



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112012004698-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 02/09/2010**

**(45) Data de Concessão: 08/03/2022**

**(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA DE PCV-2**

**(51) Int.Cl.: A61K 39/12.**

**(30) Prioridade Unionista: 01/03/2010 US 61/309,408; 02/09/2009 US 61/239,192.**

**(73) Titular(es): BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA INC..**

**(72) Inventor(es): CAROLINE ANN KOHLER; GUOSONG ZHAO; ALI KHAZRAEINAZMPOUR; BERND COLIN EICHEN-MUELLER; MARC EICHMEYER; GREGORY HAIWICK; MERRILL SCHAEFFER.**

**(86) Pedido PCT: PCT US2010047654 de 02/09/2010**

**(87) Publicação PCT: WO 2011/028888 de 10/03/2011**

**(85) Data do Início da Fase Nacional: 01/03/2012**

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA DE PCV-2, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO E SEU USO, E COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E MÉTODO PARA APRIMORAMENTO SUA IMUNOGENICIDADE CONTRA CIRCOVÍRUS SUÍNO. A presente invenção proporciona métodos de redução de atividade virucida de uma composição compreendendo um antígeno PCV-2, bem como preparados antigênicos e composições imunogênicas compreendendo um antígeno PCV-2, em que a atividade virucida foi reduzida. Além disso, a presente invenção refere-se também a um método de aumento da imunogenicidade de uma composição imunogênica compreendendo um antígeno PCV-2, bem como uma composição imunogênica com imunogenicidade aumentada.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"MÉTODO DE PRODUÇÃO DE COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA DE  
PCV-2".**

[0001] O presente pedido refere-se a e reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório U.S. No. 61/309.408, o qual foi depositado em 1 de Março de 2010 e Pedido de Patente Provisório U.S. No. 61/239.192, o qual foi depositado em 2 de Setembro de 2009. Todos os quais são incorporados aqui por referência na íntegra. Todos os pedidos são comumente cedidos.

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIA**

[0002] O presente pedido inclui uma listagem de sequência de acordo com 37 C.F.R. 1.821 – 1.825. A listagem de sequência que acompanha o presente pedido é aqui incorporada por referência na íntegra.

**ANTECEDENTES**

**Campo da Invenção**

[0003] A presente invenção refere-se a métodos e composições para redução da atividade virucida de composições que normalmente exibiriam algum grau de atividade virucida. Mediante o uso dos métodos da presente invenção, a atividade virucida de tais composições pode ser reduzida em comparação com a atividade virucida de uma composição que não inclui as etapas da presente invenção. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a métodos para produção de composições antigênicas de Circovírus Suíno do Tipo II (PCV-2), de modo que elas mostrem relativamente pouca ou nenhuma atividade virucida quando comparado à composições conhecidas na técnica usando métodos de detecção atuais e, em particular, quando comparado com composições não produzidas por meio de um método de acordo com a presente invenção. A presente invenção refere-se ainda a uma nova

composição imunogênica, de preferência uma composição contendo PCV-2 produzida de acordo com o método proporcionado pelo presente pedido de patente, de preferência caracterizada por atividade virucida reduzida ou nenhuma com relação à composições comparáveis descritas na técnica. De acordo com um outro aspecto, a presente invenção também proporciona composições imunogênicas compreendendo antígeno PCV-2 purificado, de preferência antígeno PCV-2 purificado com uma imunogenicidade aprimorada.

### **Descrição da Técnica Anterior**

[0004] Circovírus suíno do tipo 2 (PCV-2) é um pequeno (17-22 nm de diâmetro) vírus de DNA sem envoltório, icosaédrico, sem envoltório o qual contém um genoma circular fita simples. O PCV-2 compartilha aproximadamente 80% de identidade de sequência com o circovírus suíno do tipo 1 (PCV-1). Contudo, em contraste com o PCV-1, o qual geralmente é não virulento, suínos infectados com PCV-2 exibem uma síndrome comumente referida como Síndrome de Falência Multi-sistêmica Pós-desmame (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS). A PMWS é clinicamente caracterizada por falência, palidez da pele, mau estado geral, dificuldade respiratória, diarréia, icterícia e pele amarelada. Em alguns suínos afetados, uma combinação de todos os sintomas será evidente, enquanto que outros suínos terão apenas um ou dois desses sintomas. Durante necropsia, lesões microscópicas e macroscópicas também aparecem sobre múltiplos tecidos e órgãos, com órgãos linfoides sendo os locais mais comuns para lesões. Uma forte correlação foi observada entre a quantidade de ácido nucleico ou antígeno PCV-2 e a gravidade das lesões linfoides microscópicas. Taxas de mortalidade para suínos infectados com PCV-2 podem se aproximar de 80%. Além de PMWS, o PCV-2 foi associado à diversas outras infecções, incluindo pseudo-raiva, síndrome reprodutiva e

respiratória suína (Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome - PRRS), doença de Glasser, meningite estreptocócica, salmonelose, colibacilose pós-desmame, hepatose diabética e broncopneumonia supurativa.

[0005] Diversas vacinas estão disponíveis para reduzir o impacto de infecções por PCV-2 em porcos. A Patente U.S. No. 6.703.023 proporciona uma vacina baseada em DNA para a profilaxia de porcos contra PMWS. No documento WO 03/049703, a produção de uma vacina químérica viva é descrita compreendendo o vírus PCV1 não patogênico na qual, contendo, a proteína ORF2 é substituída pela proteína ORF2 do PCV-2 patogênico. Os documentos WO 99/18214 e WO 99/29717 proporcionaram várias cepas de PCV-2 e procedimentos para o preparo de uma vacina de PVC2 morto. Preparo de vacinas de subunidade também foi descrito nos documentos WO 99/18214 e WO 99/29717. Uma vacina de subunidade baseada em ORF2 eficaz foi reportada no documento WO 06/072065. Uma outra vacina de subunidade baseada em ORF-2 é descrita também no documento WO 07/28823. Contudo, nenhuma das vacinas descritas na técnica anterior inclui um antígeno PCV-2 não virucida e/ou purificado, de preferência um antígeno ORF2 de PCV-2 altamente purificado.

[0006] Composições imunogênicas contra PCV-2 e várias composições imunogênicas contra outros patógenos frequentemente têm um efeito virucida sobre outros抗ígenos. Normas regulatórias atuais (9 CFR 113.35) permitem alguma atividade virucida em composições multivalentes, mas essa atividade virucida não pode resultar em uma perda de mais de 0,7 logs/ml de um vírus vivo ou menos de 0,7 logs/ml de CFU de bactérias vivas quando combinado com os outros componentes da composição imunogênica. Composições que têm mais atividade virucida do que permitido não

podem ser combinadas com outros抗ígenos para criar uma vacina multivalente.

[0007] A proteína do quadro de leitura aberta 2 (Open Reading Frame 2 - ORF2) de PCV-2 tendo um peso molecular aproximado de 30 kDa quando passada sobre um gel de SDS-PAGE foi utilizada no passado como um composto antigenico em vacinas e composições imunogênicas para PCV-2. Métodos típicos de obtenção de ORF2 para uso em tais vacinas e composições geralmente consistem de amplificação do DNA de PCV-2 que codifica a ORF2, expressão da proteína ORF2 dentro de uma célula hospedeira e extração da proteína ORF2 da célula hospedeira via lise celular. O lisato celular de ORF2 recuperado é, então, usado como a porção antigenica de uma composição imunogênica ou vacina. Em alguns casos, a ORF2 contendo o lisato celular é separada dos resíduos celulares.

[0008] O que é necessário é um método para redução da atividade virucida de composições imunogênicas contendo PCV-2 e抗ígenos nas mesmas, de modo que os requisitos regulatórios possam ser reunidos e composições multivalentes eficazes possam ser administradas. O que é ainda necessário são métodos para diminuição ou redução da atividade virucida e o efeito de composições contendo PCV-2 sobre o Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus - PRRSV). O que é ainda necessário são composições imunogênicas que tenham sofrido os métodos da presente invenção, de modo que sua atividade virucida tenha sido reduzida para padrões aceitáveis e podem ser combinadas com outros抗ígenos para formar composições imunogênicas multivalentes.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] A prática da presente invenção empregará, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais de biologia molecular,

microbiologia, tecnologia de DNA recombinante, química de proteína e imunologia, as quais estão dentro da capacidade no campo. Tais técnicas são totalmente explicadas na literatura. Vide, por exemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. I, II e III, Segunda Edição (1989); DNA Cloning, Vols. I e II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R. K. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL press, 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); a série Methods In Enzymology (S. Colowick e N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Protein purification methods – a practical approach (E.L.V. Harris e S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); e Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir e C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

[00010] Antes de descrever a presente invenção em detalhes, deve ser entendido que a presente invenção não está limitada a DNA, sequências polipeptídicas ou parâmetros de processo particulares uma vez que os mesmos podem, naturalmente, variar. Deve ser também entendido que a terminologia usada aqui é para fins de descrição de modalidades particulares da invenção apenas e não se destina a ser limitativa. Deve ser ainda notado que, conforme usado na presente especificação e reivindicações em anexo, as formas no singular "um", "uma", "a" e "o" incluem referências no plural, a menos que o contexto oriente claramente de outro modo. Assim, por exemplo, referência a "um antígeno" inclui uma mistura de dois ou mais antígenos, referência a "um excipiente" inclui misturas de dois ou mais excipientes e semelhantes.

[00011] A presente invenção resolve os problemas inerentes na técnica anterior e proporciona um avanço distinto no estado da

técnica. Em geral, a presente invenção proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2 e ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2. De preferência, o antígeno PCV-2 é usado como está ou na composição antigênica de PCV-2.

[00012] Para fins da presente invenção, um "primeiro líquido" refere-se a meios líquidos, aquosos ou fluidos tipicamente usados em combinação com células, antígenos, composições imunogênicas, vacinas e semelhantes. De preferência, o primeiro líquido compreende meios de uma composição antigênica, mais preferivelmente o primeiro líquido compreende ou de preferência consiste de meio de cultura celular usado para a produção de proteínas recombinantes em células hospedeiras cultivadas. As células hospedeiras cultivadas podem ser bactérias, leveduras, células de inseto, células animais e células de mamífero, com células de inseto e mamífero sendo particularmente preferidas. Assim, o primeiro fluido pode compreender ou consistir de meios para o cultivo de bactérias, leveduras, células de inseto, células animais ou células de mamífero. De preferência, o meio celular é um meio celular isento de soro e, mais preferivelmente, o meio de cultura é meio isento de soro EX-CELL® 420, quando células de inseto são usadas. O EX-CELL® 420 é um meio completo que é isento de proteína e contém L-glutamina e foi desenvolvido e otimizado para crescimento isento de soro de linhagens de células de inseto Sf9 e Sf21.

[00013] Um "segundo líquido", para fins da presente invenção, refere-se a qualquer líquido normalmente usado em combinação com células, antígeno, composições imunogênicas, vacinas e semelhantes, o qual é diferente do primeiro líquido. De preferência, o segundo líquido é uma solução aquosa, ainda mais preferivelmente uma

solução farmaceuticamente aceitável e, ainda mais preferivelmente, um tampão, tal como uma solução salina ou tampão de fosfato e semelhantes. Mais preferivelmente, o segundo fluido é caracterizado por não ser virucida para qualquer vírus vivo ou qualquer bactéria viva (aqui, a menos que de outro modo explicitamente estabelecido ou evidente a partir do contexto, o termo "virucida" é inclusivo de atividade bactericida), quando o vírus vivo ou bactéria viva é cultivada em ou armazenada em tal fluido.

[00014] "Porção", para fins da presente invenção, refere-se à qualquer quantidade a qual não abrange a quantidade toda. Por exemplo, uma porção de líquido seria qualquer coisa de menos de 100% do volume do líquido, tal como 90% do líquido, 80% do líquido, 70% do líquido e todas as quantidades entre mais de 0% e menos de 100%.

[00015] Um "antígeno PCV-2" refere-se à qualquer composição de matéria que compreende pelo menos um antígeno que pode induzir, estimular ou intensificar a resposta imune contra infecção por PCV-2, quando administrada a um animal, de preferência a um porco. De preferência, o antígeno PCV-2 é o vírus PCV-2 integral, de preferência em uma forma inativada, um vírus PCV-2 vivo modificado ou atenuado, um vírus quimérico que compreende pelo menos uma sequência de aminoácido imunogênica de PCV-2 ou qualquer outro polipeptídeo ou componente que compreende pelo menos uma sequência de aminoácido imunogênica de PCV-2, de preferência ORF2. Os termos "proteína imunogênica", "polipeptídeo imunogênico" ou "sequência de aminoácido imunogênica", conforme usado aqui, refere-se à qualquer sequência de aminoácido de PCV-2 a qual estimula uma resposta imune em um hospedeiro contra PCV-2. De preferência, tal proteína imunogênica, polipeptídeo imunogênico ou aminoácido imunogênico de PCV-2 é qualquer um daqueles

divulgados ou fornecidos no Pedido de Patente Internacional WO2006/072065 (os conteúdos e ensinamentos do qual são aqui incorporados por referência) ou é qualquer outro polipeptídeo de PCV-2 conhecido na técnica. Por exemplo, uma sequência representativa de DNA de ORF2 de PCV-2 compreende a sequência de nucleotídeo com No. de Acesso ao Genbank AF086834 (SEQ ID NO: 3) and SEQ ID NO: 4.

[00016] Contudo, deve ser entendido por aqueles versados no campo que essa sequência poderia variar em tanto quanto 1-10% quanto à 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 por meio do experimento de estímulo, conforme fornecido pelo Exemplo 4 do documento WO06/072065. Além disso, a característica antigênica de um antígeno modificado ainda é retida quando o antígeno modificado confere pelo menos 70%, de preferência 80%, mais preferivelmente 90% ou mais de imunidade protetora quando comparado com a proteína ORF2 de PCV-2, codificada pela sequência de polinucleotídeo de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4, conforme proporcionado no documento WO06/072065. Antígenos ORF2 de PCV-2 ainda preferidos são como segue:

- i) um polipeptídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11 do documento WO06/072065;
- ii) qualquer polipeptídeo que é pelo menos 80% homóloga e/ou idêntica ao polipeptídeo de i),
- iii) quaisquer porção imunogênica dos polipeptídeos de i) e/ou ii),
- iv) a porção imunogênica de iii) compreendendo pelo menos 5, de preferência 8, mais preferivelmente 10 aminoácidos

contíguos de qualquer uma das sequências de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11 do documento WO06/072065,

v) um polipeptídeo que é codificado por um DNA compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 do documento WO06/072065;

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

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

viii) a porção imunogênica de vii), em que o polinucleotídeo que codifica a porção imunogênica compreende pelo menos 30 nucleotídeos contíguos incluídos nas sequências de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 do documento WO06/072065.

[00017] A listagem de sequência do documento WO06/072065 é idêntica à listagem de sequência em anexo ao presente pedido.

[00018] De preferência, qualquer uma das porções imunogênicas descritas acima tendo as características antigênicas do antígeno ORF2 de PCV-2 que é codificada pela sequência de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 do documento WO06/072065.

[00019] "Identidade de sequência", conforme é conhecido na técnica, refere-se a uma relação entre duas ou mais sequências polipeptídicas ou duas ou mais sequências de polinucleotídeo, isto é, uma sequência de referência e uma determinada sequência a ser comparada com a sequência de referência. Identidade de sequência é determinada comparando-se a determinada sequência com a sequência de referência após as sequências terem sido otimamente alinhadas para produzir o maior grau de similaridade de sequência, conforme determinado pela correspondência entre trechos de tais

sequências. Quando de tal alinhamento, a identidade de sequência é determinada baseado em posição por posição, por exemplo, as sequências são "idênticas" em uma posição particular se, nessa posição, os resíduos de nucleotídeo ou aminoácido são idênticos. O número total de tais identidades de posição é, então, dividido pelo número total de nucleotídeos ou resíduos na sequência de referência para proporcionar a identidade de sequência %. Como uma ilustração, por um polinucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeo tendo, por exemplo, pelo menos 85%, de preferência 90%, ainda mais preferivelmente 95% de "identidade de sequência" com uma sequência de nucleotídeo de referência, pretende-se que a sequência de nucleotídeo do determinado polinucleotídeo seja idêntico à sequência de referência, exceto que a determinada sequência de polinucleotídeo pode incluir até 15, de preferência até 10, ainda mais preferivelmente até 5 mutações de ponto por cada 100 nucleotídeos da sequência de nucleotídeo de referência. Em outras palavras, em um polinucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeo tendo pelo menos 85%, de preferência 90%, ainda mais preferivelmente 95% de identidade com relação à sequência de nucleotídeo de referência, até 15%, de preferência 10%, ainda mais preferivelmente 5% dos nucleotídeos na sequência de referência podem ser deletados ou substituídos por outro nucleotídeo ou uma série de nucleotídeos até 15%, de preferência 10%, ainda mais preferivelmente 5% dos nucleotídeos totais na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência. Essas mutações da sequência de referência podem ocorrer nas posições 5' ou 3' terminais da sequência de nucleotídeo de referência ou em qualquer parte entre essas posições terminais, interespacadas 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

determinada sequência de aminoácido tendo, por exemplo, pelo menos 85%, de preferência 90%, ainda mais preferivelmente 95% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido de referência, entenda-se que a determinada sequência de aminoácido do polipeptídeo é idêntica à sequência de referência, exceto que a determinada sequência polipeptídica pode incluir até 15, de preferência até 10, ainda mais preferivelmente até 5 alterações de aminoácido por cada 100 aminoácidos da sequência de aminoácido de referência. Em outras palavras, para obter uma determinada sequência polipeptídica tendo pelo menos 85%, de preferência 90%, ainda mais preferivelmente 95% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido de referência, até 15%, de preferência até 10%, ainda mais preferivelmente até 5% dos resíduos de aminoácido na sequência de referência podem ser deletados ou substituídos por outro aminoácido ou uma série de aminoácidos até 15%, de preferência até 10%, ainda mais preferivelmente até 5% do número total de resíduos de aminoácido na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência. Essas alterações da sequência de referência podem ocorrer nas posições amino ou carbóxi terminais da sequência de aminoácido de referência ou qualquer lugar entre essas posições terminais, interespacadas individualmente entre resíduos na sequência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência de referência. De preferência, posições de resíduo que não são idênticas diferem por substituições de aminoácido conservativas. Contudo, substituições conservativas não são incluídas como uma correspondência quando de determinação da identidade de sequência.

[00020] Vírus ou bactéria "viva", para fins da presente invenção, refere-se a um vírus ou bactéria que é capaz de replicação em um hospedeiro. Um vírus vivo preferido e uma bactéria viva preferida da

presente invenção são o vírus de PRRS e a bactéria *Mycoplasma hyopneumonia*, respectivamente. Contudo, o termo vírus vivo ou bactéria viva não está limitado ao vírus de PRRS e *Mycoplasma hyopneumonia*, respectivamente.

[00021] A porção do primeiro líquido pode ser removida do antígeno PCV-2 por uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido, em que o segundo líquido é diferente do primeiro líquido (vide definição de segundo fluido). Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido e em que o segundo líquido é diferente do primeiro líquido. De preferência, a troca da porção do primeiro líquido com o segundo líquido compreende as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 por meio de troca de pelo menos uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido compreendendo as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido, o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do pelo menos PCV-2.

[00022] A porção do primeiro líquido pode ser removida do antígeno PCV-2 através de uma etapa de filtração utilizando um filtro. Contudo, qualquer outro método conhecido por aqueles versados no campo pode ser usado para remover a porção de quaisquer fluidos, incluindo os primeiro e, sempre que aplicável, uma porção do segundo fluido do antígeno PCV-2. Tal método inclui, por exemplo, mas não está limitado a, centrifugação e/ou cromatografia. Contudo, filtração é mais preferida. Um método de filtração preferido para remover a porção do primeiro fluido ou qualquer outro fluido, sempre que aplicável, compreende ultra- e/ou dia-filtração. Ultra- e dia-filtração são métodos padrões conhecidos por aqueles versados no campo descritos, por exemplo, em detalhes em *Protein Purification Methods - A Practical Approach* – editores: E.L.V. Harris e S. Angel, Oxford University Press 1995 (os conteúdos e ensinamentos do qual são aqui incorporados por referência). Em particular, no Capítulo 3 desse livro texto, vários métodos e tipos de equipamento são descritos, todos os quais podem ser usados por aqueles versados no campo de maneira exemplificativa para fins da presente invenção. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de filtração, de preferência dia- ou ultra-filtração. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de pelo menos uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido compreendendo as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido, o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno

PCV-2.

[00023] Conforme definido acima, um segundo líquido preferido para ser usado em qualquer um dos métodos descritos é um tampão, de preferência um tampão fisiologicamente aceitável, com solução salina sendo particularmente preferida. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 através de uma troca contra um tampão, de preferência um tampão fisiologicamente aceitável, tal como solução salina ou tampão de fosfato ou semelhante. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de filtração, de preferência através de dia- e/ou ultra-filtração. Mais preferivelmente, a porção da troca de pelo menos uma porção do primeiro líquido contra o tampão, de preferência o tampão fisiologicamente aceitável, tal como solução salina ou tampão de fosfato ou semelhante, compreende as etapas de a) adição do tampão, de preferência do tampão fisiologicamente aceitável, tal como solução salina ou tampão de fosfato ou semelhante, ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção do primeiro e do fluido o qual é um tampão, de preferência um tampão fisiologicamente aceitável, tal como solução salina ou tampão de fosfato ou semelhante, do antígeno PCV-2, de preferência através de filtração, ainda mais preferivelmente através de dia- e/ou ultra-filtração.

[00024] A etapa de concentração e a etapa de adição de líquido do método conforme descrito aqui podem ser realizadas de modo substancialmente simultâneo ou, alternativamente, a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente

pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 através de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido compreendendo as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, em que a etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial. De preferência, a porção do primeiro líquido e, no caso da adição do segundo líquido, a mistura dos primeiro e segundo fluidos é removida do antígeno PCV-2 por meio de filtração, de preferência através de dia- e/ou ultra-filtração.

