

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2005.12.29**

(30) Prioridade(s): **2004.12.30 US 640510 P**
2005.01.13 US 34797
2005.12.29 US UNKNOWN

(43) Data de publicação do pedido: **2007.09.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.03.04**
109/2015

(73) Titular(es):

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
2621 NORTH BELT HIGHWAY ST. JOSEPH MO
64506-2002 **US**

(72) Inventor(es):

MARC ALLAN EICHMEYER **US**
MERRILL LYNN SCHAEFFER **US**
GREG NITZEL **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DE PCV2 E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DESSAS COMPOSIÇÕES**

(57) Resumo:

É PROPORCIONADO UM MÉTODO MELHORADO PARA RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA PELA FASE DE LEITURA ABERTA (2) DE CIRCOVÍRUS PORCINO TIPO (2). O MÉTODO ENVOLVE, EM GERAL, AS ETAPAS DE TRANSFEÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTE CONTENDO AS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DA FASE DE LEITURA ABERTA (2) PARA CÉLULAS CONTIDAS EM MEIOS DE CRESCIMENTO, FAZENDO COM QUE O VÍRUS EXPRESSE A FASE DE LEITURA ABERTA (2) E A RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA NO SOBRENADANTE. ESTA RECUPERAÇÃO DEVE REALIZAR-SE COMEÇANDO, APROXIMADAMENTE, (5) DIAS APÓS A INFECÇÃO DAS CÉLULAS, DE MODO A PERMITIR QUE QUANTIDADES SUFICIENTES DE PROTEÍNA RECOMBINANTE SEJAM EXPRESSAS E SEGREGADAS DA CÉLULA PARA OS MEIOS DE CRESCIMENTO. ESSES MÉTODOS EVITAM PROCESSOS DE EXTRACÇÃO DISPENDIOSOS E MOROSOS, NECESSÁRIOS PARA SEPARAR E RECUPERAR A PROTEÍNA RECOMBINANTE A PARTIR DO INTERIOR DAS CÉLULAS.

RESUMO

"COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DE PCV2 E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DESSAS COMPOSIÇÕES"

É proporcionado um método melhorado para recuperação da proteína expressa pela fase de leitura aberta (2) de circovírus porcino tipo (2). O método envolve, em geral, as etapas de transfecção de vírus recombinante contendo as sequências codificantes da fase de leitura aberta (2) para células contidas em meios de crescimento, fazendo com que o vírus expresse a fase de leitura aberta (2) e a recuperação da proteína expressa no sobrenadante. Esta recuperação deve realizar-se começando, aproximadamente, (5) dias após a infecção das células, de modo a permitir que quantidades suficientes de proteína recombinante sejam expressas e segregadas da célula para os meios de crescimento. Esses métodos evitam processos de extração dispendiosos e morosos, necessários para separar e recuperar a proteína recombinante a partir do interior das células.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DE PCV2 E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DESSAS COMPOSIÇÕES"

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Este pedido contém uma listagem de sequências em formato de papel e em formato informático.

Um aspecto da presente divulgação está relacionado com a recuperação de uma proteína expressa pela fase de leitura aberta 2 (ORF2) de circovírus porcino tipo 2 (PCV2). De um modo mais particular, a proteína é uma proteína recombinante expressa por um vírus transfectado, contendo sequências codificantes recombinantes para a fase de leitura aberta 2 de circovírus porcino tipo 2. De um modo ainda mais particular, é permitido ao vírus transfectado infectar células em meios de crescimento e a proteína expressa pela fase de leitura aberta 2 é recuperada no sobrenadante, em vez de ser a partir do interior das células. De um modo ainda mais particular, o método envolve as etapas de amplificação do gene da fase de leitura aberta 2 de circovírus porcino tipo 2, clonagem desta porção amplificada num primeiro vector, excisão da porção da fase de leitura aberta 2 deste primeiro vector e a sua clonagem num vector de transferência, co-transfecção do vector de transferência com um vector viral em células em meios de crescimento, fazendo com que as células fiquem infectadas pelo vector viral e, desse modo, expressem a fase de leitura aberta 2 e recuperação da proteína recombinante

expressa codificada pela fase de leitura aberta 2 no sobrenadante.

Noutro aspecto, a presente divulgação está relacionada com uma composição imunogénica eficaz para a indução de uma resposta imunitária contra PCV2 e métodos para a produção dessas composições imunogénicas. De um modo mais particular, a presente divulgação está relacionada com uma composição imunológica eficaz para proporcionar uma resposta imunitária que protege um animal recebendo a composição e reduz ou atenua, a gravidade dos sintomas clínicos associados à infecção de PCV2. De um modo ainda mais particular, a presente divulgação está relacionada com uma composição imunológica baseada em proteína que confere protecção eficaz contra infecção por PCV2. De um modo ainda mais particular, a presente divulgação está relacionada com uma composição imunológica compreendendo a ORF2 de PCV2, em que a administração de ORF2 de PCV2 resulta em protecção contra infecção por PCV2. De um modo muito particular, a presente divulgação está relacionada com uma composição imunológica eficaz para conferir imunidade eficaz a um suíno recebendo a composição imunológica e em que a composição compreende a proteína expressa pela ORF2 de PCV2.

