãos acima mencionados foi colocada em um Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK) e cada Whirl-pak® foi colocado em gelo. Cada recipiente foi corretamente marcado. Coletas de amostra foram registradas no Formulário de Relatório de Necropsia. Depois, as amostras de tecido fixo em formalina e um Formulário de Solicitação de Diagnóstico foram submetidas ao teste de IHC. Teste de IHC foi conduzido de acordo com os procedimentos laboratoriais padrões para receber as amostras, preparação da amostra e da lâmina, e técnicas de tingimento. Tecidos frescos em Whirl-paks® foram transportados com sacos de gelo para o Monitor do Estudo para armazenamento ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ} \text{ C}$) e possível uso futuro.

[00152] Tecidos fixados em formalina foram examinados por um patologista para detecção de PCV2 por IHC e registrados usando o sistema de classificação a seguir: 0 = Nenhum; 1 = tingimento positivo escasso, poucos sítios; 2 = tingimento positivo moderado, sítios múltiplos; e 3 = tingimento positivo abundante, difunde-se ao longo do tecido. Para propósitos analíticos, foi considerada uma classificação de 0 "negativa" e uma contagem de maior que 0 foi considerada "positiva".

Resultados

[00153] Resultados para este exemplo são dados abaixo. É observado que os Porcos No. 46 e 98 morreram respectivamente nos dias 14 e 25. Estas mortes foram categorizadas como mortes por sangramento. Porco No. 11 (grupo 1) estava ofegante com respiração rápida no Dia 15. Do contrário, todos os porcos estavam normais para comportamento, respiração e tosse durante este período de observação e nenhum evento adverso sistêmico foi observado com qualquer grupo. Nenhuma reação do sítio de injeção seguindo vacinação foi observada no Dia 0. Seguindo vacinação no Dia 14, sete (7) fora quatorze (14) porcos do Grupo 1 (50,0 %) tiveram inchaço com uma contagem de

"2" no Dia 15. Quatro (4) fora quatorze (14) do Grupo 1 (28,6 %) ainda tiveram uma inchação de "2" no Dia 16. Nenhum dos outros grupos experimentou reações do sítio de injeção seguindo qualquer vacinação. [00154] Resultados de ganho de peso diário médio (ADWG) estão apresentados abaixo na Tabela 18, Porcos No. 46 e 98 que morreram por sangramento foram excluídos dos resultados do grupo. Grupo 4, que recebeu uma dose de 16 µg de vORF2 - Carbopol, teve o ADWG mais alto $526,16 \pm 117,93$ g/dia ($1,16 \pm 0,26$ lb/dia) , seguido por Grupos 1, 2, 3, 5, 6 e 10 que tiveram ADWGs que variaram de $485,34 \pm 104,32$ g/dia ($1,07 \pm 0,23$ lb/dia) a $503,48 \pm 117,93$ g/dia ($1,11 \pm 0,26$ lb/dia). Grupo 9 teve o ADWG mais baixo $399,16 \pm 131,54$ g/dia ($0,88 \pm 0,29$ lb/dia), seguido respectivamente pelos Grupos 8 e 7 que tiveram ADWGs de $421,84 \pm 149,68$ g/dia ($0,93 \pm 0,33$ lb/dia) e $449,05 \pm 199,58$ g/dia ($0,99 \pm 0,44$ lb/dia).

Tabela 18. Sumário de Ganhos de Peso Diário Médios do Grupo (ADWG)

Grupo	Tratamento	N	ADWG – g/dia (lb/dia) (Dia 25 ao Dia 50) ou ajustado para porcos mortos antes do Dia 50
1	rORF2 – 16 µg – IMS 1314 2 doses	14	$489,88 \pm 136,07$ g/dia ($1,08 \pm 0,30$ lb/dia)
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	$503,48 \pm 72,57$ g/dia ($1,11 \pm 0,16$ lb/dia)
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol 2 doses	15	$485,34 \pm 95,25$ g/dia ($1,07 \pm 0,21$ lb/dia)
4	vORF2 – 4 µg – Carbopol 1 dose	15	$526,16 \pm 117,93$ g/dia ($1,16 \pm 0,26$ lb/dia)
5	rORF2 – 4 µg – Carbopol 1 dose	15	$485,34 \pm 117,93$ g/dia ($1,07 \pm 0,26$ lb/dia)

6	rORF2 – 1 α g – Carbopol 2 doses	15	503,48 $\pm$ 117,93 g/dia (1,11 $\pm$ 0,26 lb/dia)
7	rORF2 – 0,25 α g – Carbopol 2 doses	15	449,05 $\pm$ 199,58 g/dia (0,99 $\pm$ 0,44 lb/dia)
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 doses	15	421,84 $\pm$ 149,68 g/dia (0,93 $\pm$ 0,33 lb/dia)
9	Controles de desafio	14	399,16 $\pm$ 131,54 g/dia (0,88 $\pm$ 0,29 lb/dia)
10	Controles negativos rígidos	15	485,34 $\pm$ 104,32 g/dia (1,07 $\pm$ 0,23 lb/dia)

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

[00155] Resultados da sorologia de PCV2 são apresentados abaixo na Tabela 19. Todos os dez (10) grupos foram soronegativos para PCV2 no Dia -3. No Dia 14, titulações de PCV2 permaneceram baixas para todos os dez (10) grupos (faixa de 50-113). No Dia 25, Grupo 8 que recebeu a vacina de vírus morto de célula inteira, teve a titulação de PCV2 mais alta (4617), seguido pelo Grupo 2, que recebeu 16 μ g de vORF2 - Carbopol, Grupo 4, que recebeu como dose simples de 16 μ g de vORF2 - Carbopol, e Grupo 3, que recebeu 16 μ g de rORF2 – Carbopol, que teve titulações de 2507 1920 e 1503 respectivamente. No Dia 32 (uma semana pós-desafio), titulações para os Grupos 1-6 e o Grupo 8 variaram de 2360 a 7619; enquanto os Grupos 7 (0,25 μ g de rORF2 - Carbopol), 9 (Controle de Desafio) e 10 (controle negativo Rígido) tiveram titulações de 382, 129 e 78 respectivamente. No Dia 50 (dia da necropsia), todos os dez (10) grupos demonstraram titulações de PCV2 altas ($\geq$ 1257).