[00025] Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Por exemplo, em um outro aspecto, a etapa de adição de líquido ocorre antes da etapa de concentração e, em um aspecto alternativo, a etapa de concentração ocorre antes da etapa de adição de líquido. A etapa de adição de líquido e a etapa de concentração, a despeito da ordem na qual elas são realizadas, pode ser realizada múltiplas vezes. Por exemplo, cada uma dessas respectivas etapas pode ser realizada pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos 10, até tantas vezes quanto desejado. Em um aspecto, a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são, cada uma, realizadas pelo menos duas vezes. Em outro aspecto, a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são, cada uma, realizadas pelo menos três vezes. Assim, de acordo com um outro aspecto do presente pedido, um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 é proporcionado,

em que o método compreende, em geral, as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 através de uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido, em que a troca é realizada múltiplas vezes. De preferência, a troca da porção do primeiro fluido contra uma porção do segundo fluido compreende as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, em que a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, por exemplo, duas vezes, três vezes, 5 vezes, 10 vezes, etc. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas duas vezes, mais preferivelmente três vezes. Conforme descrito acima, filtração é o método preferido para remover uma porção do primeiro líquido ou, no caso de múltiplas etapas de remoção conforme descrito acima, remover uma porção da mistura dos primeiro e segundo fluidos, do antígeno PCV-2.

[00026] O filtro pode ser qualquer filtro convencional na técnica. De preferência, o filtro inclui uma membrana semipermeável. Em uma outra forma preferida, a membrana semipermeável tem um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 para, desse modo, impedir passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e reter o antígeno PCV-2 pelo filtro. Em um outro aspecto, o filtro tem um tamanho médio de poro o qual impede passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente o filtro tem um tamanho médio de poro o qual impede passagem de pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, mais preferivelmente, o filtro tem um tamanho médio de poro o qual impede

passagem de pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como um vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Em ainda um outro aspecto, a membrana semipermeável inclui um material selecionado do grupo consistindo de polissulfona, poliéster sulfona e celulose regenerada. Contudo, qualquer outro material que permite remoção de uma porção do primeiro fluido e, no caso de uma etapa com múltiplos processos, remoção de uma mistura do primeiro e do segundo fluido do antígeno PCV-2 pode ser usado. O filtro pode ser selecionado do grupo consistindo de um cartucho de ultra filtração com membrana de fibra oca, folhas planas ou um cassete, com um cartucho de ultra filtração de membrana de fibra oca sendo particularmente preferido. Assim, de acordo com um outro aspecto do presente pedido, um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 é proporcionado, conforme descrito acima. O método compreende, em geral, as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 através de uma etapa de filtração, em que o filtro é ou compreende, de preferência, uma membrana semipermeável. De preferência, a membrana semipermeável tem um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável impede passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas

semelhantes a vírus. Conforme descrito acima, a etapa de remoção inclui, em geral, a troca da porção do primeiro fluido contra uma porção do segundo fluido compreendendo as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, em que a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, por exemplo, duas vezes, três vezes, 5 vezes, 10 vezes, etc. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas duas vezes, mais preferivelmente três vezes.

[00027] A etapa de concentração do método proporcionado aqui é realizada de modo que o antígeno PCV-2 seja concentrado de 3X a 50X em comparação com o volume do primeiro líquido. Mais preferivelmente, a etapa de concentração é feita de modo que o antígeno PCV-2 seja concentrado 4X a 20X em comparação com o volume do primeiro líquido. Ainda mais preferivelmente, a etapa de concentração é feita de modo que o antígeno PCV-2 seja concentrado de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo a etapa de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 e em que o antígeno PCV-2 é concentrado de 3X a 50X, de preferência de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido. De preferência, a porção do primeiro fluido é removida do antígeno PCV-2 através de uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido compreendendo as etapas de a) adição do

segundo líquido ao primeiro líquido, o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 de 3X a 50X, de preferência de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes. Em tal caso, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita através de filtração - de preferência dia- e/ou ultra-filtração, utilizando um filtro o qual contém, de preferência, uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável impede passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como um vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00028] Em um outro aspecto, a atividade virucida da componente antigênica de PCV-2 produzida por meio dos métodos aqui é reduzida em pelo menos 10% quando comparado com o líquido que não sofreu

o método. Mais preferivelmente, a atividade virucida da composição antigênica de PCV-2 é reduzida em pelo menos 50% quando comparado com o primeiro líquido que não sofreu o método. Ainda mais preferivelmente, a atividade virucida da composição antigênica de PCV-2 é reduzida em pelo menos 70% quando comparado com o primeiro líquido que não sofreu o método.

[00029] Para fins da presente invenção, o termo "atividade virucida" significa que um fluido, solução ou composição inativa ou mata um vírus vivo ou bactérias vivas até determinado ponto, quando o fluido, solução ou composição é misturada com tal vírus vivo ou bactérias vivas. Assim, uma redução da atividade virucida de um fluido, solução ou composição em pelo menos 10% significa que a taxa de sobrevivência de um vírus vivo ou bactérias vivas é 90% maior em um fluido, solução ou composição que sofreu qualquer um dos métodos descritos aqui quando comparado com um fluido, solução ou composição que não sofreu qualquer um dos métodos descritos aqui. De acordo com a presente invenção, o vírus PRRS, de preferência vírus PRRS tendo o número de acesso à ATCC VR2332, é o vírus de referência para a determinação de atividade virucida. Para determinar a atividade virucida com relação a uma bactéria, é proposto usar a bactéria *Mycoplasma hyopneumonia*, de preferência a cepa J de *Mycoplasma hyopneumonia*.

[00030] Assim, a presente invenção proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que a atividade virucida - de preferência, em relação ao vírus PRRS - da composição antigênica de PCV-2 obtida após a etapa ii) é reduzida em pelo menos 10%, De preferência, pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 70%, ainda mais

preferivelmente pelo menos 90% quando comparado com aquela do primeiro líquido. De preferência, a porção do primeiro líquido tendo atividade virucida é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de maneira tal que ela compreendas etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, De preferência, de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20Xe, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, De preferência, duas vezes e, ainda mais preferivelmente, três vezes. Em tal caso, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável Tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui, impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400

kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00031] Em um outro aspecto, o método ainda compreende a etapa de coleta do antígeno PCV-2 obtido após pelo menos uma porção do primeiro líquido ser removida do antígeno PCV-2.

[00032] Conforme usado aqui, "colheita" ou "coleta" refere-se à coleta ou recuperação do antígeno PCV-2. Qualquer método convencional conhecido na técnica pode ser usado para recuperar o antígeno PCV-2 quando um antígeno está sendo produzido para uso com os métodos e composições do presente pedido ou quando o antígeno PCV-2 está sofrendo os métodos descritos aqui. Em uma maneira particularmente preferida de coleta, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 via uma etapa de filtração e o antígeno PCV-2 é recuperado ou coletado do retentado do filtro. Em uma forma mais preferida, o antígeno PCV-2 é colhido ou coletado ou recuperado do retentado de uma membrana semipermeável tendo o tamanho de poro descrito aqui. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que o antígeno PCV-2 obtido após a etapa ii) é coletado. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição de um segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência, de 3X a 50X, ainda mais

preferivelmente de 4X a 20Xe, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência, duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes. Em tal casos, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultra-filtração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00033] O antígeno PCV-2 que resta após sofrer os métodos proporcionados aqui, De preferência, após ser coletado do retentado do filtro, é misturado com um outro componente selecionado do grupo

consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos. De preferência, o outro componente é um adjuvante, ainda mais preferivelmente em que o adjuvante é um polímero de ácido acrílico ou metacrílico e, ainda mais preferivelmente, em que o adjuvante é Carbomer (o nome genérico para polímeros sintéticos de alto peso molecular de ácido acrílico).

[00034] Conforme usado aqui, "um veículo farmaceuticamente aceitável" e um "carreador veterinariamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes de estabilização, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos, agentes para retardo de adsorção e semelhantes.

[00035] "Adjuvantes" conforme usado aqui, 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 água-em-óleo, emulsão óleo-em-água, emulsão água-em-óleo-em-água. A emulsão pode ser baseada, em particular, em óleo de parafina líquida leve (tipo Farmacopéia Européia); óleo de isoprenoide, tal como esqualano ou esqualeno; óleo resultante da oligomerização de alcenos, em particular de isobuteno ou deceno; ésteres de ácidos ou de álcoois contendo um grupo alquila linear, mais preferivelmente óleos vegetais, oleato de etila, di-(caprilato/caprato) de propileno glicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerila ou dioleato de propileno glicol, ésteres de ácidos graxos ou álcoois ramificados, em particular ésteres de ácido isosteáricos. O óleo é usado em combinação com emulsificantes para formar a emulsão. Os emulsificantes são, de preferência, tensoativos não-iônicos, em particular ésteres de sorbitan, de manídeo (por exemplo, oleato de anidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propileno glicol e de ácido

oleico, isosteárico, ricinoleico ou hidróxi-esteárico, os quais são opcionalmente etoxilados e copolímeros em 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, páginas 51-94 (1995) e Todd *et al.*, Vaccine 15: 564-570 (1997). Por exemplo, é possível usar a emulsão 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 desse mesmo livro. Outros adjuvantes adequados incluem, mas são estão limitados a, o sistema adjuvante RIBI (Ribi Inc.), copolímero em bloco (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lipídio A, adjuvante de lipídio-amino Avridina, enterotoxina sensível ao calor de *E. coli* (recombinante ou de outro modo), toxina do cólera, IMS 1314 ou dipeptídeo de muramila, dentre muitos outros. Dentre os copolímeros de anidrido maleico e derivados de alquenila, os copolímeros EMA (Monsanto), os quais são copolímeros de anidrido maleico e etileno, são incluídos. A dissolução desses polímeros em água leva a uma solução ácida que será neutralizada, de preferência para o pH fisiológico, de forma a proporcionar a solução de adjuvante na qual a composição de vacina, imunogênica ou imunológica será incorporada.

[00036] Um outro exemplo de um adjuvante é um composto escolhido dos polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e os copolímeros de anidrido maleico e derivado de alquenila. Compostos adjuvantes vantajosos são os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico os quais são reticulados, especialmente com polialquenil éteres de açúcares ou poli álcoois. Esses compostos são conhecidos pelo termo carbomer (Phameuropa Vol. 8, No. 2, Junho de 1996). Aqueles versados no campo podem também referir-se à Patente U.S.

No. 2.909.462, o qual descreve tais polímeros acrílicos reticulados com um composto polihidroxilado tendo pelo menos 3 grupos hidroxila, de preferência não mais de 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 grupos etilicamente insaturados. Os radicais insaturados podem, em si, conter outros substituintes, tal como metila. Os produtos vendidos sob a marca CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, EUA) são particularmente apropriados. Eles são polímeros de ácido acrílico reticulados com polialquenil éteres ou divinil glicol ou reticulados com uma alil sacarose ou com alil pentaeritritol. Dentre esses, podem ser mencionados CARBOPOL® 974P, 934P e 971P. Mais preferido é o uso de CARBOPOL® 971P.

[00037] De preferência, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose. Mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 1 mg por dose.

[00038] "Diluentes" podem incluir água, solução salina, dextrose, etanol, glicerol e semelhantes. Agentes isotônicos podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose, dentre outros. Estabilizantes incluem albumina e sais alcalinos de ácido etileno diamina tetra acético, dentre outros.

[00039] Um "conservante", conforme usado aqui, refere-se a um

agente ativo antimicrobiano tal como, por exemplo, Gentamicina, Mertiolate e semelhantes. Em particular, a adição de um conservante é mais preferida para o preparo de uma composição com múltiplas doses. Esses agentes anti-microbiológicos ativos são adicionados em concentrações eficazes para impedir qualquer contaminação microbiológica da composição de interesse ou para inibição de qualquer crescimento microbiológico dentro da composição de interesse.

[00040] Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, ainda compreendendo a etapa de mistura do antígeno PCV-2 que resta após a etapa ii) com um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos. De preferência, em que o outro componente é um adjuvante, ainda mais preferivelmente em que o adjuvante é um polímero de ácido acrílico ou metacrílico e, ainda mais preferivelmente, em que o adjuvante é Carbomer. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência, de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20Xe, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas

múltiplas vezes, de preferência, duas vezes e, ainda mais preferivelmente, três vezes. Em tal casos, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00041] O antígeno PCV-2 usado nos métodos descritos acima pode ser qualquer antígeno PCV-2 conforme definido aqui. De preferência, o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de uma proteína ORF-2, ainda mais preferivelmente, o antígeno incluído em INGELVAC CIRCOFLEX®. Assim, de acordo com um outro aspecto do

presente pedido, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de ORF-2 protein. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência, de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20Xe, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2.

[00042] De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência, duas vezes e, ainda mais preferivelmente, três vezes. Em tal casos, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o

antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00043] O primeiro líquido contendo o antígeno PCV-2 usado pode ser obtido através de qualquer método conhecido na técnica. De preferência, o primeiro líquido contendo o antígeno PCV-2, bem como antígeno PCV-2, pode ser obtido através de qualquer um dos métodos descritos no Pedido de Patente Internacional WO2006/072065 (os conteúdos e ensinamentos dos quais são aqui incorporados por referência). Em particular, o antígeno PCV-2, quando expresso recombinantemente *in vitro* em células hospedeiras, pode ser obtido via um vetor viral, de preferência, um vetor viral de baculovírus recombinante, contendo e expressando o antígeno PCV-2, de preferência, ORF-2 de PCV-2.

[00044] Vetores e métodos para produção e/ou uso de vetores (ou recombinantes) para expressão do antígeno PCV-2, de preferência, o antígeno ORF2 de PCV-2, podem ser ou análogos aos métodos divulgados em: Patentes U.S. Nos. 4.603.112, 4.769.330, 5.174.993, 5.505.941, 5.338.683, 5.494.807, 4.722.848, 5.942.235, 5.364.773, 5.762.938, 5.770.212, 5.942.235, 382.425, Publicações PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018, Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93: 11349-11353,

Outubro de 1996, Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, Outubro de 1996, Smith *et al.*, Patente U.S. No. 4.745.051 (baculovírus recombinante), Richardson, C.D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.), Smith *et al.*, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, Dezembro de 1983, Vol. 3, No. 12, páginas 2156-2165; Pennock *et al.*, "Strong and Regulated Expression of *Escherichia coli* B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector, "Molecular and Cellular Biology, Março de 1984, Vol. 4, No. 3, páginas 399-406; EPA0 370 573, Pedido U.S. No. 920.197, depositado em 16 de Outubro de 1986, Publicação de Patente EP No. 265785, Patente U.S. No. 4.769.331 (herpesvírus recombinante), Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors", PNAS USA 93: 11307-11312, Outubro de 1996, Andreansky *et al.*, "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors", PNAS USA 93: 11313-11318, Outubro de 1996, Robertson *et al.*, "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, Outubro de 1996, Frolov *et al.*, "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications", PNAS USA 93: 11371-11377, Outubro de 1996, Kitson *et al.*, J. Virol. 65, 3068-3075, 1991; Patentes U.S. Nos. 5.591.439, 5.552.143, WO 98/00166, Pedidos U. S. Cedidos Nos. de Série 08/675.556 e 08/675.566, ambos depositados em 3 de Julho de 1996 (adenovírus recombinante), Grunhaus *et al.*, 1992, "Adenovirus as cloning vectors", Seminars in Virology (Vol. 3) páginas 237-52, 1993, Ballay *et al.*, EMBO Journal, vol. 4, páginas 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, Abril de 1990, Prevec *et al.*, J. Gen Virol. 70, 42434, PCT WO

91/11525, Felgner *et al.* (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259: 1745-49, 1993 e McClements *et al.*, "Immunization with DNA vaccines encoding glicoprotein D or glicoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, Outubro de 1996 e Patentes U.S. Nos. 5.591.639, 5.589.466 e 5.580.859, bem como WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660, Tang *et al.*, Nature e Furth *et al.*, Analytical Biochemistry, relacionado a vetores de expressão de DNA, *inter alia*. Vide também WO 98/33510; Ju *et al.*, Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (sistema de expressão lentiviral); Sanford *et al.*, Patente U.S. No. 4.945.050; Fischbach *et al.* (Intracel), WO 90/01543; Robinson *et al.*, seminars in Immunology vol. 9, páginas 271-283 (1997), (sistemas de vetor de DNA); Szoka *et al.*, Patente U.S. No. (método de inserção de DNA em células vivas); McCormick *et al.*, Patente U.S. No. 5.677.178 (uso de vírus citopáticos); e Patente U.S. No. 5.928.913 (vetores para distribuição gênica), bem como outros documentos citados aqui. A expressão do antígeno ORF2 de PCV-2 em células de inseto é descrita, por exemplo, no documento WO 06/072065. O antígeno ORF2 de PCV-2 de acordo com a invenção pode ser obtido através de vários métodos conhecidos na técnica. Métodos preferidos são aqueles descritos aqui.

[00045] O antígeno ORF2 de PCV-2 pode ser produzido recombinantemente *in vitro* através do método compreendendo as etapas de **i)** permitir infecção de células suscetíveis em cultura com um vetor viral recombinante contendo a sequência de codificação de ORF2 de PCV-2, em que a proteína ORF2 de PCV-2 é expressa pelo vetor recombinante e **ii)** após o que, recuperação do antígeno ORF2 de PCV-2 da cultura de células. O antígeno ORF2 de PCV-2 é recuperado por meio de coleta das células SF+ inteiras (isto é,

intactas) expressando o antígeno ORF2 de PCV-2.

[00046] Assim, de acordo com um outro aspecto do presente pedido, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que o antígeno PCV-2 é obtida via um vetor viral, de preferência, um vetor viral de baculovírus recombinante, contendo e expressando o antígeno PCV-2, de preferência, ORF-2 de PCV-2 e em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de ORF-2 protein. Quando um vetor viral, em particular um baculovírus recombinante contendo e expressando o antígeno PCV-2 é usado para produzir/obter o antígeno PCV-2, o método descrito acima ainda compreende a etapa de inativação do vetor viral, de preferência, o vetor viral de baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência, na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária. De preferência, a etapa de inativação é realizada após pelo menos uma porção do primeiro líquido ser removida do antígeno PCV-2, mais preferivelmente após o antígeno PCV-2 é coletado. Ainda mais preferivelmente, a etapa de inativação é realizada após a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. Quando a troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido é feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20Xe, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o

volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, a etapa de inativação é feita após a etapa de concentração. Quando a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência, duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes, a etapa de inativação é realizada após a última etapa de adição de líquido e etapa de concentração. Quando a etapa de concentração é feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultra-filtração, utilizando um filtro, de preferência contendo uma membrana semipermeável, a etapa de inativação é realizada após a etapa de filtração descrita acima, de preferência utilizando uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00047] "Agente de inativação de DNA", para fins da presente invenção, refere-se a qualquer agente químico o qual desativa o DNA, de preferência, DNA de um patógeno, de modo que o patógeno não possa causar infecção ativa ou ser infectivo ou se reproduzir, mas ainda é capaz de indução de uma resposta imune em um indivíduo. De preferência, o agente de inativação de DNA é formalina.

[00048] Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que o antígeno PCV-2 é obtida via um vetor viral, de preferência, um vetor viral de baculovírus recombinante, contendo e expressando o antígeno PCV-2, de preferência, ORF-2 de PCV-2, em que o método ainda compreende a etapa de inativação do vetor viral, de preferência, o vetor viral de baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência, na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária e em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de ORF-2 protein. De preferência, a etapa de inativação é realizada após pelo menos uma porção do primeiro líquido ser removida do antígeno PCV-2, mais preferivelmente após o antígeno PCV-2 é coletado. Ainda mais preferivelmente, a etapa de inativação é realizada após a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. Quando a troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido é feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X, ainda mais preferivelmente de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, a etapa de inativação é feita após a etapa de concentração. Quando a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de

preferência, duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes, tal etapa de inativação é realizada após a última etapa de adição de líquido e etapa de concentração. Quando a etapa de concentração é feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultra-filtração, utilizando um filtro, de preferência contendo uma membrana semipermeável, a etapa de inativação é realizada após a etapa de filtração descrita acima, de preferência utilizando uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00049] No caso onde um agente de inativação de DNA é usado no método de acordo com a invenção, o método ainda compreende a etapa de adição de uma quantidade de um agente que neutraliza o agente de inativação de DNA, a quantidade sendo equivalente à quantidade do agente de inativação de DNA, em que o agente que neutraliza o agente de inativação de DNA compreende uma solução de tiosulfato de sódio concentrada para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM e em que o agente de inativação de DNA é BEI. De preferência, a etapa de inativação é realizada após pelo menos uma porção do primeiro líquido ser removida do antígeno PCV-

## 2.

[00050] "Agente que neutraliza o agente de inativação" ou "agente de neutralização", conforme usado aqui, refere-se a qualquer agente capaz de neutralizar os agentes de inativação listados acima, de modo que o agente de inativação não seja mais capaz de inativação de DNA. O agente que neutraliza o agente de inativação é, de preferência, tiosulfato de sódio.