Descrição da Técnica Anterior

O circovírus porcino tipo 2 (PCV2) é um pequeno vírus de ADN (17 - 22 nm em diâmetro), icosaédrico, sem envelope, o qual contém um genoma circular de cadeia simples. Kim *et al.*, (J. Vet. Sci, 2002, 3(1): 19-23) caracteriza as proteínas recombinantes de PCV2 isolado de campo expressas numa sistema de baculovírus. Nawagitgul *et al.*, (J. Gen. Virol, 2000, 81:

2281-2287) referem que uma proteína estrutural principal de PCV2 é codificada pela ORF2. O PCV2 partilha, aproximadamente, 80% de identidade de sequência com o circovírus porcino tipo 1 (PCV1). Contudo, em contraste com o PCV1, o qual é, em geral, não virulento, os suínos infectados com PCV2 exibem uma síndrome, geralmente referida como Síndrome de Deperdição Multissistémica Pós-desmame (PMWS). A PMWS é clinicamente caracterizada por deperdição, palidez da pele, mau estado geral, perturbação respiratória, diarreia, íctero e icterícia. Em alguns suínos afectados, será evidente uma combinação de todos os sintomas, enquanto outros suínos terão apenas um ou dois destes sintomas. Durante a necropsia, também surgem lesões microscópicas e macroscópicas em múltiplos tecidos e órgãos, com os órgãos linfóides sendo o local mais comum para lesões. Foi observada uma forte correlação entre a quantidade de ácido nucleico ou antígeno de PCV2 e a gravidade das lesões linfóides microscópicas. As taxas de mortalidade para suínos infectados com PCV2 podem aproximar-se de 80%. Além de PMWS, o PCV2 foi associado a várias outras infecções, incluindo pseudo-raiva, síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRS), doença de Glasser, meningite estreptocócica, salmonelose, colibacilose pós-desmame, hepatose dietética e broncopneumonia supurativa.

A proteína da fase de leitura aberta 2 (ORF2) de PCV2, tendo um peso molecular aproximado de 30 kDa quando corrida em gel de SDS-PAGE, foi utilizada, no passado, como um componente antigénico em vacinas para PCV2. Blanchard *et al.*, (Vaccine 21, 2003, 4565-4575) descrevem protocolos de vacinação com revacinação de 2 injeções e baseados em ADN, utilizando um cultivo de 72 h na produção de um lisado de proteína em bruto. Os métodos típicos de obtenção de ORF2 para utilização nessas vacinas consistem, em geral, na amplificação de ADN de PCV2

codificando para ORF2, transfecção de um vector viral com o ADN de ORF2, infecção de células com o vector viral contendo o ADN de ORF2, permitindo que o vírus expresse proteína de ORF2 dentro da célula e a extracção da proteína de ORF2 da célula por meio de lise celular. Estes processos demoram, em geral, até cerca de quatro dias após infecção das células pelo vector viral. Contudo, estes processos têm uma desvantagem, na medida em que os processos de extracção são simultaneamente dispendiosos e morosos. Além disso, a quantidade de ORF2 recuperada das células não é muito elevada; consequentemente, um grande número de células necessita de ser infectado por um grande número de vectores virais, de modo a obterem-se quantidades suficientes da proteína recombinante expressa para utilização em vacinas e semelhantes.

As abordagens actuais à imunização de PCV2 incluem vacinas baseadas em ADN, tal como as descritas na patente U.S. Nº 6703023. Contudo, essas vacinas foram ineficazes a conferirem imunidade protectora contra infecção de PCV2 e aos sinais clínicos que lhe estão associados.

Consequentemente, o que é necessário na técnica é um método de obtenção de proteína de ORF2, o qual não requeira extracção da proteína de ORF2 a partir do interior de células infectadas. O que é ainda necessário são métodos de obtenção de proteína de ORF2 recombinante em quantidades suficientes para preparação eficiente de composições vacinais. O que é ainda mais necessário são métodos para a obtenção de proteína de ORF2, os quais não requeiram os métodos complicados e intensivos em mão-de-obra requeridos pelos actuais protocolos de extracção de proteína de ORF2. Finalmente, em relação a composições, o que é necessário na técnica, é uma composição imunogénica que confira imunidade

protectora contra infecção de PCV2 e atenua a gravidade ou previna os sinais clínicos que lhe estão associados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção supera os problemas inerentes na técnica anterior e proporciona um avanço distinto no estado da técnica.