[00156] Nos Dias 25, 32 e 50, Grupo 3, que recebeu duas doses de 16 μ g de rORF2 – Carbopol, teve titulações de anticorpo mais altas

que o Grupo 1, que recebeu duas doses de 16 ug de rORF2 - EVIS 1314. Nos Dias 25, 32 e 50, o Grupo 2, que recebeu duas doses de 16 ug de vORF2, teve titulações mais altas que o Grupo 4, que recebeu apenas uma dose da mesma vacina. Os Grupos 3, 5, 6, 7, que receberam níveis decrescentes de rORF2 - Carbopol, de 16, 4, 1 e 0,25 ug respectivamente, demonstraram titulações de anticorpo decrescentes correspondentemente nos Dias 25 e 32.

Tabela 19. Sumário das titulações de IFA de PCV2 do grupo

Grupo	Tratamento	Dia-3	Dia-14**	Dia-25***	Dia-32	Dia-50****
1	rORF2-16 α g IMS 1314 2 doses	50	64	646	3326	4314
2	vORF2-16 α g Carbo-pol 2 doses	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2-16 α g Carbo-pol 2 doses	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2-16 α g Carbo-pol 1 dose	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2-4 α g Carbopol 1 dose	50	61	1867	3933	4533

Grupo	Tratamento	Dia-3	Dia-14**	Dia-25***	Dia-32	Dia-50****
6	rORF2-1 α g Carbopol 2 doses	50	70	490	2360	5740
7	rORF2 – 0,25 α g- Carbopol 2 doses	50	73	63	382	5819
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 doses	50	97	4617	7619	10817
9	Controles de desafio	50	53	50	129	4288
10	Controles negativos rígidos	50	50	50	78	11205

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

* Para propósitos de cálculo, uma titulação de IFA ≤ 100 foi designada como uma titulação de "50"; uma titulação de IFA ≤ 6400 foi designada como uma titulação de "12.800".

** Dia do Desafio

*** Dia da Necropsia

[00157] Os resultados das observações clínicas pós-desafio são apresentados abaixo. Tabela 20 inclui observações para Comportamento anormal, Respiração Anormal, Tosse e Diarréia. Tabela 21 inclui os resultados do Sumário da Incidência Geral do Grupo de Sintomas Clínicos e Tabela 22 inclui resultados do Sumário das Taxas de Mortalidade do Grupo Pós-desafio. A incidência de comportamento anormal, respiração e tosse pós-desafio é baixa em porcos recebendo 16 ug de rORF2-IMS 1314 (Grupo 1), 16 ug de rORF2 - Carbopol (Grupo 3), 1 ug de rORF2-Carbopol (Grupo 6), 0,25 ug de rORF2-Carbopol (Grupo 7), e em porcos no Grupo de Controle de Desafio

(Grupo 9). A incidência de comportamento anormal, respiração e tosse pós-desafio foi zero em porcos recebendo 16 ug de vORF2-Carbopol (Grupo 2), uma dose simples de 16 ug de vORF2-Carbopol (Grupo 4), 4 ug de rORF2-Carbopol (Grupo 5), >8 log KV-Carbopol (Grupo 8), e em porcos no grupo de controle negativo rígido (Grupo 10).

[00158] A incidência geral de sintomas clínicos variou entre os grupos. Porcos recebendo 16 ug de vORF2-Carbopol (Grupo 2), uma dose simples de 16 ug de vORF2-Carbopol (Grupo 4), e porcos no grupo de controle negativo rígido (Grupo 10) tiveram taxas de incidência de 0 %; porcos recebendo 16 ug de rORF2-Carbopol (Grupo 3) e 1 ug de rORF2-Carbopol (Grupo 6) tiveram taxas de incidência de 6,7 %; porcos recebendo 16 ug de rORF2-IMS 1314 (Grupo 1) tiveram uma taxa de incidência geral de 7,1 %; porcos recebendo 4 ug de rORF2-Carbopol (Grupo 5), 0,25 ug de rORF2-Carbopol (Grupo 7) e >8 log de vacina de KV tiveram taxas de incidência de 13,3 %; e porcos no Grupo de Controle de Desafio (Grupo 9) tiveram uma taxa de incidência de 14,3 %.

[00159] Taxas de mortalidade geral entre os grupos variaram também. Grupo 8, que recebeu 2 doses de vacina de KV, teve a taxa de mortalidade mais alta de 20,0 %; seguido pelo Grupo 9, o grupo de controle de desafio, e o Grupo 7, que recebeu 0,25 ug de rORF2-Carbopol, tiveram taxas de mortalidade de 14,3 % e 13,3 % respectivamente. Grupo 4, que recebeu uma dose de 16 ug de vORF2-Carbopol, teve uma taxa de mortalidade de 6,7 %. Todos os outros Grupos 1, 2, 3, 5, 6 e 10 tiveram uma taxa de mortalidade de 0 %.

Tabela 20. Sumário de observações do grupo para comportamento anormal, respiração anormal e de tosse pós-desafio

Grupo	Tratamento	N	Comportamento anormal ¹	Comportamento anormal ²	Tosse ³
1	rORF2-16	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14

	αg IMS 1314 2 doses				(7,1%)
2	vORF2-16 αg Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2-16 αg Carbo- pol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
4	vORF2-16 αg Carbopol 1 dose	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2-4 αg Carbopol 1 dose	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
6	rORF2-1 αg Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
7	rORF2 – 0,25 αg- Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)	1/15 (06,7%)
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 doses	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
9	Controles de desafio	14	1/14 (7,1%)	1/14 (7,1%)	2/14 (14/3%)
10	Controles negativos	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

	rígidos				
--	---------	--	--	--	--

¹ Número total de porcos em cada grupo que demonstraram qualquer comportamento anormal pelo menos um dia

² Número total de porcos em cada grupo que demonstraram qualquer respiração anormal pelo menos um dia

³ Número total de porcos em cada grupo que demonstraram uma tosse pelo menos um dia