[00051] Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um antígeno PCV-2 in um primeiro líquido em que o antígeno PCV-2 é obtida via um vetor viral, de preferência, um vetor viral de baculovírus recombinante, contendo e expressando o antígeno PCV-2, de preferência, ORF-2 de PCV-2 e em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de ORF-2 protein; ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2; iii) inativação de o vetor viral de baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência, na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária; iv) adição de uma quantidade de a agente de neutralização que neutraliza o agente de inativação, a quantidade de agente de neutralização sendo equivalente à quantidade de o agente de inativação, em que o agente de neutralização compreende, de preferência, uma solução de tiosulfato de sódio, de preferência concentrada para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM e em que o agente de inativação compreende, de preferência, BEI. De preferência, a etapa de inativação e neutralização é realizada após pelo menos uma porção do primeiro líquido ser removida do antígeno PCV-2, mais preferivelmente

após o antígeno PCV-2 é coletado. Ainda mais preferivelmente, a etapa de inativação e neutralização é realizada após a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. Quando a troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido é feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20Xe, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, a etapa de inativação e neutralização é feita após a etapa de concentração. Quando a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência, duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes, a etapa de inativação e neutralização é realizada após a última etapa de adição de líquido e etapa de concentração. Quando a etapa de concentração é feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro, de preferência contendo uma membrana semipermeável, a etapa de inativação e neutralização é realizada após a etapa de filtração descrita acima, de preferência utilizando uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75

kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00052] Em um outro aspecto do presente pedido, o método descrito acima ainda compreende a etapa de mistura do antígeno PCV-2 obtido após as etapas de inativação e neutralização com um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um antígeno PCV-2 in um primeiro líquido, em que o antígeno PCV-2 é obtida via um vetor viral, de preferência, um vetor viral de baculovírus recombinante, contendo e expressando o antígeno PCV-2, de preferência, ORF-2 de PCV-2 e em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de ORF-2 protein; ii) remoção pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2; iii) inativação de o vetor viral de baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência, na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária; iv) adição de uma quantidade de a agente de neutralização que neutraliza o agente de inativação, a quantidade de agente de neutralização De preferência, sendo equivalente à quantidade de o agente de inativação, em que o agente de neutralização compreende, de preferência, uma solução de tiossulfato de sódio, de preferência concentrada para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM e em que o agente de inativação compreende, de preferência, BEI; e v) mistura do

antígeno PCV-2 obtido na etapa iv) com um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos. De preferência, o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de ORF-2 protein. De preferência, na etapa ii), a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20Xe, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência, duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes. Em tal caso, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana

semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00053] De acordo com um outro aspecto, qualquer um dos métodos descritos acima para obter um antígeno PCV-2 com atividade virucida reduzida pode incluir outras etapas de purificação para obter um antígeno PCV-2 purificado. Surpreendentemente, descobriu-se que uma composição antigênica ou imunogênica compreendendo um antígeno PCV-2 purificado, de preferência em combinação com um adjuvante, não apenas mostra uma atividade virucida reduzida conforme descrito aqui, mas também mostra uma imunogenicidade aumentada quando comparado com uma composição imunogênica, a qual não compreende um antígeno PCV-2 purificado, meio o qual compreende um antígeno PCV-2 não purificado ou bruto.

[00054] O termo "antígeno PCV-2 purificado" significa que o antígeno PCV-2 é purificado em um preparado até o ponto de mais de 50% (peso/peso), de preferência de mais de 60% (peso/peso), de preferência de mais de 70% (peso/peso), de preferência de mais de 80% (peso/peso), de preferência de mais de 85% (peso/peso), mais preferivelmente de mais de 90% (peso/peso), ainda mais preferivelmente de mais de 95% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica. Em outras palavras, se um preparado compreende um antígeno PCV-2

com um grau de pureza de 80% (peso/peso), tal preparado compreende não mais de 20% (peso/peso) de proteínas não-PCV-2 com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica. De preferência, o grau de pureza é medido no preparado, isto é, na composição imunogênica antes de mistura com adjuvante ou quaisquer outros excipientes ou agente de inativação. Contudo, se o adjuvante usado na composição imunogênica final é um adjuvante não baseado em proteína, a adição do adjuvante não tem qualquer efeito sobre o valor de pureza. O grau de pureza do antígeno PCV-2 pode ser estimado por meio de métodos padrões conhecidos por aqueles versados no campo, por exemplo, através de Imperial Protein Stain (Pierce) após separação em SDS-PAGE, cromatografia gasosa, análise por HPLC, etc. O método preferido de acordo com a presente invenção para estimar a pureza ou grau de pureza de um antígeno PCV-2 em um preparado, isto é, uma composição imunogênica é a coloração Imperial Protein Stain (Pierce), a qual é feita como segue: O preparado compreendendo o antígeno PCV-2 é separado via géis de Bis-Tris NuPAGE a 10% (Invitrogen) usando o sistema de tampão MOPS NuPAGE (Invitrogen). Os géis foram passados sob condições de desnaturação (todos os tampões têm SDS nos mesmos) e redução (o tampão de carregamento tem 2-mercaptoetanol). Após carregamento dos géis com amostras, os géis foram passados durante 55 min em uma constante de 200 Volts. Uma vez que a operação estava completa, os géis foram corados usando Imperial Protein Stain (Pierce) e descoloridos de acordo com as instruções do fabricante.

[00055] Em contraste, o termo antígeno PCV-2 "não-purificado" ou "bruto" refere-se a um preparado bruto compreendendo antígeno PCV-2. Antígeno PCV-2 normalmente é produzido em cultura de célula *in vitro*. Assim, um antígeno PCV-2 bruto refere-se a uma mistura de

antígeno PCV-2 e da cultura de célula ou material de cultura de célula usado para a produção do antígeno PCV-2. Além disso, um antígeno PCV-2 não-purificado também significa um antígeno PCV-2 parcialmente purificado, de preferência tendo a um grau de pureza de menos de 50% (peso/peso), more preferida de menos de 40% (peso/peso), ainda mais preferivelmente de menos de 30% (peso/peso), ainda mais preferivelmente de menos de 20% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica.

[00056] Além disso, os termos "imunogenicidade aumentada ou imunogenicidade aprimorada", conforme usado aqui, significa que a resposta imune causada por uma composição imunogênica compreendendo um antígeno de interesse é aumentada quando comparado com uma composição imunogênica de referência compreendendo um antígeno diferente ou um grau diferente de pureza do antígeno, quer essa resposta imune seja uma resposta imune celular e/ou anticorpo mediada. De acordo com uma modalidade preferida, o termo imunogenicidade aumentada ou imunogenicidade aprimorada significa que a resposta imune anticorpo mediada estimulada por uma composição imunogênica compreendendo antígeno de interesse é aumentada quando comparado com uma composição imunogênica de referência compreendendo um antígeno diferente ou um grau diferente de pureza do antígeno. A esse respeito, resposta imune mediada por anticorpo significa que a produção de anticorpos, os quais são específicos para o antígeno de interesse, é aumentada quando comparado com a produção de anticorpo estimulada pela composição imunogênica de referência compreendendo um antígeno diferente ou um grau diferente de pureza do antígeno.

[00057] O termo "aumentado" significa que a resposta imune celular

e/ou mediada por anticorpo é aumentada em pelo menos 10%, de preferência, em pelo menos 20%, mais preferivelmente em pelo menos 30%, ainda mais preferivelmente em pelo menos 40%, ainda mais preferivelmente em pelo menos 50%, ainda mais preferivelmente em pelo menos 75%, mais preferivelmente, em pelo menos 100% quando comparado com a resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo estimulada pela composição imunogênica de referência compreendendo um antígeno diferente ou um grau diferente de pureza do antígeno.

[00058] É de conhecimento geral aqueles versados no campo como medir a resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo. Em particular, está claro para aqueles versados no campo comparar a resposta imune célula-mediada da composição imunogênica de interesse com a resposta imune célula-mediada de referência ou a resposta imune anticorpo mediada da composição imunogênica de interesse com aquela da composição de referência, mas não a resposta imune célula-mediada da composição imunogênica de interesse com a resposta imune anticorpo mediada de referência ou *vice versa*. Além disso, a resposta imune célula-mediada pode ser medida, por exemplo, medindo-se a ativação de células T citotóxicas por uma composição imunogênica/antígeno de interesse. A resposta imune anticorpo mediada pode ser medida, por exemplo, medindo-se a quantidade de anticorpos antígeno-específicos gerados em virtude da administração da composição imunogênica compreendendo tal antígeno a um animal. A resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo pode ser medida, por exemplo, usando um modelo com camundongos. De acordo com a presente invenção, o modelo com camundongos é usado como o modelo de referência.

[00059] O termo "composição imunogênica" significa, mas é não está limitado a, uma composição de matéria que compreende pelo

menos um antígeno o qual estimula uma resposta imune celular e/ou anticorpo-mediada em um hospedeiro contra o antígeno de interesse. Usualmente, uma "resposta imune" inclui, mas não está limitada a, um ou mais dos seguintes efeitos: a produção ou ativação de anticorpos, células B, células T auxiliares, células T supressoras e/ou células T citotóxicas e/ou células T gama-delta, dirigidas especificamente a um antígeno ou antígenos incluídos na composição ou vacina de interesse. De preferência, o hospedeiro mostrará uma resposta imune terapêutica ou protetora, de modo que resistência a uma nova infecção será intensificada e/ou a gravidade clínica da doença reduzida. Em tal caso, a composição imunogênica é uma "vacina". Tal proteção será demonstrada por uma redução ou falta de sintomas normalmente mostrados por um hospedeiro infectado, um tempo de recuperação mais rápido e/ou uma titulação viral reduzida no hospedeiro infectado.

[00060] Purificação adicional do antígeno PCV-2 pode ser obtida com procedimentos de cromatografia, de preferência um procedimento de cromatografia em duas etapas. Se o antígeno PCV-2 é montando em partículas semelhantes a vírus (VLP), uma etapa, de preferência a primeira etapa, é, de preferência, uma cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel) a qual pode ser feita, por exemplo, usando uma matriz Sephacryl S300, Em escala de laboratório, uso de colunas HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR são mais preferidos. Contudo, quaisquer outras matrizes de cromatografia por exclusão de tamanho conhecidas por aqueles versados no campo podem ser usadas, as quais permitem a separação das VLPs de ORF2 de PCV-2 do filtrado ou sobrenadante de cultura. Matrizes adequadas são descritas, por exemplo, em E.L.V. Harris e S. Angel (eds.), Protein Purification Methods – a practical approach, IRL Press Oxford 1995). A cromatografia de filtração em gel pode ser conduzida, por exemplo, por meio de carregamento da coluna com o preparado bruto

compreendendo antígeno PCV-2 com uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min e eluindo a coluna com 1,5 volumes de coluna de um tampão compreendendo Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM. Contudo, o antígeno ORF2 de PCV-2 pode também ser purificado usando cromatografia por afinidade, por exemplo, via ligação seletiva a um anticorpo específico para ORF2 de PCV-2 imobilizado ou qualquer outro método conhecido por aqueles versados no campo.

[00061] Assim, de acordo com uma modalidade preferida, a presente invenção proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 e iii) purificação da coleta da etapa ii) compreendendo antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, através de um procedimento cromatográfico. De preferência, cromatografia de exclusão de tamanho é realizada conforme descrito aqui, de preferência, conforme descrito no Exemplo 3. De preferência, a exclusão de tamanho resulta em uma composição imunogênica tendo um grau de pureza de mais de 80% (peso/peso), de preferência, mais de 90% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica antes da mistura com o adjuvante. O grau de pureza pode ser estimado por coloração com Imperial Protein Stain (Pierce) após SDS PAGE via géis de Bis-Tris NuPAGE a 10% (Invitrogen) usando o sistema de tampão MOPS NuPAGE (Invitrogen).

[00062] Assim, de acordo com uma modalidade preferida, a presente invenção proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno

PCV-2 e iii) purificação da coleta da etapa ii) compreendendo antígeno PCV-2 através de cromatografia de exclusão de tamanho (filtração em gel).

[00063] De forma a obter um maior grau de pureza, uma segunda etapa de cromatografia pode ser feita a qual, contudo, é diferente da primeira. Por exemplo, se a primeira etapa de purificação / etapa de cromatografia é exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda será diferente dessa, por exemplo, uma cromatografia por afinidade, cromatografia de troca de íons, etc. De preferência, se a primeira etapa para purificar o antígeno PCV-2, de preferência para purificar o antígeno ORF2 de PCV-2, é uma cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda etapa pode ser cromatografia de troca de íons (AIEX). Uma matriz para cromatografia de troca de íons preferida para a purificação de antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, é Q Sepharose. Em uma pequena escala de cerca de 50 ml, uso de colunas HiTrap Q Sepharose HP de 5 ml é mais preferido. A cromatografia de troca de íons pode ser conduzida, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 3. Resumidamente, cerca de 50 ml da reserva de fração do volume de vazios da etapa de cromatografia por exclusão de tamanho podem ser carregados sobre a coluna AIEX em uma taxa de fluxo de 3,0 ml/min. Após uma etapa de lavagem usando, por exemplo, Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM para remover o material não ligado, a proteína pode ser eluída com uma única etapa de 8 volumes de coluna do seguinte tampão (Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM, NaCl a 1,0 M). O fluxo passante da passagem em AIEX pode ser carregado de volta sobre a coluna Q Sepharose e eluído conforme descrito acima para aumentar o rendimento. Essa técnica em duas etapas (exclusão de tamanho, seguido por uma cromatografia de troca de íons) separa eficazmente o antígeno ORF2

de PCV-2 da maioria dos outros componentes de proteína da coleta de cultura.

[00064] Assim, de acordo com uma modalidade preferida, a presente invenção proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 e iii) purificação da coleta da etapa ii) compreendendo antígeno PCV-2 através de uma cromatografia em duas etapas. De preferência a primeira etapa de cromatografia é diferente da segunda etapa. Se a primeira etapa é uma cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda etapa pode ser cromatografia de troca de íons, de preferência, uma cromatografia de troca de íons (AIEX). De preferência, em qualquer dos métodos descritos acima, os quais incluem uma ou mais de outras etapas de purificação para obter um antígeno PCV-2 purificado, de preferência, a proteína ORF-2 de PCV-2, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência duas vezes e, ainda mais preferivelmente, três vezes. Em tais casos, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada

de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Em formas preferidas, o método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 descrita acima ainda compreende as etapas de i) obtenção de um antígeno PCV-2 em um primeiro líquido em que o antígeno PCV-2 é obtido via um vetor viral, de preferência um vetor viral de baculovírus recombinante contendo e expressando antígeno PCV-2, de preferência ORF-2 de PCV-2 e em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2; ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2; iii) inativação do vetor viral de baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência na presença de cerca

de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária; iv) adição de uma quantidade de um agente de neutralização que neutraliza o agente de inativação, a quantidade de agente de neutralização sendo equivalente à quantidade do agente de inativação, em que o agente de neutralização compreende, de preferência, uma solução de tiossulfato de sódio, de preferência concentrada para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM e em que o agente de inativação compreende, de preferência, BEI; e v) mistura do antígeno PCV-2 obtido na etapa iv) com um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos. A estratégia de purificação adicional, de preferência purificação em duas etapas, incluindo a etapa de pré-filtração, resulta em uma composição imunogênica tendo um grau de pureza de mais de 80% (peso/peso), de preferência de mais de 85% (peso/peso), ainda mais preferivelmente de mais de 90% (peso/peso), mais preferivelmente de mais de 95% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica antes da mistura com qualquer adjuvante.

[00065] A composição antigênica de PCV-2 produzida através do método descrito aqui causa uma perda de menos de 1 log TCID<sub>50</sub> de um vírus vivo ou menos de 1 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada com a composição antigênica de PCV-2 e incubada durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais

de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses, mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. Mais preferivelmente, a composição antigênica de PCV-2 produzida através do método descrito aqui causa uma perda de menos de 0,9 log TCID<sub>50</sub> por ml de um vírus vivo ou menos de 0,9 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses, mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. Ainda mais preferivelmente, a composição antigênica de PCV-2 produzida através do método descrito aqui causa uma perda de menos de 0,7 log TCID<sub>50</sub> por ml de um vírus vivo ou menos de 0,7 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais

preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses, mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. Ainda mais preferivelmente, a composição antigênica de PCV-2 produzida pelas etapas através do método descrito aqui causa uma perda de menos de 0,5 log TCID<sub>50</sub> por ml de um vírus vivo ou menos de 0,5 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses, mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. Ainda mais preferivelmente, a composição

antigênica de PCV-2 produzida através do método descrito aqui causa uma perda de menos de 0,3 log TCID<sub>50</sub> por ml de um vírus vivo ou menos de 0,3 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses, mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. O vírus vivo pode ser qualquer vírus vivo mas, de preferência, o vírus vivo é o vírus de PRRS, de preferência, o vírus de PRRS tendo o Número de Acesso à ATCC VR 2332. A bactéria viva pode ser qualquer bactéria mas, de preferência, é a bactéria *Mycoplasma hyopneumonia*, de preferência a cepa J de *Mycoplasma hyopneumonia*. A TCID<sub>50</sub> por ml pode ser estimada por meio de um ensaio padrão de titulação *in vitro*, o qual permite a estimativa da quantidade de um vírus vivo. A CFU por ml pode ser determinada também por meio de um ensaio padrão de titulação *in vitro*, o qual permite a estimativa da quantidade de uma bactéria viva. O termo "por ml" refere-se, de preferência, a 1 ml de um fluido. Tal antígeno PCV-2 purificado, não apenas mostra atividade virucida reduzida, conforme definido aqui, it também mostra uma imunogenicidade

aumentada quando comparado com um antígeno não-PCV-2 purificado conforme definido aqui, de preferência, tal antígeno PCV-2 purificado aumenta a resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo em pelo menos 10%, de preferência, em pelo menos 20%, mais preferivelmente em pelo menos 30%, ainda mais preferivelmente em pelo menos 40%, ainda mais preferivelmente em pelo menos 50%, ainda mais preferivelmente em pelo menos 75%, mais preferivelmente, em pelo menos 100% quando comparado com a resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo estimulada pela composição imunogênica de referência compreendendo um antígeno não-PCV-2 purificado.

[00066] Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que a composição antigênica de PCV-2 obtida após a etapa ii) causa uma perda de menos de 1 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml -, de preferência menos de 0,9 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml -, ainda mais preferivelmente menos de 0,7 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml -, ainda mais preferivelmente menos de 0,5 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml -, mais preferivelmente, menos de 0,3 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml - de um vírus vivo, de preferência, de um PRRSV vivo ou menos de 1 log CFU - de preferência por ml -, de preferência menos de 0,9 log CFU - de preferência por ml -, ainda mais preferivelmente menos de 0,7 log CFU - de preferência por ml -, ainda mais preferivelmente menos de 0,5 log CFU - de preferência por ml -, mais preferivelmente, menos de 0,3 log CFU - de preferência por ml - de uma bactéria viva, de preferência, de *Mycoplasma hyopneumoniae*, quando o vírus vivo, de preferência PRRSV ou bactéria viva, de preferência, *Mycoplasma*

*hyopneumoniae* é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses, mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita in de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X, ainda mais preferivelmente de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes. Em tal caso, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa

de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultra-filtração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Quando antígeno PCV-2 é obtido via um vetor viral, de preferência um vetor viral de baculovírus recombinante contendo e expressando antígeno PCV-2, de preferência ORF-2 de PCV-2, o processo ainda compreende iii) inativação do vetor viral de baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária; iv) adição de uma quantidade de um agente de neutralização que neutraliza o agente de inativação, a quantidade de agente de neutralização sendo equivalente à quantidade do agente de inativação, em que o agente de neutralização compreende, de preferência, uma solução de tiossulfato de sódio, de preferência concentrada para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM e em que o agente de inativação compreende, de preferência, BEI. De preferência, as etapas de inativação e

neutralização são realizadas após pelo menos uma porção do primeiro líquido ser removida do antígeno PCV-2, mais preferivelmente após o antígeno PCV-2 é coletado. Ainda mais preferivelmente, as etapas de inativação e neutralização são realizadas após a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. Quando a troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido é feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X, ainda mais preferivelmente de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, as etapas de inativação e neutralização são feita após a etapa de concentração. Quando a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência duas vezes e, ainda mais preferivelmente, três vezes, tais etapas de inativação e neutralização são realizadas após a última etapa de adição de líquido e etapa de concentração. Quando a etapa de concentração é feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro, de preferência contendo uma membrana semipermeável, as etapas de inativação e neutralização são realizadas após a etapa de filtração descrita acima, de preferência utilizando uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui

impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. De preferência, purificação adicional para obter um antígeno PCV-2 purificado conforme definido aqui, pode ser obtida realizando purificação adicional etapa compreendendo iii) purificação da coleta da etapa ii) compreendendo antígeno PCV-2, o qual é obtido após a remoção de uma porção do primeiro líquido, através de uma etapa de cromatografia. De forma a obter um maior grau de pureza, uma segunda etapa de cromatografia pode ser feita a qual, contudo, é diferente da primeira. Por exemplo, se a primeira etapa de purificação / etapa de cromatografia é exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda será diferente dessa, por exemplo, uma cromatografia por afinidade, cromatografia de troca de íons, etc. De preferência, se a primeira etapa para purificar o antígeno PCV-2, de preferência para purificar o antígeno ORF2 de PCV-2, é uma cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda etapa pode ser cromatografia de troca de íons, de preferência, uma cromatografia de troca de íons (AIEX). Uma matriz para cromatografia de troca de íons preferida para a purificação de antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, é Q Sepharose. Em uma pequena escala de cerca de 50 ml, uso de colunas HiTrap Q Sepharose HP de 5 ml é mais preferido. A cromatografia de troca de íons pode ser conduzida, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 3. Resumidamente, cerca de 50 ml da reserva de fração do volume de vazios da etapa de cromatografia por exclusão de tamanho podem ser carregados sobre a coluna AIEX em uma taxa de fluxo de 3,0 ml/min. Após uma etapa de

lavagem usando, por exemplo, Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM para remover o material não ligado, a proteína pode ser eluída com uma única etapa de 8 volumes de coluna do seguinte tampão (Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM, NaCl a 1,0 M). O fluxo passante da passagem em AIEX pode ser carregado de volta sobre a coluna Q Sepharose e eluído conforme descrito acima para aumentar o rendimento. Essa técnica em duas etapas (exclusão de tamanho, seguido por uma cromatografia de troca de íons) separa eficazmente o antígeno ORF2 de PCV-2 da maioria dos outros componentes de proteína da coleta de cultura.