Tabela 21. Sumário da incidência geral do grupo de sintomas clínicos pós-desafio

Grupo	Tratamento	N	Incidência de porcos com sintomas clínicos ¹	Taxa de incidência
1	rORF2-16 α g IMS 1314 2 doses	14	1	7,1%
2	vORF2-16 α g Carbopol 2 doses	15	0	0,0%
3	rORF2-16 α g Carbopol 2 doses	15	1	6,7%
4	vORF2-16 α g Carbopol 1 dose	15	0	0,0%
5	rORF2-4 α g Carbopol 1 dose	15	2	13,3%
6	rORF2-1 α g Carbopol 2 doses	15	1	6,7%
7	rORF2 – 0,25 α g- Carbopol 2 doses	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2	15	2	13,3%

	doses			
9	controles de desafio	14	2	14,3%
10	controles negativos rígidos	15	0	0,0%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

¹ Número total de porcos em cada grupo que demonstraram qualquer sintoma clínico pelo menos um dia

Tabela 22. Sumário das taxas de mortalidade do grupo pós-desafio

Grupo	Tratamento	N	Morte pós-desafio	Taxa de mortalidade
1	rORF2-16 α g IMS 1314 2 doses	14	0	0,0%
2	vORF2-16 α g Carbopol 2 doses	15	0	0,0%
3	rORF2-16 α g Carbopol 2 doses	15	0	0,0%
4	vORF2-16 α g Carbopol 1 dose	15	1	6,7%
5	rORF2-4 α g Carbopol 1 dose	15	0	0,0%
6	rORF2-1 α g Carbopol 2 doses	15	0	0,0%
7	rORF2 – 0,25 α g- Carbopol 2 doses	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 doses	15	3	20,0%
9	Controles de desafio	14	2	14,3%
10	Controles negativos rígidos	15	0	0,0%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2

crescido em cultura de célula adequada

[00160] O Sumário da Porcentagem Média de Lesões Pulmonares do Grupo e Diagnose de Tentativa é dado abaixo na Tabela 23. Grupo 9, o grupo de controle de desafio, teve a porcentagem mais alta de lesões pulmonares com uma média de $10,81 \pm 23,27$ %, seguido pelo Grupo 7, que recebeu 0,25 ug de rORF2-Carbopol e teve uma média de $6,57 \pm 24,74$ %, Grupo 5, que recebeu 4 ug de rORF2 - Carbopol e teve uma média de $2,88 \pm 8,88$ % e o Grupo 8, que recebeu a vacina de KV e teve uma média de $2,01 \pm 4,98$ %. Os seis (6) grupos restantes tiveram porcentagem média inferior de lesões pulmonares que variaram de $0,11 \pm 0,38$ % a $0,90 \pm 0,15$ %.

[00161] Diagnose de tentativa de pneumonia variou entre os grupos. Grupo 3, que recebeu duas doses de 16 ug de rORF2-Carbopol, teve a diagnose de tentativa de pneumonia mais baixa, com 13,3 %. Grupo 9, o grupo de controle de desafio, teve 50 % do grupo como tentativa diagnosticado com pneumonia, seguido respectivamente pelo Grupo 10, o grupo de controle negativo rígido e Grupo 2, que recebeu duas doses de 16 ug de vORF2-Carbopol com 46,7 % de 40 %, que como tentativa diagnosticado com pneumonia.

[00162] Grupos 1, 2, 3, 5, 9 e 10 tiveram 0 % do grupo como tentativa diagnosticado como infetado por PCV2; enquanto o Grupo 8, que recebeu duas doses se vacina de KV, teve a taxa de grupo mais alta de diagnose tentativa de infecção de PCV2, a qual 20 %. Grupo 7, que recebeu duas doses de 0,25 ug de rORF2-Carbopol e Grupo 4, que recebeu uma dose de 16 ug de vORF2-Carbopol, teve diagnoses de grupo de tentativa de infecção de PCV2 em 13,3 % e 6,7 % de cada grupo, respectivamente.

[00163] Úlceras gástricas foram apenas diagnosticadas em um porco no Grupo 7 (6,7 %); enquanto os outros 9 grupos permaneceram livre de úlceras gástricas.

Tabela 23. Sumário da % média de lesão pulmonar do grupo e diagnose de tentativa

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que ficaram protegidos por pelo menos um dia	Taxa de incidência
1	rORF2-16 α g IMS 1314 2 doses	15	0	0%
2	vORF2-16 α g Carbopol 2 doses	15	1	6,7%
3	rORF2-16 α g Carbopol 2 doses	15	3	20,0%
4	vORF2-16 α g Carbopol 1 dose	15	2	13,3%
5	rORF2-4 α g Carbopol 1 dose	15	3	20,0%
6	rORF2-1 α g Carbopol 2 doses	15	6	40,0%
7	rORF2 – 0,25 α g- Carbopol 2 doses	15	7	46,7%
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 doses	15	12	80%
9	Controles de desafio	14	14	100,0%
10	Controles negativos rígidos	15	14	93,3%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

[00164] O Sumário dos Resultados de Incidência Positiva do Grupo de IHC são mostrados abaixo na Tabela 24. Grupo 1 (16 ug de rORF2

- IMS 1314) teve a taxa de grupo mais baixa de resultados positivos de IHC com 0 % dos porcos positivo para PCV2, seguido pelo Grupo 2 (16 ug de vORF2 - Carbopol) e Grupo 4 (dose simples 16 ug de vORF2 - Carbopol) que tiveram taxas de IHC do grupo respectivamente de 6,7 % e 13,3 %. Grupo 9, o grupo de controle de desafio, teve a taxa de incidência positiva de IHC mais alta com 100 % dos porcos positivos para PCV2, seguido pelo Grupo 10, o grupo de controle negativo rígido, e Grupo 8 (vacina de KV), com 93,3 % e 80 % dos porcos positivos para PCV2, respectivamente.

Tabela 24. Sumário da taxa de incidência positiva de IHC do grupo

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que ficaram protegidos por pelo menos um dia	Taxa de incidência
1	rORF2-16 α g IMS 1314 2 doses	15	0	0%
2	vORF2-16 α g Carbopol 2 doses	15	1	6,7%
3	rORF2-16 α g Carbopol 2 doses	15	3	20,0%
4	vORF2-16 α g Carbopol 1 dose	15	2	13,3%
5	rORF2-4 α g Carbopol 1 dose	15	3	20,0%
6	rORF2-1 α g Carbopol 2 doses	15	6	40,0%
7	rORF2 – 0,25 α g- Carbopol 2 doses	15	7	46,7%
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2	15	12	80%

	doses			
9	Controles de desafio	14	14	100,0%
10	Controles negativos rígidos	15	14	93,3%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa com baculovírus recombinante; vírus de célula inteira KV ou morto = vírus de PCV2 crescido em cultura de célula adequada

Debate

[00165] Sete vacinas de PCV2 foram avaliadas neste exemplo que incluiu uma dose alta (16 µg) de antígeno de rORF2 em adjuvante com IMS 1314 administrado duas vezes, uma dose alta (16 µg) de antígeno de vORF2 em adjuvante com Carbopol administrado uma vez a um grupo de porcos e duas vezes a um segundo grupo de porcos, uma dose alta (16 µg) de antígeno de rORF2 em adjuvante com Carbopol administrado duas vezes, uma dose de 4 µg de antígeno de rORF2 em adjuvante com Carbopol administrado duas vezes, uma dose de 1 µg de antígeno de rORF2 em adjuvante com Carbopol administrado duas vezes, uma dose baixa (0,25 µg) de antígeno de rORF2 em adjuvante com Carbopol administrado duas vezes e uma dose alta (> 8 log) de vacina de PCV2 morto de célula inteira em adjuvante com Carbopol. Além de tudo, o Grupo 1, que recebeu duas doses de 16 µg de rORF2 - IMS 1314, desempenhou-se ligeiramente melhor que os Grupos 2 a 7, que receberam vacinas contendo vários níveis de vORF2 ou de antígeno de rORF2 em adjuvante com Carbopol e muito melhor que o Grupo 8, que recebeu duas doses de vacina de PCV2 morto de célula inteira, Grupo 1, teve o terceiro ADWG mais alto $816,46 \pm 136,07$ g/dia ($1,80 \pm 0,30$ lb/dia), a incidência mais baixa de comportamento anormal (0 %), a incidência mais baixa de respiração anormal (0 %), uma incidência baixa de tosse (7,1 %), uma incidência baixa de sintomas clínicos gerais (7,1 %), foi ligado com três outros grupos para a taxa de

mortalidade mais baixa (0 %), a segunda taxa mais baixa para % média de lesões pulmonares ($0,15 \pm 0,34$ %), a segunda taxa mais baixa para pneumonia (21,4 %) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos de IHC positivos (0 %). Porém, Grupo 1 foi o único grupo em que reações do sítio de injeção foram observadas, que incluiu 50 % dos vacinados 1 dia após a segunda vacinação. As outras vacinas administradas aos Grupos 2 a 7 desempenharam-se melhor que a vacina morta e quase como também a vacina administrada ao Grupo 1.

[00166] Grupo 8, que recebeu duas doses de Vacina de PCV2 morto em adjuvante com Carbopol, teve o pior conjunto de resultados para qualquer grupo de vacina. Grupo 8 teve o ADWG mais baixo $421,84 \pm 149,68$ g/dia ($0,93 \pm 0,33$ lb/dia), a segunda taxa mais alta de comportamento anormal (6,7 %), a taxa mais alta de respiração anormal (6,7 %), foi ligado com três outros grupos para a taxa de incidência geral mais alta de sintomas clínicos (13,3 %), teve a taxa de mortalidade mais alta de todos os grupos (20 %) e teve a taxa positiva de IHC mais alta (80 %) de qualquer grupo de vacina. Houve preocupação que a vacina de PCV2 morto de célula inteira pode não ter sido inativada completamente antes da administração ao Grupo 8 que pode explicar este os resultados ruins do grupo. Infelizmente, dados definitivos não estavam disponíveis para confirmar esta preocupação. Além de tudo, no contexto deste exemplo, uma vacina de PCV2 Morto Convencional não auxiliou na redução da doença associada a PCV2.

[00167] Como previamente mencionado, nenhum evento adverso foi associado às vacinas de teste com exceção da vacina em adjuvante com IMS 1314. Reações de sítio de injeção foram observadas em 50,0 % dos porcos 1 dia após a segunda vacinação com a vacina formulada com IMS 1314 e em 28,6 % dos porcos 2 dias após a segunda vacinação. Nenhuma reação foi observada em qualquer porco recebendo vacinas em adjuvante com Carbopol. Quaisquer outros estudos

que inclui porcos vacinados com vacinas em adjuvante com IMS 1314 deveriam continuar a monitorar de perto os porcos para reações do sítio de injeção.

[00168] Todos os porcos foram soronegativos para PCV2 no Dia -3 e apenas o Grupo 2 teve uma titulação acima de 100 no Dia 14. No Dia 25 (dia do desafio), Grupo 8 teve a titulação de anticorpo de PCV2 mais alta (4619), seguido pelo Grupo 2 (2507). Com a exceção dos Grupos 7, 9 e 10, todos os grupos demonstraram uma resposta de anticorpo forte pelo dia 32. Do dia 50, todos os grupos incluindo Grupos 7, 9 e 10 demonstraram uma resposta de anticorpo forte.

[00169] Uma das marcas de infecção de PCV2 de estágio tardio e desenvolvimento de PMWS subsequente é retardamento de crescimento em porcos desmamados, e em casos severos, perda de peso é observada. Ganho de peso diário médio dos grupos é um método quantitativo de demonstrar retardamento de crescimento ou perda de peso, neste exemplo, não houve uma diferença grande em ADWG entre os grupos. Grupo 8 teve o ADWG mais baixo de $399,16 \pm 131,54$ g/dia ($0,88 \pm 0,29$ lb/dia), enquanto o Grupo 4 teve o ADWG mais alto de $526,16 \pm 117,93$ g/dia ($1,16 \pm 0,26$ lb/dia). Dentro do contexto deste estudo não houve uma diferença suficiente entre os grupos para basear a eficácia da vacina futura em ADWG.