A composição antigênica de PCV-2 obtida de acordo com o método descrito acima ou o antígeno PCV-2 usado na etapa i) do método descrito acima, pode ser combinado com pelo menos um antígeno adicional, de preferência um antígeno viral ou bacteriano e, ainda mais preferivelmente, um antígeno viral ou bacteriano de pelo menos um outro organismo que causa doença em suínos. Um antígeno adicional pode ser qualquer um daqueles divulgados no Pedido de Patente Internacional WO2007/094893 (os conteúdos e ensinamentos do qual são aqui incorporados por referência). Resumidamente, antígenos adicionais podem ser antígenos de qualquer outro organismo que causa doenças de suínos. De preferência, o "outro organismo que causa doenças" de suínos são selecionados do grupo consistindo de: *Actinobacillus pleuropneumonia* (1); Adenovírus (2); Alfavírus, tal como vírus da encefalomielite equina do Oeste (3); *Bordetella bronchiseptica* (4); *Brachyspira* spp. (5), de preferência, *B. hyodysenteriae* (6); *B. pilosicoli* (7), *Brucella suis*, de preferência, biovariedades 1, 2 e 3 (8); vírus da febre suína clássica (9); *Clostridium* spp. (10), de preferência, *Cl. difficile* (11), *Cl. perfringens* tipos A, B e C (12), *Cl. novyi* (13), *Cl. septicum* (14), *Cl. tetani* (15); Coronavírus (16), de preferência, Coronavírus Respiratório

Suíno (17); *Eperythrozoonosis suis* (18); *Erysipelothrix rhusiopathiae* (19) *Escherichia coli* (20); *Haemophilus parasuis*, de preferência, subtipos 1, 7 e 14, (21) Vírus da encefalomielite de hemaglutinação (22); Vírus da Encefalite Japonesa (23); *Lawsonia intracellularis* (24); *Leptospira* spp. (25), de preferência, *Leptospira australis* (26); *Leptospira canicola* (27); *Leptospira grippotyphosa* (28); *Leptospira icterohaemorrhagiae* (29); e *Leptospira interrogans* (30); *Leptospira pomona* (31); *Leptospira tarassovi* (32); *Mycobacterium* spp. (33), de preferência *M. avium* (34), *M. intracellulare* (35) e *M. bovis* (36); *Mycoplasma hyopneumoniae* (37); *Pasteurella multocida* (38); Citomegalovírus suíno (39); Parvovírus Suíno (40); Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (41); Vírus da Pseudo-raiva (42); Rotavírus (43); *Salmonella* spp. (44), de preferência *S. thyhimirium* (45) e *S. choleraesuis* (46); *Staph. hyicus* (47); *Staphylococcus* spp. (48) de preferência, *Streptococcus* spp. (49), de preferência, *Strep. suis* (50); Vírus do herpes suíno (51); vírus da influenza suína (52); vírus da varíola suína (53); vírus da rubéola suína (54); vírus da estomatite vesicular (55); Vírus do exantema vesicular suíno (56); *Leptospira Hardjo* (57); e/ou *Mycoplasma hyosynoviae* (58).

[00067] Assim, de acordo com um outro aspecto da presente invenção, a presente invenção proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um antígeno PCV-2 em um primeiro líquido; ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2; e combinação do antígeno PCV-2 com pelo menos um antígeno adicional, de preferência um antígeno viral ou bacteriano e, mais preferivelmente um antígeno viral ou bacteriano de pelo menos um outro organismo que causa doença em suínos. De preferência, o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais

preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência duas vezes e, ainda mais preferivelmente, três vezes. Em tais casos, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda

mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Purificação adicional para obter um antígeno PCV-2 purificado pode ser feita conforme descrito acima.

[00068] Em formas preferidas, o método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 descrita acima ainda compreende as etapas de i) obtenção de um antígeno PCV-2 em um primeiro líquido em que o antígeno PCV-2 é obtido via um vetor viral, de preferência um vetor viral de baculovírus recombinante contendo e expressando antígeno PCV-2, de preferência ORF-2 de PCV-2 e em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2; ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2; iii) inativação do vetor viral de baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária; iv) adição de uma quantidade de um agente de neutralização que neutraliza o agente de inativação, a quantidade de agente de neutralização sendo equivalente à quantidade do agente de inativação, em que o agente de neutralização compreende, de preferência, uma solução de tiossulfato de sódio, de preferência concentrada para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM e em que o agente de inativação compreende, de preferência, BEI; e v) mistura do antígeno PCV-2 obtido na etapa iv) com um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos.

[00069] Em um outro aspecto do método, o pelo menos um antígeno adicional é um antígeno viral, de preferência, um antígeno

Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína. Ainda mais preferivelmente, o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína compreende um vírus vivo e, ainda mais preferivelmente, um vírus vivo modificado, ainda mais preferivelmente um vírus vivo atenuado modificado. Ainda mais preferivelmente, o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína vivo modificado compreende uma cepa de um vírus vivo modificado com Número de Acesso ATCC VR 2332 e, ainda mais preferivelmente, compreende INGELVAC® PRRS MLV. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 e combinação do antígeno PCV-2 com um antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína. De preferência, o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína compreende um vírus vivo, ainda mais preferivelmente, um vírus vivo modificado e, ainda mais preferivelmente, um vírus vivo atenuado modificado. Ainda mais preferivelmente, o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína vivo modificado compreende uma cepa de um vírus vivo modificado com Número de Acesso ATCC VR 2332 e, ainda mais preferivelmente, compreende MLV de PRRS INGELVAC®. De preferência, o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o

antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes. Em tal caso, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Purificação adicional para obter um antígeno PCV-2 purificado pode ser feita conforme descrito acima.

[00070] Em um outro aspecto do presente pedido, o pelo menos um antígeno adicional é um antígeno bacteriano, de preferência, *Mycoplasma hyopneumoniae*. De preferência, o antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma bacterina e, mais preferivelmente, a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* é INGELVAC® MYCOFLEX. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 e combinação do antígeno PCV-2 com um antígeno bacteriano, de preferência, *Mycoplasma hyopneumoniae*. De preferência, o antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma bacterina e, mais preferivelmente, a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* é INGELVAC® MYCOFLEX. De preferência, o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência duas vezes e, ainda mais preferivelmente, três vezes. Em tais casos, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos

primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Purificação adicional para obter um antígeno PCV-2 purificado pode ser feita conforme descrito acima.

[00071] Em um outro aspecto do presente pedido, o pelo menos um antígeno adicional inclui um antígeno viral, de preferência o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína, conforme descrito acima e um antígeno bacteriano, de preferência, um antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae*, conforme descrito acima. De preferência, o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína compreende um vírus vivo, mais preferivelmente um vírus vivo modificado e, ainda mais preferivelmente, compreende uma cepa de

um vírus vivo modificado com Número de Acesso ATCC VR 2332 e, ainda mais preferivelmente, compreende MLV de PRRS INGELVAC®. De preferência, o antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma bacterina e, mais preferivelmente, a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* é INGELVAC® MYCOFLEX. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona um método de produção de uma composição antigênica de PCV-2 compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 e combinação do antígeno PCV-2 com um antígeno viral, de preferência o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína, conforme descrito acima e um antígeno bacteriano, de preferência, um antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*, conforme descrito acima. De preferência, o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína compreende um vírus vivo, mais preferivelmente um vírus vivo modificado e, ainda mais preferivelmente, compreende uma cepa de um vírus vivo modificado com Número de Acesso ATCC VR 2332 e, ainda mais preferivelmente, compreende MLV de PRRS INGELVAC®. De preferência, o antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma bacterina e, mais preferivelmente, a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* é INGELVAC® MYCOFLEX. De preferência, o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência

de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência duas vezes e, ainda mais preferivelmente, três vezes. Em tais casos, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, a etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Purificação adicional para obter um antígeno PCV-2 purificado pode ser feita conforme descrito acima.

[00072] O presente pedido não apenas proporciona métodos de

produção de composições antigênicas de PCV-2, ele refere-se também a uma composição antigênica de PCV-2. Assim, de acordo com um outro aspecto o presente pedido de patente ainda proporciona uma composição antigênica de PCV-2 caracterizada pelo fato de que a composição antigênica de PCV-2 causa uma perda de menos de 1 log TCID<sub>50</sub> de um vírus vivo ou menos de 1 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada com a composição antigênica de PCV-2 e incubada durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses e, ainda mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. Mais preferivelmente, a composição antigênica de PCV-2 produzida através do método descrito aqui causa uma perda de um vírus vivo ou menos de 0,9 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais

preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses e, ainda mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. Ainda mais preferivelmente, a composição antigênica de PCV-2 causa uma perda de menos de 0,7 log TCID<sub>50</sub> por ml de um vírus vivo ou menos de 0,7 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses e, ainda mais preferivelmente, durante mais de 2 anos.. Ainda mais preferivelmente, a composição antigênica de PCV-2 causa uma perda de menos de 0,5 log TCID<sub>50</sub> por ml de um vírus vivo ou menos de 0,5 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais

horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses e, ainda mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. Ainda mais preferivelmente, a composição antigênica de PCV-2 causa uma perda de menos de 0,3 log TCID<sub>50</sub> por ml de um vírus vivo ou menos de 0,3 log CFU por ml de uma bactéria viva, quando o vírus vivo ou bactéria viva é misturada e incubada com a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses e, ainda mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. O vírus vivo pode ser

qualquer vírus vivo mas, de preferência, o vírus vivo é o vírus de PRRS, de preferência, o vírus de PRRS tendo o Número de Acesso à ATCC VR 2332. A bactéria viva pode ser qualquer bactéria mas, de preferência, é a bactéria *Mycoplasma hyopneumonia*, de preferência a cepa J de *Mycoplasma hyopneumonia*. A TCID<sub>50</sub> por ml pode ser estimada por meio de um ensaio padrão de titulação *in vitro*, o qual permite a estimativa da quantidade de um vírus vivo. A CFU por ml pode ser determinada também por meio de um ensaio padrão de titulação *in vitro*, o qual permite a estimativa da quantidade de uma bactéria viva. O termo "por ml" refere-se, de preferência, a 1 ml de um fluido .

[00073] Em um outro aspecto, a composição antigênica de PCV-2 descrita acima compreende um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos. De preferência, o outro componente é um adjuvante e, ainda mais preferivelmente, em que o adjuvante é um polímero de ácido acrílico ou metacrílico e, ainda mais preferivelmente, em que o adjuvante é Carbomer. De preferência, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. Ainda mais preferivelmente o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose. Mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 1 mg por dose.

[00074] O presente pedido não apenas proporciona métodos de produção de composições antigênicas de PCV-2 e/ou das composições antigênicas de PCV-2 conforme definido acima, ele

refere-se também a uma composição antigênica de PCV-2 que é obtenível através de qualquer um dos métodos descritos aqui. Assim, em um outro aspecto, o presente pedido refere-se a uma composição antigênica de PCV-2 que é obtida por meio de um método compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2. De preferência, o antígeno PCV-2 é usado como está ou na composição antigênica de PCV-2. O termo "uma composição antigênica de PCV-2 obtida por meio de um método proporcionados aqui" também significa que a composição antigênica de PCV-2 é obtenível por meio de um método proporcionados aqui. De acordo com um outro aspecto, o presente pedido também refere-se à composição antigênica de PCV-2 que é obtida por meio de remoção da porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2 por meio de uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido, em que o segundo líquido é diferente do primeiro líquido. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido refere-se a uma composição antigênica de PCV-2 obtida por meio de um método compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido, em que o segundo líquido é diferente do primeiro líquido. De preferência, a troca da porção do primeiro líquido com o segundo líquido compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2.

[00075] De acordo com um outro aspecto, a composição antigênica

de PCV-2 é, de preferência, obtida por meio de um método em que a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 através de uma etapa de filtração utilizando um filtro. Contudo, quaisquer outros métodos conhecidos por aqueles versados no campo podem ser usados para remover a porção dos primeiro e segundo fluidos do antígeno PCV-2, por exemplo, centrifugação e/ou chromatography. Contudo, filtração é mais preferida. Métodos de filtração preferidos para remover a porção do primeiro fluido compreendem ultra- e/ou dia-filtração. A etapa de concentração e a etapa de adição de líquido do método conforme descrito aqui podem ser realizadas de modo simultâneo ou, alternativamente, a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido refere-se a uma composição antigênica de PCV-2 obtida por meio de um método compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido, em que o segundo líquido é diferente do primeiro líquido. De preferência, a troca da porção do primeiro líquido com o segundo líquido compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, em que a etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Por exemplo, em um outro aspecto, a etapa de adição de líquido ocorre antes da etapa de concentração e, em um aspecto alternativo, a etapa de concentração ocorre antes da etapa de

adição de líquido.

[00076] Em um outro aspecto, o presente pedido refere-se a uma composição antigênica de PCV-2 que pode ser obtida usando um método descritos aqui, em que a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração, a despeito da ordem na qual elas são realizadas, podem ser realizadas múltiplas vezes. Por exemplo, cada uma dessas respectivas etapas pode ser realizada pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos 10, até tantas vezes quanto desejado. Em um aspecto, a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são, cada uma, realizadas pelo menos duas vezes. Em outro aspecto, a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são, cada uma, realizadas pelo menos três vezes.

[00077] Em um outro aspecto do presente pedido, a composição antigênica de PCV-2 da presente invenção é obtida conforme descrito acima, em que filtração é o método preferido para remover uma porção do primeiro líquido ou, no caso de múltiplas etapas de remoção conforme descrito acima, uma porção da mistura de fluido das primeira e segunda etapas do antígeno PCV-2. O filtro pode ser qualquer filtro convencional na técnica. De preferência, o filtro inclui uma membrana semipermeável. Em uma outra forma preferida, a membrana semipermeável tem um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 para, desse modo, impedir passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e reter o antígeno PCV-2 pelo filtro. Em um outro aspecto, o filtro tem um tamanho médio de poro o qual impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente, o filtro tem um tamanho médio de poro o qual impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, o filtro tem um tamanho médio de poro o qual impede a passagem de pelo menos

90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Em ainda um outro aspecto, a membrana semipermeável inclui um material selecionado do grupo consistindo de polissulfona, poliéster sulfona e celulose regenerada. Contudo, qualquer outro material pode ser usado, o qual permite remoção de uma porção do primeiro fluido e, no caso de uma etapa com múltiplos processos, remoção de uma mistura de fluido das primeira e segunda etapas do antígeno PCV-2. Em um outro aspecto, o filtro é selecionado do grupo consistindo de um cartucho de ultra filtração com membrana de fibra oca, folhas planas ou um cassete, com um cartucho de ultra filtração com membrana de fibra oca sendo particularmente preferido.

[00078] Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido refere-se a uma composição antigênica de PCV-2 que é obtida usando os métodos conforme descrito acima, em que o filtro É ou compreende, de preferência, uma membrana semipermeável. De preferência, a membrana semipermeável tem um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Conforme descrito acima, a etapa de remoção inclui, em geral, a troca da porção do primeiro fluido contra uma porção do fluido da segunda etapa compreendendo as etapas de a)

adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2, em que a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, por exemplo, duas vezes, três vezes, 5 vezes, 10 vezes, etc. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas duas vezes, mais preferivelmente, três vezes.

[00079] A etapa de concentração do método proporcionados aqui para obter a composição antigênica de PCV-2 é realizada de modo que o antígeno PCV-2 é concentrado de 3X a 50X em comparação com o volume do primeiro líquido. Mais preferivelmente, a etapa de concentração é feita in de modo que o antígeno PCV-2 é concentrado 4X a 20X em comparação com o volume do primeiro líquido. Mais preferivelmente, etapa de concentração é feita in de modo que o antígeno PCV-2 é concentrado de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido refere-se a uma composição antigênica de PCV-2 obtida através de um método descrito acima, em que o antígeno PCV-2 é concentrado de 3X a 50X, de preferência de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido. De preferência, a porção do primeiro fluido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido compreendendo as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2 de 3X a 50X, de preferência de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido é realizada de

modo substancialmente simultâneo ou sequencial com a etapa de concentração. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência dia- e/ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00080] De preferência, purificação adicional para obter a composição antigênica de PCV-2 compreendendo um antígeno PCV-2 purificado conforme definido aqui, pode ser obtida realizando purificação adicional etapa compreendendo iii) purificação da coleta da etapa ii) compreendendo antígeno PCV-2 (através de quaisquer métodos descritos aqui), o qual é obtido após a remoção de uma porção do primeiro líquido, através de uma etapa de cromatografia. De forma a obter um maior grau de pureza, uma segunda etapa de cromatografia pode ser feita a qual, contudo, é diferente da primeira. Por exemplo, se a primeira etapa de purificação / etapa de cromatografia é exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda será diferente dessa, por exemplo, uma cromatografia por afinidade, cromatografia de troca de íons, etc. De preferência, se a primeira

etapa para purificar o antígeno PCV-2, de preferência para purificar o antígeno ORF2 de PCV-2, é uma cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda etapa pode ser cromatografia de troca de íons, de preferência, uma cromatografia de troca de íons (AIEX). Uma matriz para cromatografia de troca de íons preferida para a purificação de antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, é Q Sepharose. Em uma pequena escala de cerca de 50 ml, uso de colunas HiTrap Q Sepharose HP de 5 ml é mais preferido. A cromatografia de troca de íons pode ser conduzida, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 3. Resumidamente, cerca de 50 ml da reserva de fração do volume de vazios da etapa de cromatografia por exclusão de tamanho podem ser carregados sobre a coluna AIEX em uma taxa de fluxo de 3,0 ml/min. Após uma etapa de lavagem usando, por exemplo, Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM para remover o material não ligado, a proteína pode ser eluída com uma única etapa de 8 volumes de coluna do seguinte tampão (Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM, NaCl a 1,0 M). O fluxo passante da passagem em AIEX pode ser carregado de volta sobre a coluna Q Sepharose e eluído conforme descrito acima para aumentar o rendimento. Essa técnica em duas etapas (exclusão de tamanho, seguido por uma cromatografia de troca de íons) separa eficazmente o antígeno ORF2 de PCV-2 da maioria dos outros componentes de proteína da coleta de cultura.

[00081] Em um outro aspecto, a atividade virucida da composição antigênica de PCV-2 produzida por meio dos métodos descritos aqui é reduzida em pelo menos 10% quando comparado com o líquido que não tenha sofrido o método. Mais preferivelmente, a atividade virucida da composição antigênica de PCV-2 é reduzida em pelo menos 50% quando comparado ao primeiro líquido que não tenha sofrido o método. Ainda mais preferivelmente, a atividade virucida da

composição antigênica de PCV-2 é reduzida em pelo menos 70% quando comparado ao primeiro líquido que não tenha sofrido o método.

[00082] Assim de acordo com um outro aspecto, o presente pedido refere-se à composição antigênica de PCV-2 obtida por meio de um método compreendendo as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2, em que a atividade virucida - de preferência em relação ao vírus de PRRS - da composição antigênica de PCV-2 obtida após a etapa ii) é reduzida em pelo menos 10%, de preferência, pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 70%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% quando comparado com aquela do primeiro líquido. De preferência, a porção do primeiro líquido tendo atividade virucida é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita in de modo que ela compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial com a etapa de concentração conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- e/ou ultra-filtração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A

membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus. Purificação adicional para obter um antígeno PCV-2 purificado pode ser feita conforme descrito acima.

[00083] De acordo com um outro aspecto, o presente pedido refere-se a uma composição antigênica de PCV-2 obtida através de um método descrito aqui, em que a composição antigênica de PCV-2 causa uma perda de menos de 1 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml -, de preferência menos de 0,9 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml -, ainda mais preferivelmente menos de 0,7 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml -, ainda mais preferivelmente menos de 0,5 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml -, mais preferivelmente, menos de 0,3 log TCID<sub>50</sub> - de preferência por ml - de um vírus vivo, de preferência, de um PRRSV vivo ou menos de 1 log CFU - de preferência por ml -, de preferência menos de 0,9 log CFU - de preferência por ml -, ainda mais preferivelmente menos de 0,7 log CFU - de preferência por ml -, ainda mais preferivelmente menos de 0,5 log CFU - de preferência por ml -, mais preferivelmente, menos de 0,3 log CFU - de preferência por ml - de uma bactéria viva, de preferência de *Mycoplasma hyopneumoniae*, quando o vírus vivo, de preferência PRRSV ou bactéria viva, de preferência *Mycoplasma hyopneumoniae*, é misturada e incubada com

a composição antigênica de PCV-2 durante 2 ou mais horas, de preferência durante mais de 4 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 24 horas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 7 dias, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 semanas, ainda mais preferivelmente durante mais de 2 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 3 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 4 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 6 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 9 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 12 meses, ainda mais preferivelmente durante mais de 18 meses e, ainda mais preferivelmente, durante mais de 2 anos. O vírus vivo pode ser qualquer vírus vivo mas, de preferência, o vírus vivo é o vírus de PRRS, de preferência, o vírus de PRRS tendo o Número de Acesso à ATCC VR 2332. A bactéria viva pode ser qualquer bactéria mas, de preferência, é a bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, de preferência a cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae*. A TCID<sub>50</sub> por ml pode ser estimada por meio de um ensaio padrão de titulação *in vitro*, o qual permite a estimativa da quantidade de um vírus vivo. A CFU por ml pode ser determinada também por meio de um ensaio padrão de titulação *in vitro*, o qual permite a estimativa da quantidade de uma bactéria viva. O termo "por ml" refere-se, de preferência, a 1 ml de um fluido.

[00084] Em um outro aspecto, o presente pedido de patente refere-se a uma composição antigênica de PCV-2 que é obtida através de um método descrito acima, ainda compreendendo a etapa de coleta do antígeno PCV-2 que resta após a etapa ii). Essa coleta pode ser feita de qualquer maneira convencional. Em uma maneira particularmente

preferida de coleta, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 via uma etapa de filtração e o antígeno PCV-2 é recuperado ou coletado do retentado do filtro.