[00170] Além da perda de peso - dispnéia, letargia, palidez da pele e às vezes icterícia são sintomas clínicos associados à PMWS. Neste exemplo, comportamento anormal e respiração anormal e tosse foram infreqüentemente observadas para cada grupo. Como comprovado neste estudo, este modelo de desafio e cepa de desafio não resultam sintomas clínicos subjugantes e este não é um parâmetro forte para basear a eficácia da vacina.

[00171] Além de tudo, as taxas de mortalidade não foram altas neste exemplo e a carência de uma taxa de mortalidade alta no grupo de

controle de desafio limita este parâmetro para basear a eficácia da vacina. Antes do Dia 46, os Grupos 4 e 7 cada um tiveram um entre quinze porcos mortos, Grupo 9 teve dois entre quatorze porcos mortos e Grupo 8 teve três entre quinze porcos mortos. Devido ao fato que o Grupo 9, o grupo de controle de desafio, não estava demonstrando sintomas clínicos de PCV2 e apenas duas mortes tinham ocorrido neste grupo pelo dia 46, vacina de Vírus de Síndrome Respiratória e Reprodutiva Porcina (PRRSV) de MLV foi administrada a todos os porcos no Dia 46. Estudos anteriores tinham utilizado INGELVAC® PRRS MLV como um imunoestimulante para exasperar doença de PMWS associada a PCV2 e as taxas de mortalidade foram mais altas nestes estudos anteriores. Duas mortes ocorreram logo após administrar a vacina de PRRS no Dia 46 - Grupo 4 teve uma morte no Dia 46 e Grupo 7 teve uma morte no Dia 47 - que provavelmente não foram associadas à administração da vacina de PRRS. Do dia 50, Grupo 8, que recebeu duas doses de vacina morta, teve a taxa de mortalidade mais alta (20 %), seguido pelo Grupo 9 (controle de desafio) e Grupo 7 (0,25 ug de rORF2 - Carbopol), com taxas de mortalidade de 14,3 % e 13,3 % respectivamente. Além de tudo, administração da vacina de PRRS ao modelo de desafio tardio na fase de observação pós-desafio deste exemplo não aumentou as taxas de mortalidade significativamente.

[00172] Lesões graves em porcos com PMWS secundária à infecção de PCV2 tipicamente consistem em linfadenopatia generalizada em combinação com um ou mais dos seguintes: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígados atrofiados mosqueados, (4) úlceras gástricas e (5) nefrite. A necropsia (Dia 50), icterícia, hepatite e nefrite não foram observadas em qualquer grupo. Uma úlcera gástrica foi observada em um porco do Grupo 7, mas linfadenopatia não foi especificamente examinada. Com

base na presença de lesões que foram consistentes com a infecção de PCV2, três grupos tiveram pelo menos um porco em tentativa diagnosticado com PCV2 (PMWS). Grupo 8, que recebeu duas doses de vacina morta, teve 20 % em tentativa diagnosticado com PCV2, enquanto o Grupo 7 e Grupo 4 tiveram 13,3 % e 6,7 %, respectivamente, em tentativa diagnosticado com PCV2. A % média de contagens de lesões pulmonares variaram entre os grupos na necropsia. Grupos 1, 2, 3, 4 6 e 10 tiveram % de contagens baixas de lesões pulmonares que variaram de $0,11 \pm 0,38$ % a $0,90 \pm 0,15$ %. Como esperado, Grupo 9, o grupo de controle de desafio, teve a % média mais alta de contagem de lesões pulmonares ($10,81 \pm 23,27$ %). Em quatro grupos, a % média de contagens de lesões pulmonares foi elevada devido a um a três porcos em cada um destes grupos tendo contagens de lesões pulmonares muito altas. As lesões pulmonares foram vermelhas/roxas e consolidadas. Tipicamente, lesões pulmonares associadas à PMWS são descritas como marrom claro, não-desmanchável com edema interlobular. As lesões pulmonares observadas neste estudo não estavam associadas à infecção de PCV2 ou um segundo agente infeccioso pulmonar pode ter estado presente. Dentro do contexto deste estudo, a % de classificações de lesões pulmonares provavelmente não reflete uma verdadeira medida da quantidade de infecção pulmonar devido à PCV2. Igualmente, diagnose de tentativa de pneumonia pode ter sido também sobre-utilizada também. Quaisquer porcos com lesões pulmonares, alguns tão pequenos quanto 0,10 % foram listados com uma diagnose de tentativa de pneumonia. Neste exemplo, não houve nenhuma diferença suficiente entre os grupos com respeito às lesões graves e % lesões pulmonares para basear a eficácia da vacina.

[00173] Resultados de IHC mostraram as diferenças maiores entre os grupos. Grupo 1 (16 µg de rORF2 - IMS 1314) teve os resultados de IHC positivo mais baixos para antígeno de PCV2 (0 %); enquanto

os Grupos 9 e 10 tiveram os resultados de IHC positivo mais altos respectivamente com taxas de incidência de 100 % e 93,3 %.

[00174] Grupos 3, 5, 6 e 7, que receberam 16, 4, 1 ou 0,25 µg de antígeno de rORF2, respectivamente, em adjuvante com Carbopol, tiveram taxas positivas de IHC de 20 %, 20 %, 40 % e 46,7 %, respectivamente. Grupo 2, que recebeu duas doses de 16 µg em adjuvante de vORF2 com Carbopol, teve uma taxa positiva de IHC de 6,7 %, enquanto o Grupo 4, que recebeu apenas uma dose da mesma vacina, teve uma taxa positiva de IHC de 13,3 %. Devido à natureza objetiva deste teste e o fato que os resultados de IHC correlataram com os resultados esperados, teste de IHC provavelmente é um dos melhores parâmetros para basear a eficácia da vacina.