[00085] Em um outro aspecto, the composição antigênica de PCV-2 obtido através de qualquer um dos métodos descritos aqui é misturado com um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos. De preferência, o outro componente é um adjuvant e, ainda mais preferivelmente em que o adjuvante é um polímero de ácido acrílico ou metacrílico e, ainda mais preferivelmente, em que o adjuvante é Carbomer.

[00086] Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona uma composição antigênica de PCV-2 obtida através de um método descrito acima, ainda compreendendo a etapa de mistura do antígeno PCV-2 obtido através do método descrito aqui com um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos. De preferência, o outro componente é um adjuvant e, ainda mais preferivelmente em que o adjuvante é um polímero de ácido acrílico ou metacrílico e, ainda mais preferivelmente, em que o adjuvante é Carbomer. De preferência, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. Ainda mais preferivelmente o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose. Mais preferivelmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de cerca de 1 mg por dose.

[00087] Em um outro aspecto, a composição antigênica de PCV-2 descrita acima compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2. Assim, de acordo com um outro aspecto do presente pedido, o presente pedido proporciona uma composição antigênica de PCV-2 obtida através de um método descrito acima, em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2.

[00088] Conforme mencionado acima, o antígeno PCV-2 usado no método descrito aqui pode ser obtido através de qualquer método conhecido na técnica. De preferência, o antígeno PCV-2 é obtido via um vetor viral, de preferência um vetor viral de baculovírus recombinante contendo e expressando o antígeno PCV-2, de preferência ORF-2 de PCV-2. Em formas preferidas, o antígeno PCV-2 é obtido seguindo os procedimentos descritos no documento WO2006/072065 (os ensinamentos e conteúdos dos quais foram previamente incorporados por referência). Assim, de acordo com um outro aspecto do presente pedido, o presente pedido proporciona uma composição antigênica de PCV-2 obtida através de um método descrito acima, em que o antígeno PCV-2 é obtido via um vetor viral, de preferência um vetor viral de baculovírus recombinante contendo e expressando o antígeno PCV-2, de preferência ORF-2 de PCV-2 e em que o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2.

[00089] Em um outro aspecto do presente pedido, the composição antigênica de PCV-2 é obtida através do método descrito acima e ainda compreende a etapa de inativação de o vetor viral de

baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária. Em formas preferidas, o método ainda compreende a etapa de adição de uma quantidade de um agente que neutraliza o agente de inativação de DNA, a quantidade sendo equivalente à quantidade do agente de inativação de DNA, em que o agente que neutraliza o agente de inativação de DNA compreende uma solução de tiossulfato de sódio concentrada para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM e em que o agente de inativação de DNA é BEI. De preferência, a etapa de inativação é realizada após pelo menos uma porção do primeiro líquido ser removida do antígeno PCV-2.

[00090] Em um outro aspecto do presente pedido, the composição antigênica de PCV-2 é obtida através do método descrito acima ainda compreendendo a etapa de mistura do antígeno PCV-2 obtido após as etapas de inativação e neutralização. Assim, de acordo com um outro aspecto, o presente pedido proporciona uma composição antigênica de PCV-2 obtida por meio de um método descrito acima compreendendo as etapas de i) obtenção de um antígeno PCV-2 in um primeiro líquido; ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2; iii) inativação de o vetor viral de baculovírus recombinante com um agente de inativação de DNA, de preferência na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de etilenimina binária; iv) adição de uma quantidade de um agente de neutralização que neutraliza o agente de inativação, a quantidade de agente de neutralização sendo equivalente à quantidade do agente de inativação, em que o agente de neutralização compreende, de preferência, uma solução de tiossulfato de sódio, de preferência concentrada para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM e em que o agente de inativação compreende, de preferência,

BEI; e, de preferência, etapa v), compreendendo mistura do antígeno PCV-2 obtido na etapa iv) com um outro componente selecionado do grupo consistindo de veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos.

[00091] Em um outro aspecto do presente pedido, a composição antigênica de PCV-2 descrita acima, de preferência obtida por meio dos métodos descritos acima, ainda compreende pelo menos um antígeno adicional, de preferência um antígeno viral ou bacteriano e, mais preferivelmente um antígeno viral ou bacteriano de pelo menos um outro organismo que causa doença em suínos. Em um outro aspecto, o pelo menos um antígeno adicional é Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína. Ainda mais preferivelmente, o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína compreende um vírus vivo e, ainda mais preferivelmente, um vírus vivo modificado. Ainda mais preferivelmente, o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína vivo modificado compreende uma cepa de um vírus vivo modificado com Número de Acesso ATCC VR 2332 e, ainda mais preferivelmente, compreende MLV de PRRS INGELVAC®. Em um outro aspecto do presente pedido, o pelo menos um antígeno adicional é *Mycoplasma hyopneumoniae*. De preferência, o antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma bacterina e, mais preferivelmente, a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* é INGELVAC® MYCOFLEX. Em um outro aspecto do presente pedido, a composição antigênica de PCV-2 descrita acima, de preferência obtida por meio dos métodos descritos acima, ainda compreende o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína, de preferência um Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína vivo modificado, ainda mais preferivelmente, o Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína tendo o Número de Acesso à ATCC VR 2332 ou o Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína

incluído em MLV de PRRS INGELVAC® ou INGELVAC® PRRS ATP. Em um outro aspecto do presente pedido, a composição antigênica de PCV-2 descrita acima, de preferência obtida por meio dos métodos descritos acima, ainda compreende *Mycoplasma hyopneumoniae*, de preferência, bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* e, mais preferivelmente INGELVAC® MYCOFLEX ou a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* incluída em INGELVAC® MYCOFLEX. Em um outro aspecto, a composição antigênica de PCV-2 descrita aqui compreende um Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína, de preferência, qualquer um daqueles descritos acima e uma *Mycoplasma hyopneumoniae*, de preferência, qualquer um daqueles descritos acima.

[00092] Quando a composição antigênica de PCV-2 compreendendo o pelo menos um antígeno adicional de pelo menos um outro organismo que causa doença em suínos conforme descrito acima, de preferência o antígeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína e/ou *Mycoplasma hyopneumoniae*, é obtida através de um método descrito aqui, o método compreende as etapas de i) obtenção de um antígeno PCV-2 em um primeiro líquido; ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2; e combinação do antígeno PCV-2 com pelo menos um antígeno adicional, de preferência um antígeno viral ou bacteriano e, mais preferivelmente, um antígeno viral ou bacteriano de pelo menos um outro organismo que causa doença em suínos. De preferência, o antígeno PCV-2 compreende a proteína ORF-2 de PCV-2, mais preferivelmente proteína ORF-2 recombinante de PCV-2 e, ainda mais preferivelmente, partículas semelhantes a vírus de proteína ORF-2. De preferência, a porção do primeiro líquido é removida do antígeno PCV-2 por meio de uma troca de uma porção do primeiro líquido contra um segundo líquido. A troca é, de preferência, feita de modo que ela

compreenda as etapas de a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido o qual contém o antígeno PCV-2 e b) concentração do antígeno PCV-2, de preferência de 3X a 50X, ainda mais preferivelmente de 4X a 20X e, ainda mais preferivelmente, de 7X a 10X em comparação com o volume do primeiro líquido por meio de remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos do antígeno PCV-2. De preferência, a etapa de adição de líquido e a etapa de concentração são realizadas múltiplas vezes, de preferência, duas vezes, ainda mais preferivelmente três vezes. Em tal casos, não apenas o primeiro líquido é removido, mas também uma mistura dos primeiro e segundo líquidos. De preferência, cada etapa de adição de líquido é realizada de modo substancialmente simultâneo ou sequencial conforme descrito acima. Quando a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas sequencialmente, a ordem das etapas não importa. Além disso, a etapa de concentração é, de preferência, feita por meio de filtração - de preferência, através de dia- ou ultrafiltração, utilizando um filtro o qual, de preferência, contém uma membrana semipermeável. A membrana semipermeável tem, de preferência, um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 e impede a passagem de pelo menos 90% do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e retém o antígeno PCV-2 dentro do filtro para coleta ou recuperação. De preferência, o tamanho médio de poro da membrana semipermeável ou de qualquer outro filtro que é usado aqui impede a passagem de pelo menos 90% das proteínas de 50 kDa a 500 kDa de tamanho, mais preferivelmente pelo menos 90% das proteínas de 75 kDa a 400 kDa de tamanho e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 90% das proteínas de 100 kDa a 300 kDa de tamanho. Esse tamanho de poro é preferido quando o antígeno PCV-2 é produzido como vírus inteiro ou como partículas semelhantes a vírus.

[00093] A presente invenção, conforme definido acima, proporciona novos métodos de produção de um antígeno PCV-2 e composições imunogênicas compreendendo um antígeno PCV-2, em que o antígeno PCV-2 mostra uma atividade virucida reduzida e/ou imunogenicidade aumentada (cada um conforme definido aqui), em que o método compreende as etapas de i) obtenção de um primeiro líquido contendo um antígeno PCV-2, ii) remoção de pelo menos uma porção do primeiro líquido do antígeno PCV-2. Além disso, a presente invenção também proporciona um antígeno PCV-2, bem como composições imunogênicas compreendendo tal antígeno PCV-2 que mostra uma atividade virucida reduzida e/ou imunogenicidade aumentada (cada um conforme definido aqui). De acordo com um outro aspecto, o antígeno PCV-2, bem como as composições imunogênicas compreendendo um antígeno PCV-2 purificado que mostra uma atividade virucida reduzida e/ou imunogenicidade aumentada podem, alternativamente, ser obtidos por meio do método a seguir (II). O antígeno PCV-2 purificado de acordo com a invenção, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2 purificado, pode ser obtido por meio de purificação de um preparado de vírus PCV-2, em particular por meio de purificação do vírus inteiro. Preparados de vírus inteiros são descritos, por exemplo, no documento WO 99/18214 ou WO 03/049703. Além disso, antígeno PCV-2 purificado pode também ser obtido por meio de purificação de um antígeno PCV-2 de expressão recombinante, de preferência por meio de purificação de um antígeno ORF2 de PCV-2 recombinante. Sistemas de expressão para a produção de antígeno PCV-2 recombinante, de preferência para a produção de antígenos ORF2 de PCV-2 recombinantes, são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, sistemas de expressão bacterianos, sistemas de expressão de levedura, sistemas de expressão de células de inseto ou mamífero.

Vetores e métodos para a produção e/ou uso de vetores (ou recombinantes) para expressão do antígeno PCV-2s são descritos no pedido em alguma parte.

[00094] Células preferidas são aquelas passíveis de infecção com um vetor viral recombinante apropriado, contendo um DNA de ORF2 de PCV-2 e expressando a proteína ORF2 de PCV-2. De preferência, as células são células de inseto e, mais preferivelmente, elas incluem as células de inseto vendidas sob a marca comercial Insect Cells SF+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT). Culturas de células preferidas têm uma contagem de células entre cerca de 0,3 - 2,0 x 10<sup>6</sup> células/mL, mais preferivelmente de cerca de 0,35 - 1,9 x 10<sup>6</sup> células/mL, ainda mais preferivelmente, de cerca de 0,4 - 1,8 x 10<sup>6</sup> células/mL, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,45 - 1,7 x 10<sup>6</sup> células/mL e, ainda mais preferivelmente, de cerca de 0,5 - 1,5 x 10<sup>6</sup> células/mL.

[00095] Vetores virais preferidos incluem baculovírus, tal como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), em particular contanto que as células de produção sejam células de inseto. Embora o sistema de expressão de baculovírus seja preferido, será entendido por aqueles versados no campo que outros sistemas de expressão, incluindo aqueles descritos acima, funcionarão para fins da presente invenção, isto é, a expressão de antígeno ORF2 de PCV-2.

[00096] Meios de crescimento apropriados também serão determináveis por aqueles versados no campo, com um meio de crescimento preferido sendo meio para células de inseto isento de soro, tal como Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) e semelhantes.

[00097] O vetor viral recombinante contendo as sequências de DNA de OFR2 de PCV-2 tem uma multiplicidade de infecção (Multiplicity Of

Infección - MOI) preferida 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, ainda mais preferivelmente, de cerca de 0,1 - 1,0, quando usado para a infecção das células suscetíveis. De preferência, a MOI mencionada acima refere-se a um mL de fluido de cultura celular. De preferência, 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, ainda mais preferivelmente de cerca de  $0,45 - 1,7 \times 10^6$  células/mL e, ainda 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 PCV-2 e expressando o antígeno ORF2 de PCV-2 protein tendo uma MOI (Multiplicity of Infection - Multiplicidade de Infecção) 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, ainda mais preferivelmente, de cerca de 0,1 - 1,0.

[00098] As células infectadas são, então, incubadas durante 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, ainda 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, ainda mais preferivelmente de cerca de 26 - 28°C e, ainda mais preferivelmente, cerca de 27°C. De preferência, as células SF+ são observadas, após incubação, com relação à características induzidas por baculovírus. Tal observação pode incluir monitoramento das tendências de densidade celular e da diminuição na viabilidade durante o período pós-infecção. Descobriu-se que a titulação de pico viral é observada 3 - 5 dias após infecção e a produção de antígeno

ORF2 de PCV-2 de pico em células é obtida entre dias 5 e 8 pós-infecção e/ou quando a viabilidade celular diminui para menos de 10%.

[00099] O antígeno ORF2 de PCV-2 pode ser purificado da coleta por meio de métodos padrões conhecidos por aqueles versados no campo, por exemplo, através daqueles descritos in Protein purification methods – a practical approach (E.L.V. Harris e S. Angel, eds., IRL Press at Oxford University Press). Esses métodos incluem, mas não estão limitados a, separação através de centrifugação e/ou filtração, precipitação, cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel), cromatografia por afinidade, cromatografia de quelato de metal, cromatografia de troca de íons, cromatografia covalente, cromatografia de interação hidrofóbica, etc.

[000100] O processo de recuperação do antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2, começa, de preferência, com a separação de resíduos celulares do antígeno ORF2 de PCV-2 expresso via uma etapa de separação. Etapas de separação preferidas incluem filtração, centrifugação em velocidades de até cerca de 20,000 x g, centrifugação em fluxo contínuo, separação cromatográfica usando troca de íons ou filtração em gel e métodos de imunoafinidade convencionais. Esses métodos são conhecidos por aqueles versados no campo, por exemplo, (E.L.V. Harris e S. Angel (eds.), Protein purification methods – a practical approach, IRL Press Oxford 1995). Os métodos de separação mais preferidos incluem centrifugação em velocidades de até cerca de 20,000 x g e filtração. Métodos de filtração preferidos incluem microfiltração "dead-end" e filtração em fluxo tangencial (ou fluxo transversal), incluindo filtração em fibra oca e microfiltração "dead-end". Desses, microfiltração "dead-end" é preferida. Tamanhos de poro preferidos para microfiltração "dead-end" estão 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 - 1,1  $\mu$ m e, ainda mais preferivelmente, entre cerca de 0,45 - 1,0  $\mu$ m. Acredita-se que qualquer membrana de filtração convencional funcionará para fins da presente invenção e membranas de poliéster sulfona são preferidas. Qualquer espécie de ácido nucleico de baixo peso é removida durante a etapa de filtração.

[000101] Purificação adicional de antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2, pode ser obtida com procedimentos de cromatografia, de preferência um procedimento de cromatografia em duas etapas. Contudo, também é possível começar com o procedimento de cromatografia no caso em que o material de carregamento não compreende resíduos celulares.

[000102] Se o antígeno PCV-2 é montando em partículas semelhantes a vírus (VLP), a primeira etapa é, de preferência, uma cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel) a qual pode ser feita, por exemplo, usando uma matriz Sephadex G-25 ou Sephadex G-100. Em escala de laboratório, uso de colunas HiPrep 26/60 Sephadex G-25 ou Sephadex G-100 são mais preferidos. Contudo, quaisquer outras matrizes de cromatografia por exclusão de tamanho conhecidas por aqueles versados no campo podem ser usadas, as quais permitem a separação das VLPs de ORF2 de PCV-2 do filtrado ou sobrenadante de cultura. Matrizes adequadas são descritas, por exemplo, em E.L.V. Harris e S. Angel (eds.), *Protein purification methods – a practical approach*, IRL Press Oxford 1995). A cromatografia de filtração em gel pode ser conduzida, por exemplo, por meio de carregamento da coluna com o preparado bruto compreendendo o antígeno PCV-2 com uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min e eluindo a coluna com um volume de 1,5 colunas de um tampão compreendendo Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM. Contudo, o antígeno ORF2 de PCV-2 pode também ser purificado usando cromatografia por afinidade, por exemplo, via ligação seletiva a um anticorpo específico para ORF2 de PCV-2 imobilizado ou qualquer

outro método conhecido por aqueles versados no campo.

[000103] Assim, de acordo com uma modalidade preferida, a composição imunogênica compreendendo um antígeno PCV-2 purificado, de preferência a purificado antígeno ORF2 de PCV-2 e o adjuvante, é obtenível através de um processo compreendendo as etapas de:

- a) Expressão do antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2 em uma célula hospedeira;
- b) Coleta da cultura obtida de antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2;
- c) Purificação da coleta compreendendo antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, através de cromatografia de exclusão de tamanho (filtração em gel);
- d) Mistura o antígeno PCV-2 purificado, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2, com um adjuvante.

[000104] De acordo com uma modalidade preferida, a cromatografia de exclusão de tamanho é realizada conforme descrito aqui, de preferência, conforme descrito no Exemplo 3. De preferência, a exclusão de tamanho resulta em uma composição imunogênica tendo um grau de pureza de mais de 80% (peso/peso), de preferência, mais de 90% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica antes da mistura com o adjuvante. O grau de pureza pode ser estimado por coloração com Imperial Protein Stain (Pierce) após SDS PAGE via géis de Bis-Tris NuPAGE a 10% (Invitrogen) usando o sistema de tampão MOPS NuPAGE (Invitrogen).

[000105] De forma a obter um maior grau de pureza, uma segunda etapa de cromatografia pode ser feita a qual, contudo, é diferente da primeira. Por exemplo, se a primeira etapa de purificação / etapa de cromatografia é exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda

será diferente dessa, por exemplo, uma cromatografia por afinidade, cromatografia de troca de íons, etc.

[000106] De preferência, se a primeira etapa para purificar o antígeno PCV-2, de preferência para purificar o antígeno ORF2 de PCV-2, é uma cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel), a segunda etapa pode ser cromatografia de troca de íons, de preferência, uma cromatografia de troca de íons (AIEX). Uma matriz para cromatografia de troca de íons preferida para a purificação de antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, é Q Sepharose. Em uma pequena escala de cerca de 50 ml, uso de colunas HiTrap Q Sepharose HP de 5 ml é mais preferido. A cromatografia de troca de íons pode ser conduzida, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 3. Resumidamente, cerca de 50 ml da reserva de fração do volume de vazios da etapa de cromatografia por exclusão de tamanho podem ser carregados sobre a coluna AIEX em uma taxa de fluxo de 3,0 ml/min. Após uma etapa de lavagem usando, por exemplo, Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM para remover o material não ligado, a proteína pode ser eluída com uma única etapa de 8 volumes de coluna do seguinte tampão (Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM, NaCl a 1,0 M). O fluxo passante da passagem em AIEX pode ser carregado de volta sobre a coluna Q Sepharose e eluído conforme descrito acima para aumentar o rendimento. Essa técnica em duas etapas (exclusão de tamanho, seguido por uma cromatografia de troca de íons) separa eficazmente o antígeno ORF2 de PCV-2 da maioria dos outros componentes de proteína da coleta de cultura.

[000107] Assim, de acordo com uma modalidade preferida, a composição imunogênica compreendendo um antígeno PCV-2 purificado, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2 e o adjuvante, é obtêivel através de um processo compreendendo as etapas de:

- a) Expressão do antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2, em uma célula hospedeira;
- b) Coleta da cultura obtida de antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2;
- c) Purificação da coleta compreendendo antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, através de cromatografia de exclusão de tamanho (filtração em gel), seguido por uma cromatografia de troca de íons; e
- d) Mistura do antígeno PCV-2 purificado, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2, com um adjuvante.

[000108] De acordo com uma modalidade preferida, a cromatografia de exclusão de tamanho e a cromatografia de troca de íons são realizadas conforme descrito aqui, de preferência conforme descrito no Exemplo 3. De preferência, a estratégia de separação em duas etapas resulta em uma composição imunogênica tendo um grau de pureza de mais de 90% (peso/peso), de preferência, mais de 95% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica antes da mistura com o adjuvante. O grau de pureza pode ser estimado por coloração com Imperial Protein Stain (Pierce) após SDS PAGE via géis de Bis-Tris NuPAGE a 10% (Invitrogen) usando o sistema de tampão MOPS NuPAGE (Invitrogen).

[000109] Conforme descrito acima, o processo de recuperação do antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2, começa com a separação de resíduos celulares do antígeno OFR2 de PCV-2 expresso via uma etapa de separação. Uma etapa de separação preferida inclui uma micro filtração através de um filtro tendo um tamanho de poro de cerca de 0,6 µm a cerca de 2 µm, de preferência tendo um tamanho de poro de cerca de 0,8 mm a cerca de 1,2 µm.

[000110] Assim a composição imunogênica compreendendo um antígeno PCV-2 purificado, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2

e o adjuvante, é obtenível através de um processo compreendendo as etapas de:

- a) Expressão do antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2 em uma célula hospedeira;
- b) Coleta da cultura obtida do antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2;
- c) Filtração da coleta obtida sob a etapa b) através de um filtro tendo um tamanho de poro de 0,6 a 2,0  $\mu\text{m}$ ;
- d) Purificação do filtrado compreendendo antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2 obtido sob a etapa c) através de cromatografia de exclusão de tamanho (filtração em gel), opcionalmente seguido por uma cromatografia de troca de íons; e
- e) Mistura o antígeno PCV-2 purificado, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2, com um adjuvante.