[00175] Desse modo em um aspecto da presente invenção, a Dosagem Protetora Mínima (MPD) de antígeno de rORF2 de PCV2 em adjuvante com Carbopol no modelo de porco de CDCD em face a um desafio de PCV2 é determinada. Grupos 3, 5, 6 e 7 cada um recebeu duas doses de em adjuvante de antígeno de rORF2 com Carbopol, mas o nível de antígeno de rORF2 variou para cada grupo. Grupos 3, 5, 6 e 7 cada um recebeu 16, 4, 1 ou 0,25 µg de antígeno de rORF2 respectivamente. Em geral, diminuindo o nível de antígeno de rORF2 diminuiu as titulações de anticorpo de PCV2, e aumentou a taxa de mortalidade, % média de lesões pulmonares e a incidência de tecidos de IHC positivos. Dos quatro grupos recebendo níveis variados de rORF2 - Carbopol, Grupos 3 e 5 que receberam duas doses de 16 ou 4 µg de antígeno de rORF2, respectivamente, cada teve uma taxa positiva de IHC de apenas 20 %, e cada teve titulações de anticorpo similares. Além de tudo, com base nos resultados positivos de IHC, a dosagem protetora mínima de antígeno de rORF2 administrada duas vezes é aproximadamente 4 µg.

[00176] Em outro aspecto da presente invenção, a antigenicidade

de antígenos de PCV2 recombinantes (rORF2) e VIDO R-1 (vORF2) foi avaliada. Grupo 2 recebeu duas doses de 16 µg de vORF2 e Grupo 3 recebeu duas doses de 16 µg de rORF2. Ambas as vacinas foram dadas em adjuvante com Carbopol. Ambas as vacinas foram observadas ser seguras e ambas tiveram 0 % de taxa de mortalidade. Grupo 2 teve uma titulação de anticorpo de PCV2 de 2507 no Dia 25, enquanto o Grupo 3 teve uma titulação de anticorpo de PCV2 de 1503, Grupo 3 teve uma % média de contagem de lesões pulmonares mais baixa que o Grupo 2 ($0,11 \pm 0,38$ % vs. $0,90 \pm 0,15$ %), mas Grupo 2 teve um taxa de IHC de incidência positiva mais baixa que o Grupo 3 (6,7 % vs. 20 %). No geral, ambas as vacinas tiveram antigenicidade similar, mas vORF2 foi associado a resultados de IHC ligeiramente melhores.

[00177] Em ainda outro aspecto da presente invenção, a conveniência de dois adjuvantes diferentes (Carbopol e IMS 1314) foi determinada. Grupos 1 e 3 ambos receberam duas doses de vacina contendo 16 ug de antígeno de rORF2, mas o Grupo 1 recebeu o antígeno em adjuvante com IMS 1314 enquanto o Grupo 3 recebeu o antígeno em adjuvante com Carbopol. Ambos os grupos tiveram essencialmente o mesmo ADWG, essencialmente a mesma incidência de pós-desafio de sinais clínicos, a mesma taxa de mortalidade e essencialmente a mesma % média de lesões pulmonares; mas o Grupo 1 teve um taxa positiva de IHC de 0 % enquanto o Grupo 3 teve um taxa positiva de IHC de 20 %. Porém, o Grupo 3, que recebeu a vacina em adjuvante com Carbopol, teve titulações de PCV2 de IFAT mais altas nos Dias 25, 32 e 50 que o Grupo 1, que recebeu a vacina em adjuvante com IMS 1314. Além de tudo, embora a vacina de PCV2 em adjuvante com IMS 1314 forneça melhores resultados de IHC, não forneceu proteção predominantemente melhor da infecção de PCV2 e induziu reação do sítio de injeção. Enquanto que a vacina de PCV2 em adjuvante com Carbopol quase desempenhou-se quase tão bem quanto a vacina em

adjuvante com IMS 1314, mas não foi associada a nenhum evento adverso.

[00178] Em ainda outro aspecto da presente invenção, a viabilidade de ORF2 de PCV2 como um produto de 1 dose de 1 mL foi determinada. Grupos 2 e 4 ambos receberam 16 µg de vacina de vORF2 em adjuvante com Carbopol no Dia 0, mas Grupo 2 recebeu uma segunda dose no Dia 14, Grupo 4 teve um ADWG ligeiramente mais alto e uma % média de lesões pulmonares mais baixa que o Grupo 2, mas Grupo 2 teve titulações de PCV2 de IFAT mais altas no Dia 25, 32 e 50, e uma taxa de incidência ligeiramente inferior de tecidos positivos de IHC. Todos os outros resultados para estes dois grupos foram similares. Além de tudo, uma dose de vORF2 em adjuvante com Carbopol desempenhou-se similar às duas doses da mesma vacina.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para recuperar uma proteína recombinante expressa pelo quadro aberto de leitura 2 de PCV2 no sobrenadante, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

A) clonar o referido quadro aberto de leitura recombinante 2 de PCV2 que compreende SEQ ID NO:4 em um vetor de transferência;

B) introduzir a porção do referido vetor de transferência contendo o referido quadro aberto de leitura recombinante 2 em um baculovírus;

C) infectar as células em meios com o referido baculovírus;

D) fazer o referido baculovírus expressar a proteína do referido quadro aberto de leitura 2;

E) separar as células do sobrenadante; e

F) recuperar a referida proteína expressa a partir do quadro aberto de leitura 2 no referido sobrenadante, e não do interior das células, pelo menos cinco dias após infectar as células com o referido baculovírus.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de amplificar o referido quadro aberto de leitura 2 de uma cepa de PCV2 antes de clonar o referido quadro aberto de leitura no referido vetor de transferência.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a referido quadro aberto de leitura recombinante 2 compreende ainda uma sequência selecionada do grupo que consiste em uma sequência 5' de Kozak, um sítio 3' de EcoR1 e combinações das mesmos.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a referida sequência de 5' Kozak compreende SEQ ID NO:1.

5. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o referido sítio 3' de EcoR1 compreende SEQ ID NO:2.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o referido quadro aberto de leitura de PCV2 compreende SEQ ID NO:4.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a referida proteína recombinante compreende SEQ ID NO:6.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que os referidos meios compreendem meios de célula de inseto livres de soro.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que compreendendo ainda as etapas de:

i) antes da etapa A, clonar o referido quadro aberto de leitura 2 amplificado em um primeiro vetor;

ii) excisar o referido quadro aberto de leitura 2 do referido primeiro vetor; e

iii) usar o referido quadro aberto de leitura 2 excisado na etapa A.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que as referidas células compreendem células de SF+.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a referida porção transfectada compreende SEQ ID NO:4.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a proteína de quadro aberto de leitura 2 é secretada pelas células no meio de crescimento que

as cerca; e em que a proteína de quadro aberto de leitura 2 é recuperada do sobrenadante, ao invés de dentro das células.

13. Processo de preparação de uma composição para invocar uma resposta imune contra PCV2, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

i) introduzir uma construção em um baculovírus, a referida construção compreendendo DNA recombinante do quadro aberto de leitura 2 de PCV2 que compreende SEQ ID NO:4;

ii) infectar células com o referido baculovírus modificado, as referidas células estando em um meio de crescimento;

iii) fazer o referido baculovírus expressar a proteína recombinante do referido quadro aberto de leitura 2;

iv) pelo menos cinco dias após infectar as referidas células com o referido baculovírus, recuperar a referida proteína do quadro aberto de leitura 2 expressa no sobrenadante, e não do interior das células, por as células terem sido removidas; e

v) combinar a referida proteína recuperada com um adjuvante adequado ou outro veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de obter a referida construção a partir de um vetor de transferência.

15. Processo de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de amplificar o referido quadro aberto de leitura 2 de uma cepa de PCV2 antes de clonar o referido quadro aberto de leitura 2 no referido vetor de transferência.

16. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, caracterizado pelo fato de que o referido quadro aberto de leitura 2 recombinante compreende ainda uma sequência selecio-

nada do grupo que consiste em uma sequência 5' de Kozak , um sítio 3' de EcoR1 e combinações das mesmas.

17. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida sequência 5' de Kozak compreende SEQ ID NO:1.

18. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o referido sítio 3' de EcoR1 compreende SEQ ID NO:2.

19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 18, caracterizado pelo fato de que o referido quadro aberto de leitura 2 de PCV2 compreende SEQ ID NO:4.

20. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 19, caracterizado pelo fato de que a referida proteína recombinante compreende SEQ ID NO:6.

21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 20, caracterizado pelo fato de que os referidos meios compreendem meios de célula de inseto livres de soro.

22. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 21, caracterizado pelo fato de que compreende ainda as etapas de:

i) clonar o referido quadro aberto de leitura 2 amplificado em um primeiro vetor;

ii) excisar o referido quadro aberto de leitura 2 do referido primeiro vetor; e

iii) usar o referido quadro aberto de leitura 2 excisado para clonar no referido vetor de transferência.

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 22, caracterizado pelo fato de que as referidas células compreendem células SF+.

24. Processo de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 13 a 23, caracterizado pelo fato de que a referida construção transfectada compreende SEQ ID NO:4.

25. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 24, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de recuperação compreende ainda a etapa de separar os ditos meios das ditas células e restos de células.

26. Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de separação inclui a etapa de filtrar as referidas células, restos de células e meios de crescimento através de um filtro tendo poros com uma variação de tamanho de cerca de 0,45 μm a cerca de 1,0 μm .

27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 26, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de inativar o referido baculovírus antes de combinar a referida proteína recuperada com um adjuvante adequado.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 27, caracterizado pelo fato de que a proteína do quadro aberto de leitura 2 recombinante expressa é secretada pelas células no meio de crescimento que as cerca; e em que a proteína de quadro aberto de leitura 2 é recuperada do sobrenadante, ao invés de dentro das células.

29. Processo para recuperação de uma proteína expressa pelo quadro aberto de leitura 2 de PCV2, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

i) infectar as células em meios de crescimento com um vetor de baculovírus contendo o referido quadro aberto de leitura 2 de PCV2 que compreende a SEQ ID NO:4;

ii) fazer o referido vetor expressar a referida proteína; e

iii) pelo menos 5 dias após a infecção das células com o referido vetor de baculovírus, recuperar a referida proteína do quadro

aberto de leitura 2 expressa no sobrenadante, e não do interior das células, por as células terem sido previamente removidas.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a proteína do quadro aberto de leitura 2 recombinante expressa é secretada pelas células no meio de crescimento que as cerca; e em que a proteína de quadro aberto de leitura 2 é recuperada do sobrenadante, ao invés de dentro das células.

31. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o material obtido por um processo como definido em qualquer uma das reivindicações 13, 28 ou 30 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

32. Composição de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que é para uso como um medicamento.

33. Uso da composição como definida na reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para prevenção de uma infecção por PCV2.

34. Processo para produzir um kit diagnóstico para a detecção de uma infecção por PCV2 em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

i) produzir uma proteína recombinante usando um processo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28; e

ii) empacotar a referida proteína recombinante em um recipiente adequado.

35. Processo de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de incluir um manual de instruções com o recipiente que empacota a proteína recombinante.