[000111] De acordo com uma modalidade preferida, a micro-filtração, cromatografia de exclusão de tamanho e a cromatografia de troca de íons são realizadas conforme descrito aqui, de preferência, conforme descrito no Exemplo 3. De preferência, a estratégia de purificação em duas etapas, incluindo a etapa de pré-filtração, resulta em uma composição imunogênica tendo um grau de pureza de mais de 90% (peso/peso), de preferência, mais de 95% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica antes da mistura com o adjuvante. O grau de pureza pode ser estimado por coloração com Imperial Protein Stain (Pierce) após SDS PAGE via géis de Bis-Tris NuPAGE a 10% (Invitrogen) usando o sistema de tampão MOPS NuPAGE (Invitrogen).

[000112] As composições imunogênicas compreendendo antígeno PCV-2 purificado, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2 purificado descrito aqui, de preferência aqueles obteníveis por meio dos métodos descritos aqui, são caracterizadas por uma

imunogenicidade aumentada quando comparado com uma composição imunogênica não compreendendo tal antígeno PCV-2 purificado ou purificado antígeno ORF2 de PCV-2.

[000113] No caso em que vetores virais, tais como um poxvírus, adenovírus ou baculovírus recombinante, é usado para produzir o antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, recomenda-se inativar o ácido nucleico viral através de um tratamento de inativação apropriado. Tal inativação pode ocorrer há qualquer momento durante a purificação do antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2. Assim, inativação pode ocorrer imediatamente após a coleta do fluido de cultura celular compreendendo antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2 ou após a micro-filtração do antígeno PCV-2, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2, se micro-filtração é feita, prior ou após a purificação etapa, por exemplo, antes ou após a filtração em gel e antes ou após a cromatografia de troca de íons, se isso é feito.

[000114] Qualquer método convencional de inativação pode ser usado para fins da presente invenção. Assim, inativação pode ser realizada através de tratamentos físicos e/ou químicos. Em formas preferidas, o volume de fluidos coletados é determinado e a temperatura é levada para entre cerca de 32°C - 42°C, mais preferivelmente entre cerca de 34°C - 40°C e, ainda mais preferivelmente, entre cerca de 35°C - 39°C. Métodos de inativação preferidos incluem a adição etilenimina binária (BEI) ciclizada, de preferência em uma concentração de cerca de 1 a cerca de 20 mM, de preferência 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, mais preferivelmente, de cerca de 5 mM. Por exemplo, a inativação inclui a adição de uma solução de bromidrato de 2-bromoetilenoamina (BEA), de preferência

de cerca de 0,4M, a qual tenha sido ciclizada para 0,2M etilenimina binária (BEI) em NaOH a 0,3N, aos fluidos para proporcionar uma concentração final de BEI de cerca de 5 mM. De preferência, os fluidos são, então, continuamente agitados durante 2 - 96 horas e os fluidos inativados coletados podem ser armazenados congelados a - 40°C ou abaixo ou entre cerca de 1°C - 7°C. Após inativação estar completa, uma solução de tiossulfato de sódio, de preferência a 1,0 M, é adicionada para neutralizar qualquer BEI residual. De preferência, o tiossulfato de sódio é adicionado em uma quantidade equivalente quando comparado com o BEI adicionado antes de inativação. Por exemplo, no caso em que BEI é adicionado em uma concentração final de 5 mM, uma solução de tiossulfato de sódio a 1,0 M é adicionada para proporcionar uma concentração final mínima de 5 mM para neutralizar qualquer BEI residual.

[000115] Antes de mistura do antígeno PCV-2 purificado, de preferência do antígeno ORF2 de PCV-2 com um adjuvante, também é recomendado submeter à diálise o antígeno PCV-2 purificado, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2, contra solução salina tamponada com fosfato, pH de 7,4 ou qualquer outro tampão fisiológico.

[000116] Os métodos descritos acima resultam em um antígeno PCV-2 com atividade virucida reduzida conforme definido aqui, bem como em uma imunogenicidade aprimorada, se o antígeno PCV-2 tem a um grau de pureza de mais de 50% (peso/peso), de preferência de mais de 70% (peso/peso), ainda mais preferivelmente de mais de 80% (peso/peso), ainda mais preferivelmente de mais de 85% (peso/peso), ainda mais preferivelmente de mais de 90% (peso/peso), mais preferivelmente de mais de 95% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica antes da mistura com qualquer adjuvante. Contudo, o antígeno PCV-2

purificado obtidável de acordo com esse método II pode também ser misturado e usado junto com um adjuvante, de preferência, com qualquer do adjuvantes descritos aqui. O adjuvante preferido é um Carbopol, de preferência em uma concentração de cerca de 0,1 a 10 mg/ml, mais preferivelmente em uma concentração de 0,5 a 5 mg/ml, mais preferivelmente, de cerca de 1 mg/ml da composição imunogênica final.

[000117] Novamente, a presente invenção não apenas proporciona qualquer dos métodos descritos aqui, incluindo o método alternativo II, it também proporciona um antígeno PCV-2, de preferência, um antígeno PCV-2 purificado, mais preferivelmente, uma proteína ORF-2 de PCV-2 purificada obtidável através de qualquer um dos métodos descritos aqui, incluindo o método alternativo II. Além disso, a presente invenção também proporciona composições antigênicas de PCV-2 compreendendo um antígeno PCV-2, de preferência, um antígeno PCV-2 purificado, mais preferivelmente, uma proteína ORF-2 de PCV-2 purificada obtidável através de qualquer um dos métodos descritos aqui, incluindo o método alternativo II. A quantidade do antígeno PCV-2, em particular do antígeno ORF2 de PCV-2 purificado, na composição imunogênica final estará em uma faixa de cerca de 0,25 a cerca de 400 µg por dose com referência à composição imunogênica final. De preferência, a composição imunogênica final incluirá uma quantidade de antígeno PCV-2, de preferência de antígeno ORF2 de PCV-2, em uma faixa de cerca de 2 a cerca de 200 µg/dose e, ainda mais preferivelmente de cerca de 3 a cerca de 150 µg/dose e, ainda mais preferivelmente, de cerca de 4 a cerca de 100 µg/dose e, ainda mais preferivelmente, de cerca de 5 a cerca de 80 µg/dose e, ainda mais preferivelmente, de cerca de 6 a cerca de 60 µg/dose e, ainda mais preferivelmente de cerca de 7 a cerca de 50 µg/dose e, ainda mais preferivelmente de cerca de 8 a cerca de 40 µg/dose e, ainda

mais preferivelmente, de cerca de 8 a cerca de 32 µg/dose e, ainda mais preferivelmente de cerca de 8 a cerca de 24 µg/dose e, mais preferivelmente, de cerca de 8 a cerca de 16 µg/dose.

[000118] As composições imunogênicas, conforme proporcionado aqui, incluindo aquelas obtidas através do método II, compreendem um ou mais抗igenos adicionais de outro organismo que causa doença. Esses "outros organismos que causam doenças" são definidos acima. De preferência, um抗igeno adicional é Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína. Ainda mais preferivelmente, o抗igeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína compreende um vírus vivo e, ainda mais preferivelmente, um vírus vivo modificado. Ainda mais preferivelmente, o抗igeno Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína vivo modificado compreende uma cepa de um vírus vivo modificado com Número de Acesso ATCC VR 2332 e, ainda mais preferivelmente, compreende MLV de PRRS INGELVAC®. Em um outro aspecto do presente pedido, um抗igeno adicional é *Mycoplasma hyopneumoniae*. De preferência, o抗igeno *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma bacterina e, mais preferivelmente, a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* é INGELVAC® MYCOFLEX. Mais preferidas são combinações com o抗igeno de Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína e *Mycoplasma hyopneumoniae*.

[000119] Em virtude da imunogenicidade aumentada da composição imunogênica incluindo抗igeno PCV-2 purificado, de preferência o抗igeno ORF2 de PCV-2 purificado proporcionado aqui, as composições imunogênicas podem ser usadas para redução da incidência ou redução da gravidade de sinais clínicos causados ou estando associados à infecções por PCV-2 quando comparado com um animal que não recebeu que composição imunogênica.

[000120] O termo "redução na incidência ou gravidade de sinais

"clínicos" significará que qualquer um de tais sinais têm a incidência ou gravidade reduzida em animais que receberam uma administração da vacina em comparação com um "grupo de controle" de animais quando ambos foram infectados com ou estimulados pelo patógeno do qual o(s) componente(s) imunológico(s) ativo(s) na vacina são derivados e em que o grupo de controle não recebeu uma administração da vacina ou composição imunogênica. Nesse contexto, o termo "diminuição" ou "redução" significa uma redução de pelo menos 10%, de preferência, 25%, ainda mais preferivelmente 50%, mais preferivelmente, de mais de 100% no grupo vacinado quando comparado com o grupo de controle não vacinado.

[000121] Conforme usado aqui, "sintomas clínicos" ou "sinais clínicos" se referirá a sinais de infecção por um patógeno que são diretamente observáveis a partir de um animal vivo, tais como sintomas. Exemplos representativos dependerão do patógeno selecionado, mas podem incluir coisas tais como descarga nasal, letargia, tosse, febre elevada, ganho ou perda de peso, desidratação, diarréia, sudorese, fraqueza e semelhantes. Sinais clínicos de infecção por PCV-2 podem incluir perda de massa muscular, palidez da pele, mau estado geral, dificuldade respiratória, diarréia, icterícia e pele amarelada.

[000122] Redução na incidência ou na gravidade de sinais clínicos causados ou estando associados à infecções por PCV-2 em um animal pode ser obtida mediante a administração de apenas uma única dose de tal composição imunogênica a um animal que precisa de tal tratamento. Contudo, a composição imunogênica proporcionado aqui pode também ser administrada em duas doses ou mais doses, com um intervalo de 2 a 4 semanas entre a administração da primeira dose e qualquer dose subsequente. Assim, de acordo com uma outra modalidade, a composição imunogênica proporcionado aqui, incluindo

antígeno PCV-2 purificado, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2 purificado, pode ser administrada em uma, duas ou mais doses a um animal que precisa da mesma.

[000123] Em particular, em um outro aspecto do presente pedido, uma composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito acima é proporcionada, em que a composição imunogênica, quando administrada a um animal, reduz a depleção linfoide e inflamação em pelo menos 80% em um animal quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica. Assim, em um outro aspecto do presente pedido, uma composição imunogênica é proporcionado compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito acima e a composição imunogênica reduz a depleção linfoide e inflamação em pelo menos 80% em um animal que recebeu uma administração da composição imunogênica quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica.

[000124] Em um outro aspecto do presente pedido, uma composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito acima é proporcionado, em que a composição imunogênica, quando administrada a um animal, reduz lesões pulmonares em pelo menos 80% em um animal quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica. Assim, em um outro aspecto do presente pedido, uma composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 é proporcionada conforme descrito acima e a composição imunogênica reduz lesões pulmonares em pelo menos 80% em um animal que recebeu uma administração da composição imunogênica quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica.

[000125] Em um outro aspecto da presente invenção, uma

composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2, conforme descrito acima é proporcionada, em que a composição imunogênica induz a uma resposta imune protetora contra PCV-2 após a administração de uma dose da composição imunogênica. A composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 pode ser de qualquer volume, incluindo 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml e maior. Em formas preferidas, 2 ml da composição imunogênica compreendem uma dose do antígeno PCV-2. Assim, em um outro aspecto da presente invenção, uma composição imunogênica conforme descrito acima é proporcionada, em que a composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 induz a uma resposta imune protetora contra PCV-2 após a administração de uma dose da composição imunogênica. Em um outro aspecto, 2 ml da composição imunogênica compreendem uma dose do antígeno PCV-2.

[000126] Conforme usado aqui, uma "resposta protetora imune" refere-se a uma incidência reduzida ou gravidade reduzida de sintomas clínicos, patológicos ou histopatológicos de infecção por um patógeno de interesse até e incluindo a prevenção completa de tais sinais ou sintomas.

[000127] O termo sinais "patológicos" se referirá a sinais de infecção que são observáveis a nível microscópico ou molecular, através de testagem bioquímica ou com a olho nu quando de necropsia. Para PCV-2, sinais patológicos incluirão lesões microscópicas e macroscópicas sobre múltiplos tecidos e órgãos, com órgãos linfoides sendo o local mais comum para lesões.

[000128] O termo sinais "histopatológicos" se referirá a sinais de alterações teciduais resultantes de infecção.

[000129] Os termos "sintomas clínicos" ou "sinais clínicos" são definidos acima.

[000130] Em um outro aspecto da presente invenção, uma composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 e um antígeno PRRS, de preferência, qualquer um dos antígenos PRRS descritos aqui, conforme descrito acima é proporcionada, em que a composição imunogênica induz a uma resposta imune protetora contra vírus de PRRS após a administração de uma dose da composição imunogênica. Novamente, qualquer volume de dosagem pode ser produzido mas, em formas preferidas, 2 ml da composição imunogênica compreendem uma dose do antígeno PRRS e uma dose do antígeno PCV-2. Assim, em um outro aspecto da presente invenção, uma composição imunogênica conforme descrito acima compreendendo um PRRSV e uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui é proporcionada, em que a composição imunogênica induz a uma resposta imune protetora contra PRRS após a administração de uma dose da composição imunogênica. Em um outro aspecto, 2 ml da composição imunogênica compreendem uma dose do antígeno PRRS e uma dose do antígeno PCV-2.

[000131] Em um outro aspecto da presente invenção, uma composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui e antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* conforme descrito acima é proporcionada, em que a composição imunogênica induz a uma resposta imune protetora contra *Mycoplasma hyopneumoniae* após a administração de uma dose da composição imunogênica. Novamente, qualquer volume de dosagem pode ser produzido mas, em formas preferidas, 2 ml da composição imunogênica compreendem uma dose do antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* e uma dose de um antígeno PCV-2. Assim, em um outro aspecto da presente invenção, uma composição imunogênica conforme descrito acima é proporcionada, em que a composição

imunogênica induz a uma resposta imune protetora contra *Mycoplasma hyopneumoniae* após a administração de uma dose da composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui e antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae*. Em um outro aspecto, 2 ml da composição imunogênica compreendem uma dose do antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae*.

[000132] Em um outro aspecto do presente pedido, uma composição imunogênica, conforme descrito acima, é preparada para administração de 2 ml por dose.

[000133] Em um outro aspecto do presente pedido, um método de redução de um ou mais sintomas clínicos da infecção por PCV-2 em um animal quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica é proporcionado. Em geral, o método compreende a etapa de administração, a um animal, de qualquer uma das composições imunogênicas compreendendo um antígeno PCV-2 ou composição conforme descrito acima. De preferência, um ou mais sintomas clínicos da infecção por PCV-2 são reduzidos após a administração de uma única dose da composição imunogênica. Assim, de acordo com um outro aspecto do presente pedido, um método de redução de um ou mais sintomas clínicos da infecção por PCV-2 em um animal quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui é proporcionado. Em geral, o método compreende a etapa de administração, a um animal, de qualquer uma das composições imunogênicas compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 descrita acima, em que um ou mais sintomas clínicos da infecção por PCV-2 são reduzidos, de preferência, após a administração de uma única dose da composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme

descrito aqui.

[000134] Em um outro aspecto do presente pedido, um método de redução de um ou mais sintomas clínicos de a PRRS infecção em um animal quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica é proporcionado. Em geral, o método compreende a etapa de administração, a um animal, de qualquer uma das composições imunogênicas descritas acima compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui e um vírus de PRRS conforme descrito aqui. De preferência, um ou mais sintomas clínicos de a PRRS infecção são reduzidos após a administração de uma única dose da composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui e um vírus de PRRS conforme descrito aqui. Assim, de acordo com um outro aspecto do presente pedido, um método de redução de um ou mais sintomas clínicos de a PRRS infecção em um animal quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui e um vírus de PRRS conforme descrito aqui, é proporcionado. Sinais clínicos de Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV) incluem, mas não estão limitados a, inapetência, febre, aborto, descoloração transitória, anestro prolongado, tosse, sinais respiratórios, mastite, agalactia, letargia, leitões mumificados, natimortos, leitões fracos ao nascer, redução na taxa de partos, partos precoces, diarréia, perda de massa muscular, coriza, descarga ocular, pele pálida, mortalidade e combinações dos mesmos.

[000135] Em um outro aspecto do presente pedido, um método de redução de um ou mais sintomas clínicos de uma infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em um animal quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica compreende

uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui e um antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* conforme descrito aqui, é proporcionado. Em geral, o método compreende a etapa de administração, a um animal, de qualquer uma das composições imunogênicas descritas acima. De preferência, um ou mais sintomas clínicos de uma infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* são reduzidos após a administração de uma única dose da composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui e um antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* conforme descrito aqui. Assim, de acordo com um outro aspecto do presente pedido, um método de redução de um ou mais sintomas clínicos de uma infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em um animal quando comparado com um animal que não recebeu a composição imunogênica compreendendo uma composição antigênica de PCV-2 conforme descrito aqui e um antígeno *Mycoplasma hyopneumoniae* conforme descrito aqui é proporcionado. Sinais clínicos de infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) incluem, mas não estão limitados a, uma tosse seca, desempenho deficiente e lesões pulmonares.

[000136] A composição imunogênica compreendendo antígeno PCV-2 purificado, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2 conforme proporcionado aqui, tem imunogenicidade aprimorada. Portanto, a composição imunogênica proporcionada com o mesmo é adequada para aprimorar a resposta imune em um animal que está recebendo tal composição imunogênica. Assim, de acordo com uma outra modalidade, a presente invenção proporciona um método para aprimoramento da resposta imune em um animal contra PCV-2 compreendendo a etapa de: administração da composição imunogênica conforme descrito aqui e tendo um antígeno PCV-2 purificado, de preferência uma proteína ORF-2 de PCV-2 purificada

conforme proporcionado aqui, a um animal que precisa da mesma. De acordo com um aspecto preferido, o antígeno PCV-2, de preferência o antígeno ORF2 de PCV-2 usado em tal método, é purificado até o ponto de mais de 60% (peso/peso), de preferência, mais de 60% (peso/peso), ainda mais preferivelmente to mais de 70% (peso/peso), ainda mais preferivelmente to mais de 80% (peso/peso), ainda mais preferivelmente to mais de 90% (peso/peso), mais preferidos to mais de 95% (peso/peso) com referência à quantidade total de proteína incluída na composição imunogênica. O grau de pureza pode ser estimado por coloração com Imperial Protein Stain (Pierce) após SDS PAGE via géis de Bis-Tris NuPAGE a 10% (Invitrogen) usando o sistema de tampão MOPS NuPAGE (Invitrogen). O PCV-2 e, de preferência, a ORF2 de PCV-2 pode ser purificada usando métodos convencionais bem conhecidos por aqueles versados no campo.

#### DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[000137] Os desenhos a seguir formam parte do presente relatório descritivo e são incluídos para demonstrar adicionalmente determinados aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor entendida por meio de referência a um ou mais desses desenhos com combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentada aqui.

[000138] A FIG. 1 mostra os resultados de uma escala piloto configurada para ultrafiltração usando um gel de Bis-Tris/MOPS a 10% que demonstra a presença da ORF 2 após o processo de filtração. As fileiras foram carregadas como segue: (1) marcador; (2) n/a; (3) n/a; (4) 24 - 180/181 Pre conc – 20 µl; (5) 25 - 180/181 1x antígenos – 20 µl; (6) 26 - 180/181 lavagem de filtro – 20 µl; (7) 27 - PCV 504 Preconc – 8 µl; (8) 28 - PCV 504 Perm – 20 µl; (9) 29 - PCV 504 1X – 20 µl; (10) 092704PD – 20 µl; (11) marcador.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

[000139] Os exemplos a seguir apresentam materiais e procedimentos preferidos de acordo com a presente invenção. Deve ser entendido, contudo, que esses exemplos são fornecidos à guisa de ilustração apenas e nada aqui deve ser considerado uma limitação sobre o escopo global da invenção.

### EXEMPLO 1

[000140] Esse exemplo descreve um processo em escala de laboratório e escala piloto para a fabricação de antígeno ORF2 de PCV-2 concentrado que terá uma atividade virucida reduzida em comparação com processos de fabricação que não incluem as etapas da presente invenção. Especificamente, os efeitos que a presente invenção tem sobre a atividade virucida do antígeno ORF2 de PCV-2 sobre o vírus de PRRS serão determinados.

#### Materiais e Métodos

##### Produção de Antígeno:

[000141] Escala de Laboratório:

PCV SUB037 H1-F, 18,94 kg

PCV 1025, 20,6 kg

PCV 180/181, 20,0 kg

PCV SUB 504PD, 40kg

##### Escala Piloto:

PCV SUB 506PD, 362 kg

PCV SUB 507PD, 384 kg

PCV SUB512PD, 430 kg

PCV SUB 513PD, 405 kg

Cartuchos de Ultra Filtração: GE Healthcare, Steam-In-Place (SIP), cartuchos de membrana de fibra oca

UFP-100-E-55-STM: 100.000 NMWC, tubulo com diâmetro de 1 mm; usado em UF-002 em X109, escala de laboratório.

UFP-300-E-55-STM: 300.000 NMWC, tubulo com diâmetro

de 1 mm; usado em UF-002 em X109, escala de laboratório.

UFP-100-E-65-MSM: 100.000 NMWC, tubulo com diâmetro de 1 mm; usado em UF-B2614, em APU-1, escala piloto.

UFP-300-E55-SMO: 300.000 NMWC, tubulo com diâmetro de 1 mm; usado em UF-2713 em VP-1, escala piloto.