FIG 1

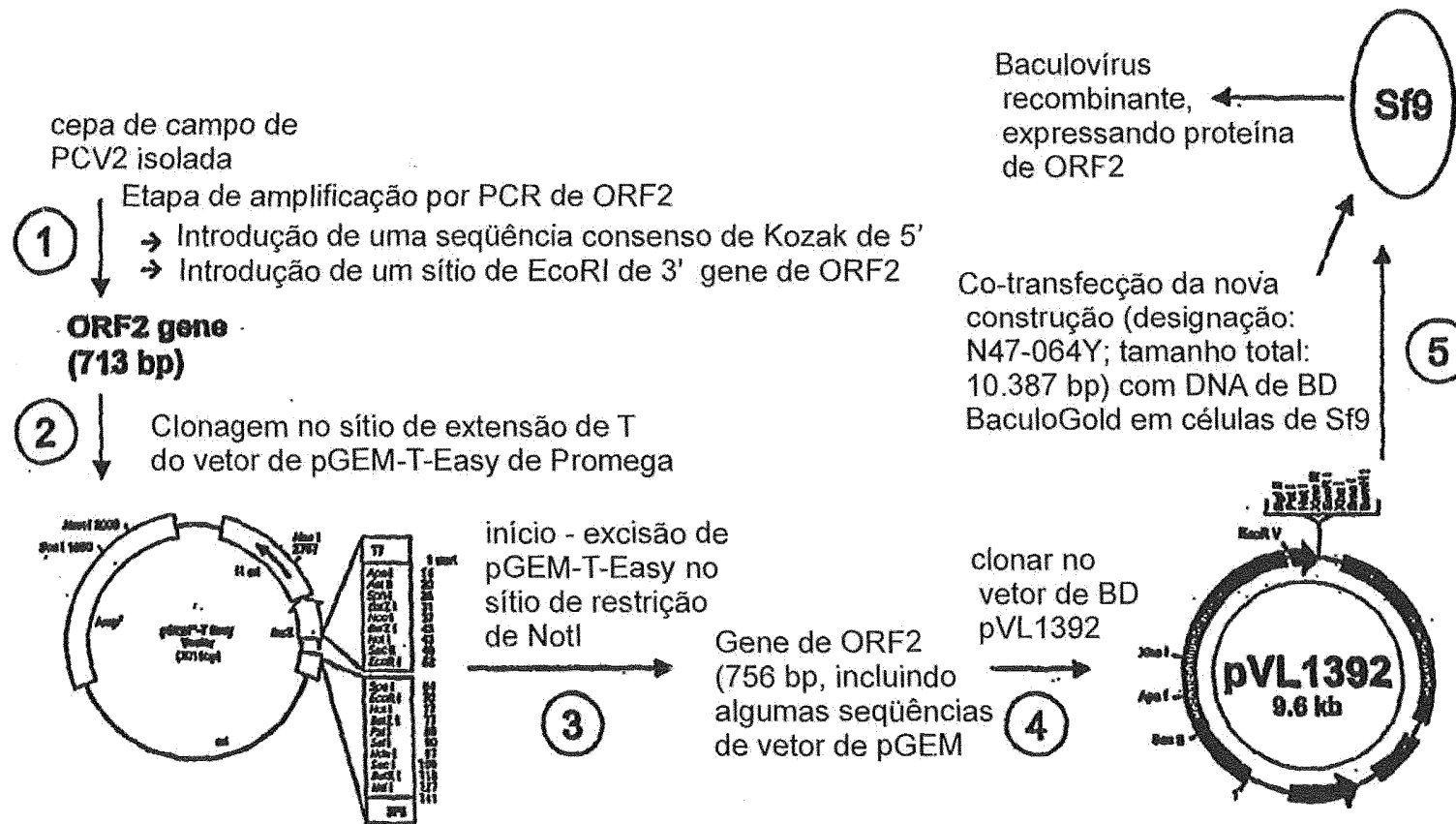


FIG 2(a)

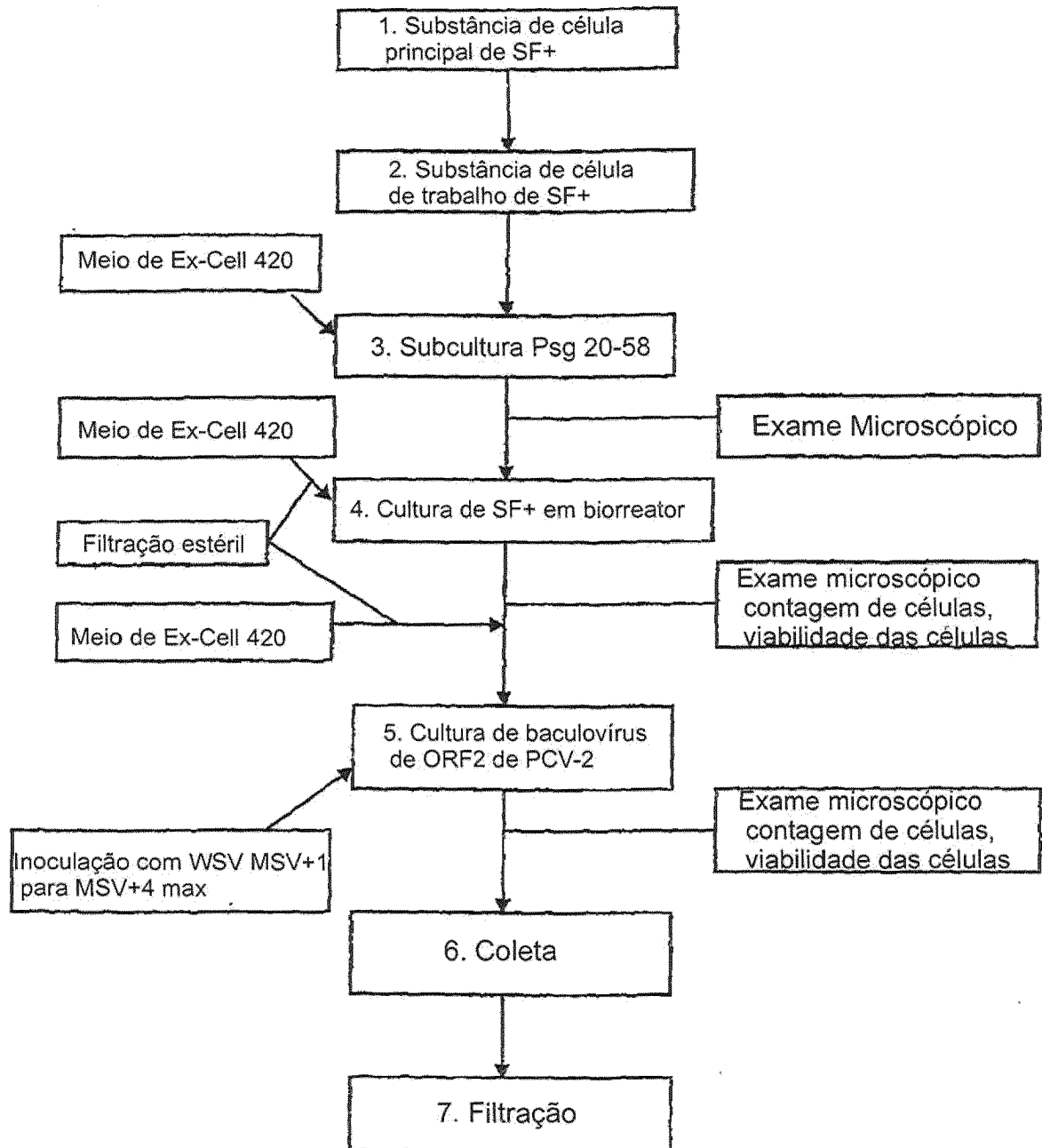


FIG 2(b)