[000142] O equipamento de ultrafiltração a seguir foi usado na avaliação de viabilidade e desenvolvimento do processo inicial:

Tabela 1. Equipamento

Etapa de processo	Procedimento	Equipamento	Identificação
Ultrafiltração	Concentração de Antígeno	Flex-Stand Concentrator	UF-002 em X109, escala de laboratório
		UF Skid	UF-B2614 em APU-1, escala piloto
		UF Skid	UF-2713 em VP-1, Escala piloto

Processo de Fabricação:

Configuração de ultrafiltração (UF): Escala de laboratório

[000143] 50 litros de carboligas contendo material ORF2 de PCV-2 filtrado, inativado, neutralizado gerado na instalação P foram usados na processo de concentração com o GE Healthcare (Amersham) Flex Stand 30L, tamanho UF skid #002.

[000144] Os processos iniciais de concentração usaram um esquema de diafiltração "descontinuo", pelo que aproximadamente 20 kg de material antigênico foram transferidos para o UF skid e concentrados através de um cartucho de fibra oca de 100.000 NMWC (UFP-100-E-55-STM). Os processos de concentração a 100.000 NMWC usaram os lotes SUB037PD e PCV1025 de material ORF2 de PCV-2 da Manufacturing and PD, respectivamente.

[000145] Essas duas operações iniciais foram concentradas para aproximadamente 4x o volume original e foram substancialmente quantificadas (Q.S.'d) no tanque de alimentação de volta para o

volume de transferência original. O material concentrado foi tratado dessa maneira por um total de 2 concentrações por numero de lote, com as terceira e a concentração final coletadas como um concentrado e uma porção Q.S.'d para 1X do volume original. As amostras foram extraídas pré-concentração, em cada etapa de concentração e em cada etapa de Q.S. Amostras de permeado foram extraídas durante cada etapa de concentração.

[000146] As próximas duas operações consecutivas concentraram o antígeno ORF2 de PCV-2 sem lavagem com solução salina. O material concentrado foi coletado a aproximadamente 4x e, então, sofreu uma concentração final. Aproximadamente 20 kg de material antigênico foram transferidos para o tanque de contenção UF skid e concentrados através de um cartucho de fibra oca de 300.000 NMWC (UFP-300-E-55-STM). Um segundo volume de 20 L foi adicionado ao tanque de contenção com o concentrado dos primeiros 20 L. Esse foi concentrado para o volume final. Os processos de concentração a 300.000 NMWC usaram os lotes PCV 180/181 Pool e SUB504PD de ORF2 de PCV-2 gerados pela Manufacturing and PD, respectivamente. As amostras foram extraídas pré-concentração e em cada etapa de concentração. Amostras de permeado foram extraídas durante cada etapa de concentração.

#### Configuração de Ultrafiltração: Escala piloto

[000147] Processos em escala piloto utilizaram os lotes SUB 506PD, 512PD e 513PD. Volumes de antígeno pré-concentração oscilavam de aproximadamente 350 L a 430 L. Os lotes SUB506PD e SUB513PD foram transferidos para DSP (processamento a jusante) 2602 e concentrados com UF-B2614 em APU-1 usando um filtro de 100.000 NMWC (UFP-100-65-E-MSM), com uma área de superfície de 4,2 m<sup>2</sup>. SUB512PD foi transferido para DSP 2701 e concentrado com UF-2713 usando um filtro de 300.000 NMWC (UFP-300-E-SMO) com uma área

de superfície de 2,1 m<sup>2</sup>. O material concentrado final foi coletado para cada lote e armazenado a 4°C para análise.

### Resultados e Conclusões

#### Configuração de Ultrafiltração (UF): Escala de laboratório

[000148] Filtração com filtros de 100.000 NMWC (100 kDa) versus 300.000 NMWC (300 kDa) foi comparável quanto ao valor de concentração e foi possível quando se considera um processo em escala total. O valor de filtração para o filtro de 100 kDa, concentração de 4X, com aproximadamente 18 L a 26 L, oscilava de 14 minutos a 32 minutos, com o menor valor resultando das etapas de lavagem com solução salina (Tabela 2). O valor de filtração para o filtro de 300 kDa, concentração de 3,2X, 7X para PCV180/181 e 21,5X para SUB504PD com aproximadamente 40 L de material concentrado em dois volumes de 20 L consecutivos proporcionou 3,2X a 25 minutos, 7X a 23 minutos e 21,5X a 32 minutos. Alguma variação no tempo é esperada em virtude do tempo levado para realizar um processo de concentração em uma pressão transmembrana (TMP) alvo de 10,25 psi.

[000149] Os valores de fluxo de processo oscilavam de 27,43 lmh a 32,00 lmh para o lote PCV180/181, com o valor de 32,00 lmh resultando de um pico em direção ao final do processo de concentração. Valores de fluxo para o material SUB 504PD foram 28,57 lmh para a primeira concentração de 20 L e 35,71 lmh para a 2<sup>a</sup> concentração de 20 L (Tabelas 3 e 4).

Tabela 2. Dados de Processo

Lote #	Volume de concentração inicial	X Conc.	Tempo para concentrar (min)
PCV 037 QS-0 (100 kDa)	18,94	4,17	24
PCV 037 QS-1 (100 kDa)	18,76	4,75	16
PCV 037 QS-2 (100 kDa)	19,05	4,70	14

PCV 1025 QS-0 (100 kDa)	20,59	4,39	28
PCV 1025 QS-1 (100 kDa)	20,24	4,65	29
PCV 1025 QS-2 (100 kDa)	18,71	3,6	17
PCV 180/182 conc-1 (300 kDa)	20	3,50	25
PCV 180/182 conc-2 (300 kDa)	26,01	7,00	23
SUB 504PD conc-2 (300 kDa)	24,72	21,50	32

Tabela 3. Dados de Processo

PCV 180/181: Filtro de 300.000 NMWC				
	TEMPO	TMP	FLUXO PERM (ml/min)	FLUXO (lhm)
Conc-1	9:55	9	N/A	N/A
Conc-2	10:23	12,5	N/A	N/A
Conc-2	10:30	12,5	960	27,43
Conc-2	10:33	14,5	960	27,43
Conc-2	10:36	10,5	1120	32,00
Conc-2	10:39	1	810	23,14

Tabela 4. Dados de Processo

SUB504PD: Filtro de 300.000 NMWC				
	TEMPO	TMP	FLUXO PERM (ml/min)	FLUXO (lhm)
Conc-1	15:29	9,5	1000	28,57
Conc-1	16:00	10,25	1250	35,71

[000150] Descobriu-se que a alteração na potência pós-filtração não foi alterada quando o material concentrado foi Q.S.'d de volta para 1X volume, conforme com o material SUB 037 reconstituído e material PCV 1025 reconstituído. Os valores de teor de antígeno concentrado ultrapassaram os limites do ensaio alem do limite validado de aproximadamente 64 µg, conforme é visto nos valores nas tabelas 5 a 8, onde as quantidades de teor de antígeno são comparadas com as quantidades calculadas esperadas. Valores de permeado das concentrações realizadas usando antígenos SUB 037, PCV 180/181 e SUB 504PD caíram para a faixa indetectável do ensaio. Os valores para teor de antígeno permeado de PCV 1025 não foram coletados.

**Tabela 5. Alteração em SUB 037 quanto ao teor de antígeno PCV-2 (em µg)**

Número de lote /vol	Teor de antígeno pré-conc.	Teor de antígeno pós-conc.	Fator de concentração	Teor de antígeno calc.	Alteração a partir do teor de antígeno calculado	Ganho / perda a partir do RP calc.
SUB 037 (18,94 kg)--4,7x—100 kDa--PDX	56	137,6	4,7	263,2	-125,6	perda
Concentrado e Reconstituído com Solução salina: QS-1	56	61,6	1	56	5,6	ganho
Concentrado e Reconstituído com Solução salina: QS-2	56	62,7	1	56	6,7	ganho
Concentrado e Reconstituído com Solução salina: QS-3	56	55,8	1	56	-0,2	perda
Permeados 1, 2, e de SUB 037	--	0			Sem perda	

**Tabela 6. Alteração em PCV 1025 quanto ao teor de antígeno PCV-2 (em µg)**

Número de lote /vol	Teor de antígeno pré-conc.	Teor de antígeno pós-conc.	Fator de concentração	Teor de antígeno calc.	Alteração a partir do teor de antígeno calculado	Ganho / perda a partir do RP calc.
1025 (20,46kg)-- 4.5X-- 100kDa-- PDX	70,88	288,64	4,5	318,96	-30,32	perda
Concentrado e Reconstituído com Solução salina-1	N/A(sem amostra)	N/A	1	N/A	N/A	sem amostra

Concentrado e Reconstituído com Solução salina-2	70,88	66,24	1	70,88	-4,64	perda
Concentrado e Reconstituído com Solução salina-3	70,88	76,00	1	70,88	5,12	ganho
Permeado de 1025	--	N/A			N/A	

Tabela 7. Alteração no teor de antígeno PCV-2 (em µg)

Número de lote /vol	Teor de antígeno pré-conc.	Teor de antígeno pós-conc.	Fator de concentração	Teor de antígeno calc.	Alteração a partir do teor de antígeno calculado	Ganho / perda a partir do RP calc.
180/181 (40,3 kg)--3,5X--300 kDa--PDX	43,36	90,8	3,5	151,76	-60,96	perda
180/181 7,2X	43,36	247,04	7,2	312,19	-65,15	perda
Permeado de 180/181	--	0			Sem perda	N/A

Tabela 8. Alteração no teor de antígeno PCV-2 (em µg)

Número de lote /vol	Teor de antígeno pré-conc.	Teor de antígeno pós-conc.	Fator de concentração	Teor de antígeno calc.	Alteração a partir do teor de antígeno calculado	Ganho / perda a partir do RP calc.
SUB504 (40,43 kg) 4,3X—300 kDa--PDX	22,24	68,16	4,3	95,63	-27,47	perda
SUB504 20X	22,24	448,48	20	444,8	3,68	ganho
Permeado de SUB504	--	0			Sem perda	

[000151] Géis de SDS-PAGE foram passados com material de PCV 180/181 e SUB 504PD em R&D. A banda de ORF2 que reside a aproximadamente 27 kDa na Figura 1 foi consistente com o padrão de formação de banda da referência na fileira 10. Esse tamanho de banda

foi anteriormente determinado como sendo a ORF2. O material permeado da concentração de SUB 504PD por filtração a 300 kDa exibia uma ausência da formação de banda no local de 27 kDa. Nenhuma proteína ORF2 foi aparentemente perdida com esse tamanho de poro de filtro. O gel foi passado sob condições de redução.

[000152] A atividade virucida do antígeno pré-concentrado, antígeno concentrado, antígeno reconstituído e permeado de filtração foi testada contra a vacina de vírus de PRRS. Resultados iniciais de Controle de Qualidade (Quality Control - QC) para SUB 037 foram insatisfatórios para o material pré-concentrado e concentrado (filtro de 100 kDa), o qual tinha sido reconstituído de volta para 1X com solução salina. Contudo, quando o material concentrado foi formulado em vacinas, concentrações com inclusão de até 80% na vacina reduziram essa atividade virucida para um nível satisfatório abaixo do limite de aceitação de 0,7 log/ml de perda para a titulação de vírus de PRRS. Material permeado de SUB 037 se mostrou limítrofe, passando para níveis insatisfatórios de atividade virucida. Vide Tabela 9.

[000153] Descobriu-se que material PCV 1025 pré-concentrado era insatisfatório quanto à atividade virucida ao PRRS, com perda na titulação de PRRS a 1,5 log/ml de perda. Os três materiais concentrados reconstituídos em solução salina (filtro de 100 kDa) foram passados a 0,5 log/ml de perda e 0,6 log/ml de perda, com um dos concentrados reconstituídos satisfatório, "sem alteração" na titulação de PRRS. Amostras de permeado não foram testadas para esse lote. Vide Tabela 10.

[000154] Material PCV 180/181 pré-concentrado para vacina foi insatisfatório quanto à atividade virucida ao PRRS para 2 das 3 vacinas preparadas. Os níveis de inclusão percentual de antígeno oscilavam de 37,0% a 55,5%. Descobriu-se que a maior inclusão % de

vacina pré-concentrada era satisfatória.

[000155] Descobriu-se que vacinas preparadas a partir de material 1X (concentrado reconstituído para 1X com solução salina) eram satisfatórias quanto à atividade virucida ao vírus de PRRS. Os níveis percentuais de inclusão de antígeno oscilavam de 44% a 66%. Vide Tabela 11.

[000156] Vacinas de SUB 504PD preparadas a partir do antígeno pré-concentrado com inclusão em vacina de 79,5% foram satisfatórias quanto à atividade virucida ao vírus de PRRS. Vacinas preparadas a partir de antígeno 4,3X concentrado com inclusão em vacina de 23,5-35% e de antígeno 21,5X concentrado com inclusão em vacina de 3,5-5,5% também foram satisfatórios. Por fim, descobriu-se que o antígeno lavado em filtro preparado com um nível de inclusão de 72% era satisfatório quanto à atividade virucida ao vírus de PRRS.

Tabela 9. Atividade virucida de SUB 037

ID da Amostra	Alteração na potência log/ml	Sat/Insat
SUB 037 Pré-conc. (18,94 kg)-- 4,7x-- 100 kDa--PDX Teor de antígeno 56 pré / 137,6 pós	1,4	insat
Concentrado e Reconstituído com Solução salina-1	0,8	insat
Concentrado e Reconstituído com Solução salina-2	1,3	insat
Concentrado e Reconstituído com Solução salina-3	1,3	insat
permeado-1 de SUB 037	0,6	sat
permeado-2 de SUB 037	1,0	insat
permeado-3 de SUB 037	0,5	sat
Vacina: inclusão de 20% de Ames**	-0,2	sat
Vacina: inclusão de 40% de Ames**	-0,2	sat
Vacina: inclusão de 60% de Ames**	0,2	sat
Vacina: inclusão de 80% de Ames**	0,1	sat

Tabela 10. Atividade virucida de PCV 1025

ID da Amostra	Alteração na potência log/ml	Sat/Insat
PCV1025 Pré-conc. (20,46 kg)--4,5x--100 kDa--PDX Teor de antígeno 70,8 pré / 288,64 pós	1,5	insat
Concentrado e Reconstituído com Solução salina-1	0,6	sat
Concentrado e Reconstituído com Solução salina-2	Sem alteração	sat
Concentrado e Reconstituído com Solução salina-3	0,5	sat
Permeado de 1025	Não enviado	n/a

Tabela 11. Atividade virucida de PCV 180/181

ID da Amostra	% de inclusão na Vacina	Alteração na potência log/ml	Sat/Insat
PCV180/181 (49,3kg)--3,5X--300 kDa--PDX Teor de antígeno = 43,36 µg pré/teor de antígeno (1) 90,88 µg/ teor de antígeno (2) 247,04 µg	n/a	n/a	n/a
Vacina pré-concentrado Teor de antígeno = 16 µg/8,8 µg real	37,0	1,2 log/ml de perda	insat
Vacina pré-concentrado Teor de antígeno = 19,2 µg/8,8 µg real	44,5	1,2 log/ml de perda	insat
Vacina pré-concentrado Teor de antígeno = 24 µg/15,36 µg real	55,5	0,8 log/ml ganho	sat
7X reconstituído to 1x vacina teor de antígeno = 16 µg/8,48 µg real	44,0	0,6 log/ml ganho	sat
7X reconstituído to 1x vacina teor de antígeno = 19,24 µg/12,32 µg real	53,0	sem alteração	sat

7X reconstituído to 1x vacina teor de antígeno = 24 µg/14,08 µg real	66,0	0,3 log/ml ganho	sat
--	------	---------------------	-----

Tabela 12. Atividade virucida de SUB 504PD

ID da Amostra	% de inclusão na vacina	Alteração na potência log/ml	Sat/Insat
SUB504PD (~40kg) 4,3X--300 kDa--PDX  Teor de antígeno = 22,24 µg pré/Teor de antígeno (1) = 68,16 µg Teor de antígeno (2) = 448,48 µg	n/a	n/a	n/a
Vacina pré-concentrado teor de antígeno = 16 µg/10,24 µg Real	79,5	0,3 log/ml de perda	sat
vacina 4,3X Teor de antígeno = 16 µg/18,56 µg Real	23,5	0,1 log/ml ganho	sat
vacina 4,3X Teor de antígeno = 19,2 µg/3,04 µg Real	28,0	0,7 log/ml ganho	sat
vacina 4,3X Teor de antígeno = 24 µg/5,28 µg Real	35,0	0,1 log/ml ganho	sat
vacina 21,5X Teor de antígeno = 16 µg/10,08 µg Real	3,5	0,1 log/ml de perda	sat
vacina 21,5X Teor de antígeno = 19,2 µg/15,2 µg Real	4,5	0,1 log/ml ganho	sat
vacina 21,5X Teor de antígeno = 24 µg/3,36 µg Real	5,5	0,3 log/ml ganho	sat
Lavagem de filtro Teor de antígeno = 16 µg/12,96 µg Real	72,0	0,7 ganho	sat

Tabela 13. Dados de Processo

SUB 506: FILTRO DE 100.000 NMWC			
TEMPO	TMP (psi)	PERM FLUXO (ml/min)	FLUXO (l/mh)
13:25	12	800	11,43
13:59	11,5	3300	47,14
15:09	12,5	3800	54,29
15:29	12	2100	30,00

Tabela 14. Dados de Processo

SUB 513: FILTRO DE 100.000 NMWC			
TEMPO	TMP (psi)	PERM FLUXO (ml/min)	FLUXO (l/mh)
6:49	11,5	2600	37,14
8:06	11,5	2700	38,57

Tabela 15. Dados de Processo

SUB 512: FILTRO DE 300.000 NMWC			
TEMPO	TMP (psi)	PERM FLUXO (ml/min)	FLUXO (l/mh)
15:25	16	5000	142,86
18:00	13	800	22,86
20:03	17,5	3500	100,00
21:05	17,5	3000	85,71
21:47	18	2500	71,43
21:59	12,5	4000	114,29

Discussão

[000157] Vetor de baculovírus morto para vacina contra o circovírus suíno do tipo 2 é um produto global fabricado pela Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., em St. Joseph, Missouri e usado no produto INGELVAC CIRCOFLEX®. Na coleta, fluidos virais são assepticamente filtrados através de um ou mais pré-filtros de 2-15 µm e, então, um filtro de 0,8-1,0 µm para filtração final. Solução de estoque de BEI (etilenimina binária) é adicionada aos fluidos coletados em uma concentração final de BEI de 5 mM. Os fluidos são continuamente agitados durante um mínimo de 72 horas e um máximo

de 96 horas e podem ser armazenados congelados a  $\leq 40^{\circ}\text{C}$  ou a  $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Uma solução de tiossulfato de sódio a 1,0 M é adicionada em uma concentração final de 5 mM para neutralizar qualquer BEI residual.

[000158] O antígeno neutralizado é misturado com solução de Carbopol a 0,5% para um teor de proteína ORF2 de PCV-2 de 20% v/v no produto final ajustado mediante a adição de solução salina para ir de encontro aos requisitos mínimos de liberação de uma potência relativa maior do que ou igual a 1,0. Após espessamento, a diluição serial pode ser armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$  ou enchida.

[000159] Material ORF2 de PCV-2 foi concentrado pós-neutralização através de ultrafiltração em um cartucho de fibra oca. O material concentrado foi ainda processado com dois volumes para diafiltração de solução salina. Os tamanhos de corte de peso molecular nominal (NMWC) para ultrafiltração preferidos foram determinados para incluir 100.000 NMWC e 300.000 NMWC, cada um com um diâmetro de lúmen do túbulo de 1,0 mm. Ambos os tamanhos de poro foram incluídos para conferir flexibilidade na fabricação no caso de o fornecimento de cartuchos de filtro ser interrompido pelo fabricante. Géis para eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio - poliacrilamida (SDS PAGE) e dados de potência não indicaram diferença na proteína antigênica ou na potência entre os dois tamanhos de poro de filtro.

## EXEMPLO 2

[000160] Esse exemplo compara os rendimentos relativos de ORF2 usando métodos da presente invenção com métodos que são conhecidos na técnica anterior. Deve ser entendido que esse exemplo representa um dos possíveis métodos para obtenção de PCV-2 ORF2 para uso com os presentes métodos e composições.

## Materiais e Métodos

[000161] Quatro frascos para centrífuga de 1000 mL foram, cada um, cultivados com aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células Sf+/mL em 300 mL de meio para inseto isento de soro, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). A cultura de células mestre é identificada como Estoque de Células Mestre SF+ (*Spodoptera frugiperda*), passagem 19, Lote # N112-095W. As células usadas para gerar o Estoque de Células Mestre SF+ foram obtidas da Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. A linhagem de células SF+ para esse exemplo foi confinada entre as passagens 19 e 59. Outras passagens funcionarão para fins da presente invenção mas, de forma a escalar o processo para produção em larga escala, pelo menos 19 passagens provavelmente serão necessárias e passagens além de 59 podem ter um efeito sobre a expressão, embora isso não tenha sido investigado. Em maiores detalhes, as culturas de células SF+ iniciais do armazenamento em nitrogênio líquido foram crescidas em meio Excell 420 em suspensão em frascos para centrífuga estéreis com agitação constante. As culturas foram crescidas em frascos para centrífuga de 100 mL a 250 mL com 25 a 150 mL de meio isento de soro Excell 420. Quando as células tinham se multiplicado para uma densidade celular de  $1,0 - 8,0 \times 10^6$  células/mL, elas foram divididas para novos recipientes com uma densidade de colocação em lâmina de  $0,5 - 1,5 \times 10^6$  células/mL. Subsequentes culturas de expansão foram crescidas em frascos para centrífuga até 36 litros de tamanho ou em biorreatores de aço inoxidável de até 300 litros durante um período de 2-7 dias a 25 - 29°C.

[000162] Após cultura, os frascos foram incubadas a 27°C durante quatro horas. Subsequentemente, cada frasco foi cultivado com um baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV-2 (SEQ ID NO: 4). O baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV-2 foi gerado como segue: o gene de ORF2 de PCV-2 de uma

cepa Norte Americana de PCV-2 foi amplificado por PCR para conter uma sequência de Kozak 5' (SEQ ID NO: 1) e um sítio EcoRI 3' (SEQ ID NO: 2), clonado no vetor pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Então, ele 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 pVL1392 contendo o gene de ORF2 de PCV-2 foi designado N47-064Y e, então, co-transfetado com DNA de baculovírus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) em Células de Inseto SF+ (Protein Sciences, Meriden, CT) para gerar o baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV-2. O novo construto é proporcionado aqui como SEQ ID NO: 8. O baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV-2 foi purificado em placa e Vírus Cultivado Mestre (Master Seed Virus - MSV) foi propagado sobre a linhagem de células SF+, transformado em alíquotas e armazenado a -70°C. O MSV foi positivamente identificado como baculovírus de ORF2 de PCV-2 por meio de PCR-RFLP usando primers específicos para baculovírus. Células de inseto infectadas com baculovírus de ORF2 de PCV-2 para gerar MSV ou Vírus Cultivado de Trabalho expressam o antígeno ORF2 de PCV-2, conforme detectado por anticorpos monoclonais ou policlonais no soro em um ensaio de anticorpo por fluorescência indireta. Adicionalmente, a identidade do baculovírus de ORF2 de PCV-2 foi confirmada por sequenciamento de aminoácidos N-terminal. O MSV de baculovírus de ORF2 de PCV-2 foi também testado com relação à pureza de acordo com 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28 e 113.55. Cada baculovírus recombinante cultivado nos frascos para centrífuga tinha multiplicidades de infecção (MÓIS) variadas. O frasco 1 foi cultivado com 7,52 mL em uma MOI de cultura de 0,088; o frasco 2 foi cultivado com 3,01 mL em uma MOI de cultura de 0,36; o frasco 3 foi cultivado com 1,5 mL em uma MOI de cultura de

0,18; e o frasco 4 foi cultivado com 0,75 mL em uma MOI de cultura de 0,09.

[000163] Após serem cultivados com o baculovírus, os frascos foram, então, incubados a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias e foram também agitados a 100 rpm durante esse tempo. Os frascos usavam tampas ventiladas para permitir fluxo de ar. Amostras de cada frasco foram tomadas a cada 24 horas durante os próximos 7 dias. Após extração, cada amostra foi centrifugada e a pelota e sobrenadante foram separados e, então, microfiltrados através de uma membrana com tamanho de poro de 0,45-1,0  $\mu\text{m}$ .

### Resultados e Conclusões

[000164] As amostras resultantes, então, tinham uma quantidade de ORF2 presente dentro das mesmas, quantificada via um ensaio ELISA. O ensaio ELISA foi conduzido com anticorpo de captura anti-IgG de PCV-2 Pab Suíno purificado em proteína G (diluído a 1:250 em PBS) diluído para 1:6000 em tampão de carbonato a 0,05 M (pH de 9,6). 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo foram, então, colocados nas cavidades da lâmina de microtitulação, vedados e incubados durante a noite a  $37^{\circ}\text{C}$ . A lâmina foi, então, lavada três vezes com uma solução de lavagem a qual compreendia 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  $\mu\text{L}$  de uma solução de bloqueio (5 g de leite em pó não desnatado Carnation (Nestle, Glendale, CA) em 10 mL de D-PBS QS até 100 mL com água destilada) foram adicionados a cada uma das cavidades. A próxima etapa foi lavar a lâmina de ensaio e, então, adicionar antígeno pré-diluído. O antígeno pré-diluído foi produzido mediante a adição de 200  $\mu\text{L}$  de solução diluente (0,5 mL de Tween 20 em 999,5 mL de D-PBS) a cada uma das cavidades sobre uma lâmina de diluição. A amostra foi, então, diluída em uma proporção de 1:240 e uma proporção de

1:480 e 100  $\mu$ L de cada uma dessas amostras diluídas foram, então, adicionados a uma das cavidades superiores sobre a lâmina de diluição (isto é, uma cavidade superior recebeu 100  $\mu$ L da diluição a 1:240 e a outra recebeu 100  $\mu$ L da diluição a 1:480). Diluições seriais foram, então, feitas para o restante da lâmina por meio de remoção de 100  $\mu$ L de cada cavidade sucessiva e transferindo para a próxima cavidade na lâmina. Cada cavidade foi misturada antes de fazer a próxima transferência. A lavagem da lâmina de ensaio incluía lavagem da lâmina três vezes com o tampão de lavagem. A lâmina foi, então, vedada e incubada durante uma hora a 37°C antes de ser lavada mais três vezes com o tampão de lavagem. O anticorpo de detecção usado foi anticorpo monoclonal à ORF2 de PCV-2. Ele foi diluído para 1:300 em solução diluente e 100  $\mu$ L do anticorpo de detecção diluído foram, então, adicionados às cavidades. A lâmina foi, então, vedada e incubada durante uma hora a 37°C antes de serem lavadas três vezes com o tampão de lavagem. Diluente conjugado foi, então, preparado mediante a adição de soro de coelho normal (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) à solução diluente para uma concentração de 1%. Anticorpo conjugado de cabra anti-camundongo (H+I)-HRP (Jackson Immunoresearch) foi diluído no diluente conjugado para 1:10.000, 100  $\mu$ L do anticorpo conjugado diluído foram, então, adicionados a cada uma das cavidades. A lâmina foi, então, vedada e incubada durante 45 minutos a 37°C antes de ser lavada três vezes com o tampão de lavagem. 100  $\mu$ L de substrato (Substrato de Peroxidase TMB, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), misturado com um volume igual de Substrato Peroxidase B (KPL), foram adicionados a cada uma das cavidades. A lâmina foi incubada em temperatura ambiente durante 15 minutos. 100  $\mu$ L de solução de HCl a 1N foram, então, adicionados a todas as cavidades para cessar a reação. A lâmina foi, então, passada

através de um leitor para ELISA.

[000165] Os resultados desse ensaio são proporcionados na Tabela 17 abaixo:

Tabela 17

Dia	Frasco	ORF2 na pelota (µg)	ORF2 no sobrenadante (µg)
3	1	47,53	12
3	2	57,46	22
3	3	53,44	14
3	4	58,64	12
4	1	43,01	44
4	2	65,61	62
4	3	70,56	32
4	4	64,97	24
5	1	31,74	100
5	2	34,93	142
5	3	47,84	90
5	4	55,14	86
6	1	14,7	158
6	2	18,13	182
6	3	34,78	140
6	4	36,88	146
7	1	6,54	176
7	2	12,09	190
7	3	15,84	158
7	4	15,19	152

[000166] Esses resultados indicam que, quando o tempo de incubação é prolongado, expressão de ORF2 no sobrenadante de células centrifugadas e meio é maior do que a expressão na pelota das células centrifugadas e meio. Consequentemente, permitir que a expressão de ORF2 ocorra durante at ocorra durante pelo menos 5 dias e recuperação da mesma do sobrenadante ao invés de permitir que expressão ocorra durante menos de 5 dias e recuperação da

ORF2 das células, confere um grande aumento nos rendimentos da ORF2 e um aprimoramento significativo com relação aos métodos anteriores.

### EXEMPLO 3

[000167] Purificação de ORF2 foi obtida por meio de um processo de microfiltração, seguido por um esquema de cromatografia em duas etapas. A coleta obtida no Exemplo 1 foi filtrada através de uma membrana com microfiltro tendo um tamanho de poro de 1,2 µm. O microfiltrado foi, então, purificado através de exclusão de tamanho (filtração em gel) usando uma coluna HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR. Uma amostra inicial de 20 ml do filtrado compreendendo a ORF2 de PCV-2 foi carregada sobre a coluna HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR em uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min e foi eluída com 1,5 volumes de coluna de tampão A (Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM). Frações de oito mililitros foram coletadas durante a etapa de eluição. As frações Nos. 10 - 16 (mili-titulações de 10 a 16 do eluato) da cromatografia de exclusão de tamanho foram agrupadas e utilizadas como a amostra inicial para uma cromatografia de troca de íons (AIEX). Essas frações representam o volume de vazios da coluna de dimensionamento, o qual é onde a ORF2 de PCV-2 elui em virtude do grande peso molecular da proteína ORF2 de PCV-2. Essa técnica separa eficazmente a ORF2 da maioria dos outros componentes de proteína de uma amostra antigênica.

[000168] AIEX foi realizada usando uma coluna HiTrap Q Sepharose HP de 5 ml. Aproximadamente 48 ml da reserva de fração do volume de vazios, a partir de um experimento de exclusão de tamanho, foram carregados sobre a coluna de AIEX HiTrap Q Sepharose HP em uma taxa de fluxo de 3,0 ml/min. Após uma etapa de lavagem com tampão de carregamento A (Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM) para remover o material não ligado, proteína foi eluída com uma única

etapa de 8 volumes de coluna de tampão B (Tris a 20 mM, pH de 6,5, DTT a 5 mM, NaCl a 1,0 M) e frações de 5 ml foram coletadas. Frações de pico No. 8 e 9 foram coletadas e agrupadas. O fluxo passante da passagem em AIEX foi carregado de volta sobre a coluna Q Sepharose e eluído conforme descrito acima. Da etapa de segunda passagem, as frações Nos. 7, 8 e 9 foram agrupadas com as frações da primeira passagem. Uma terceira passagem do material do fluxo passante não resultou em uma fração de pico significativa no eluato, de modo que nenhuma fração foi recuperada dessa passagem.

[000169] A reserva de fração de aproximadamente 25 ml foi submetida à diálise durante a noite a 4°C contra 2 litros de solução salina tamponada com fosfato, pH de 7,4 (Gibco). Após diálise, ORF2 era >95% pura, baseado em análise de SDS-PAGE.

#### EXEMPLO 4

[000170] Soluções de bromidrato de 2-bromoetilamina (BEA), hidróxido de sódio (NaOH) e tiossulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) foram preparadas. Solução de BEA foi feita pesando 1,63 g de BEA (Sigma, B65705, lote 05316EE) e dissolvendo em 20 ml de água purificada ( $\text{dH}_2\text{O}$ , aqua dest., aqui: 'água'). A concentração final dessa solução foi BEA a 0,4 M. A solução de NaOH foi feita pesando 0,33 g de NaOH (JT Baker, 3722-01, lote E01470) e dissolvendo em 20 ml de água. A concentração final dessa solução foi NaOH a 0,41 M.

[000171] Solução de tiossulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) foi preparada pesando 25 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Sigma S7026, lote 106K0178) e dissolvendo em 100 ml de água. Uma vez dissolvida, a solução foi filtrada através de um filtro para parte superior de garrafa de 0,2  $\mu\text{m}$  para esterilizar. A concentração final dessa solução foi  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  a 1,0 M.

[000172] Para preparar a etilenimina binária (BEI), 20 ml de solução de BEI a 0,4 M foram misturados com 20 ml de NaOH a 0,41 M e o pH

inicial foi determinado como sendo ~12,5 – 14,0. A mistura foi incubada a 37°C durante uma hora e o pH foi verificado novamente. O pH, após incubação, era ~7,0 – 7,5 e isso indicou uma reação de ciclização com sucesso de BEA em BEI. A concentração final de BEI foi calculada para ser ~0,2 M (20 ml de BEA a 0,4 M ciclizado com um excesso de base (0,41 M) em um volume de 40 ml.

[000173] As reações de inativação foram como segue (por 100 ml de material a ser inativado): os materiais a serem inativados foram misturados com 2,5 ml de BEI recentemente preparado. As reações de inativação foram incubadas durante 72 horas a 37°C com antígeno para misturar continuamente as soluções. Após 72 horas, as reações foram neutralizadas mediante a adição de 0,5 ml de tiossulfato de sódio a 1,0 M. Após permitir que o tiossulfato misturasse completamente nas soluções (~15 min de mistura), os materiais inativados e neutralizados foram armazenados a 4°C antes de mistura com adjuvante.

#### EXEMPLO 5

##### Preparo de Amostras de Teste:

[000174] De forma a estimar a imunogenicidade de antígeno ORF2 altamente purificado (grau de pureza de mais de 90%) quando comparado com antígeno ORF2 não- ou menos purificado, lotes de 5 ml de várias amostras de teste foram preparados:

Tabela 18: Amostras de Teste

Amostra de teste No.	Descrição
#1	Antígeno ORF2 altamente purificado, inativado com BEI e misturado com 1 mg/ml de Carbopol
#2	Antígeno ORF2 altamente purificado misturado com resíduos de células de inseto inativado com BEI e misturado com 1 mg/ml de Carbopol
#3	Resíduos de células de inseto (controle "mock")
#4	Antígeno ORF2 de PCV-2, não filtrado, não purificado misturado com 1 mg/ml de Carbopol

#5	Antígeno ORF2 de PCV-2, não filtrado, não purificado, inativado com BEI e misturado com 1 mg/ml de Carbopol
#6	Antígeno ORF2 de PCV-2, não purificado, inativado com BEI e misturado com 1 mg/ml de Carbopol

[000175] A Amostra de teste #1 foi produzida como segue: antígeno ORF2 de PCV-2 foi produzido conforme descrito no Exemplo 1 e altamente purificado conforme descrito no Exemplo 3. O antígeno ORF2 de PCV-2 altamente purificado foi inativado com BEI conforme descrito no Exemplo 4. Após inativação com BEI, o teor de antígeno ORF2 de PCV-2 foi ajustado para uma quantidade de cerca de 32 a 32,5 µg por ml de amostra de teste e misturado com 1 mg de Carbopol 971P (BF Goodrich, Ohio, EUA) por ml de amostra de teste.

[000176] A amostra de teste #2 foi produzida como segue: antígeno ORF2 de PCV-2 foi produzido conforme descrito no Exemplo 1 e altamente purificado conforme descrito no Exemplo 3. O antígeno ORF2 de PCV-2 altamente purificado foi inativado com BEI conforme descrito no Exemplo 4. Após BEI inativação, antígeno ORF2 de PCV-2 foi misturado com resíduos de células de inseto e Carbopol. A amostra de teste final incluía cerca de  $2,06 \times 10^6$  células de inseto, cerca de 32 a 32,5 µg e 1 mg de Carbopol 971P por ml de amostra de teste.

[000177] A amostra de teste #3 foi preparada mediante mistura de cerca de  $2,06 \times 10^6$  células de inseto com 1 mg de Carbopol 971P por ml de amostra de teste. Antes de mistura, as células de inseto foram inativadas com BEI conforme descrito no Exemplo 3.

[000178] A amostra de teste #4 foi produzida como segue: o antígeno ORF2 de PCV-2 foi produzido conforme descrito no Exemplo 1. O teor de antígeno ORF2 de PCV-2 no sobrenadante foi ajustado para uma quantidade de cerca de 32 a 32,5 µg por ml de amostra de teste e misturado com 1 mg de Carbopol 971P por ml de amostra de teste.

[000179] A amostra de teste #5 foi produzida como segue: o antígeno ORF2 de PCV-2 foi produzido conforme descrito no Exemplo

1. O sobrenadante foi, então, usado para inativação com BEI conforme descrito no Exemplo 3. Após inativação com BEI, antígeno ORF2 de PCV-2 foi misturado com resíduos de células de inseto e Carbopol. A amostra de teste final incluía cerca de  $2,06 \times 10^6$  células de inseto, cerca de 32 a 32,5 µg e 1 mg de Carbopol 971P por ml de amostra de teste.

[000180] A amostra de teste #6 foi produzida como segue: antígeno ORF2 de PCV-2 foi produzido conforme descrito no Exemplo 1. O sobrenadante do Exemplo 1 foi, então, filtrado através dum filtro de 1,2 µm para escala de laboratório. Esse tamanho de filtro foi determinado previamente como sendo suficiente para filtrar células de inseto intactas e decompostas, ao mesmo tempo em que permitia que o antígeno ORF2 de PCV-2 passasse através do filtro. Após o que, o filtrado foi inativado com BEI conforme descrito no Exemplo 3. Após inativação com BEI, o teor de antígeno ORF2 de PCV-2 foi ajustado para uma quantidade de cerca de 32 a 32,5 µg por ml de amostra de teste e misturado com 1 mg de Carbopol 971P.

#### Testagem de imunogenicidade de cada amostra de teste

##### Fase Clínica:

[000181] Cento e cinquenta camundongos fêmeas Balb/C foram adquiridos da Jackson Laboratories (Estados Unidos) e deixados se acostumar durante sete dias. Um camundongo de cada gaiola foi aleatoriamente selecionado para coleta de sangue no Dia 0 para um total de vinte e seis amostras. Um total de dez camundongos foi, cada um, inoculado por meio da via subcutânea com 0,1 – 0,2 mL de Tampão de Fosfato de Dulbecco.

[000182] Um total de vinte camundongos foi, cada um, inoculado através da via subcutânea com 0,1 – 0,2 mL de cada amostra de teste (amostras de teste #1 a #6). Cada gaiola continha cinco camundongos e todos os camundongos em cada gaiola estavam no mesmo grupo de

tratamento. No dia vinte e um, todos os camundongos foram sacrificados e o sangue coletado. Cada amostra de sangue foi deixada coagular e o soro foi coletado por meio de centrifugação. Todas as amostras foram mantidas em tubos distintos e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  até testagem. Os camundongos foram descartados por meio de incineração.

Testagem de Amostra:

[000183] A imunogenicidade de cada amostra de teste foi estimada medindo-se a resposta de anticorpo PCV-2 específica de cada amostra de teste usando um ELISA específico para PCV-2 *in-house*. O valor de imunogenicidade de cada amostra de teste é fornecido como valor de Imunogenicidade Relativa (Relative Immunogenicity - RI) na Tabela 2. Esse valor de imunogenicidade relativa é uma medida para a titulação de anticorpo específico para ORF2 obtida em um animal imunizado por quantidade padronizada de antígeno ORF2 usado para imunização.

[000184] Ao invés de usar o ELISA *in-house*, a quantidade de anticorpos específicos para PCV-2 pode também ser medida usando o ensaio ELISA descrito por Nawagitgul, P. *et al.* em *Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV* Clin. Diagn. Lab. Immunol. **9**: 33-40 (2002), os ensinamentos e conteúdo do qual é aqui incorporado por referência. O valor medido em tal ensaio pode também ser usado para calcular o valor de Imunogenicidade Relativa (vide abaixo).

[000185] Uma alíquota de soro de cada camundongo foi agrupada com os filhotes na gaiola para um total de vinte e seis amostras para o dia 21. Uma alíquota de todas as amostras de soro do dia 0 foi agrupada em uma amostra. A referência foi diluída duas vezes, começando a 1:2 e adicionada em triplicata a cada cavidade

correspondente. Os controles positivo e negativo foram adicionados em triplicata. Cada amostra foi serialmente diluída duas vezes e adicionada à lâmina, começando a 1:200 em triplicata. A absorbância final a 450 nm foi lida usando um Reader Plate SoftMax™ mensalmente calibrado e todos os valores brutos de OD foram capturados eletronicamente e analisados com o Statlia (Brendan Scientific) para calcular os valores de Imunogenicidade Relativa (RI).

### Resultados:

[000186] O valor de RI calculado para a quantidade de anticorpos produzidos após imunização mostrou que a formulação de ORF2 de PCV-2 purificada estimulava a resposta sorológica (anticorpo) mais alta ao antígeno ORF2 de PCV-2 altamente purificado. A formulação de ORF2 de PCV-2 purificada junto com resíduos de células de inseto resultou em uma diminuição na Imunogenicidade Relativa (isto é, imunogenicidade) da ORF2 comparado com a ORF2 de PCV-2 altamente purificada isoladamente. Células de inseto apenas não geram uma resposta de anticorpo contra o antígeno ORF2 de PCV-2 também. As amostras de teste 4 a 6, as quais também não contêm antígeno ORF2 de PCV-2 altamente purificado, também mostraram uma Imunogenicidade Relativa diminuída comparado com a ORF2 de PCV-2 altamente purificada isoladamente.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de uma composição antigênica de PCV-2, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

i) obtenção de um primeiro líquido contendo no mesmo antígeno PCV-2 compreendendo partículas semelhantes a vírus da proteína ORF-2; e

ii) remoção de uma ou mais porções do primeiro líquido do antígeno PCV-2 compreendendo partículas semelhantes a vírus da proteína ORF-2

por meio de uma etapa de filtração utilizando um filtro, em que o filtro inclui uma membrana semipermeável tendo um tamanho médio de poro que é menor do que o antígeno PCV-2 para, desse modo, impedir a passagem de 90% ou mais do antígeno PCV-2 através dos poros da membrana semipermeável e manter o antígeno PCV-2 dentro do filtro,

em que a porção do primeiro líquido é separada do antígeno PCV-2 por meio de uma troca da porção do primeiro líquido contra um segundo líquido, em que o segundo líquido é diferente do primeiro líquido, e em que a troca da porção do primeiro líquido com o segundo líquido compreende as etapas de:

a) adição do segundo líquido ao primeiro líquido, o qual contém o antígeno PCV-2; e

b) concentração do antígeno PCV-2 de 3X a 50X em comparação com o volume do primeiro líquido mediante remoção de uma porção dos primeiro e segundo líquidos; e

iii) mistura do antígeno PCV-2 restante após a etapa ii) com um outro componente selecionado do grupo consistindo em veículos, adjuvantes, diluentes, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e combinações dos mesmos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas de modo simultâneo.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a etapa de concentração e a etapa de adição de líquido são realizadas duas vezes ou mais.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o filtro tem um tamanho médio de poro menor que 50 kDa.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende a etapa de coleta do antígeno PCV-2 restante após a etapa ii).

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende a etapa de purificação da coleta da etapa ii) compreendendo o antígeno PCV-2 por meio de um procedimento cromatográfico.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o outro componente é um adjuvante.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o adjuvante é Carbomer.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende a etapa de combinação da composição antigênica de PCV-2 com um ou mais antígenos adicionais.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que um ou mais antígenos adicionais incluem antígeno do Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína e/ou antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

**FIG. 1**