A presente invenção proporciona:

[1]. Um método de recuperação de proteína recombinante expressa por fase de leitura aberta 2 de PCV2 em sobrenadante, em que o referido método inclui as etapas de:

- i) infecção das células em meios de crescimento com um vector de baculovírus contendo a referida fase de leitura aberta 2;
- ii) fazer com que o referido vector de baculovírus expresse a referida proteína de fase de leitura aberta 2; e
- iii) recuperação da referida proteína de fase de leitura aberta 2 expressa no sobrenadante,

em que a referida recuperação ocorre, pelo menos, 5 dias após a infecção das células com o referido vector de baculovírus.

[2]. O método de [1], compreendendo as etapas de:

- A) clonagem da referida fase de leitura aberta 2 recombinante de PCV2 num vector de transferência;
- B) introdução da porção do referido vector de transferência contendo a referida fase de leitura aberta 2 recombinante num baculovírus;
- C) infecção das células em meios com o referido baculovírus;
- D) fazer com que o referido baculovírus expresse a proteína de fase de leitura aberta 2 da referida fase de leitura aberta 2;
- E) separação das células contendo o referido vector de baculovírus do sobrenadante; e
- F) recuperação da referida proteína de fase de leitura aberta 2 expressa no referido sobrenadante, pelo menos, cinco dias após a infecção das células com o referido baculovírus.

[3]. O método de [1] ou [2], em que a proteína de fase de leitura aberta 2 expressa é segregada pelas células para os meios de crescimento circundantes e em que a proteína de fase de leitura aberta 2 é recuperada no sobrenadante, em vez de ser a partir do interior das células.

[4]. O método de qualquer um de [1]-[3], em que o referido método inclui ainda a etapa de amplificar a referida

fase de leitura aberta 2 a partir de uma estirpe de PCV2 antes de clonar a referida fase de leitura aberta no referido vector de transferência.

[5]. O método de qualquer um de [1]-[4], em que a referida fase de leitura aberta 2 recombinante compreende ainda uma sequência seleccionada do grupo consistindo de uma sequência de Kozak em 5', um sítio EcoR1 em 3' e as suas combinações.

[6]. O método de [5], em que a referida sequência de Kozak em 5' compreende a SEQ ID N°: 1.

[7]. O método de [5], em que o referido sítio EcoR1 em 3' compreende a SEQ ID N°: 2.

[8]. O método de qualquer um de [1] a [7], em que a referida fase de leitura aberta de PCV2 compreende a SEQ ID N°: 4.

[9]. O método de qualquer um de [1] a [7], em que a referida proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 compreende a SEQ ID N°: 6.

[10]. O método de qualquer um de [1] a [8], em que os referidos meios compreendem meios celulares de insecto isentos de soro.

[11]. O método de qualquer um de [2] a [10], compreendendo ainda as etapas de:

- i) antes da etapa A, clonagem da referida fase de leitura aberta 2 amplificada num primeiro vector;

ii) excisão da referida fase de leitura aberta 2 do referido primeiro vector; e

iii) utilização da referida fase de leitura aberta 2 excisada na etapa A.

[12]. O método de qualquer um de [1] a [11], em que as referidas células compreendem células SF+.

[13]. O método de qualquer um de [1] a [12], em que a etapa de recuperação compreende a separação do detritos celulares da proteína de fase de leitura aberta 2 expressa em meios por meio de uma etapa de separação, em que a etapa de separação inclui, de um modo preferido, filtração.

[14]. Um método de preparação de uma composição para provocar uma resposta imunitária contra PCV2, o referido método compreendendo as etapas de:

i) introdução de uma construção num baculovírus, a referida construção compreendendo ADN recombinante de fase de leitura aberta 2 de PCV2;

ii) infecção das células com o referido baculovírus, estando as referidas células em meios de crescimento;

iii) fazer com que o referido vírus expresse a proteína recombinante da referida fase de leitura aberta 2 a partir da referida fase de leitura aberta 2;

- iv) recuperação da referida proteína de fase de leitura aberta 2 expressa no sobrenadante, em que a referida proteína de fase de leitura aberta 2 é recuperada, pelo menos, 5 dias após a infecção das referidas células com o referido baculovírus; e
- v) combinação da referida proteína de fase de leitura aberta 2 recuperada no sobrenadante com um adjuvante adequado ou outro veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[15]. O método de [14], em que a proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 expressa é segregada pelas células para os meios de crescimento circundantes e em que a proteína de fase de leitura aberta 2 é recuperada no sobrenadante, em vez de ser a partir do interior das células.

[16]. O método de [14] ou [15], em que o referido método inclui ainda a etapa de obtenção da referida construção a partir de um vector de transferência.

[17]. O método de qualquer um de [14]-[16], em que o referido método inclui ainda a etapa de amplificação da referida fase de leitura aberta 2 a partir de uma estirpe de PCV2 antes da clonagem da referida fase de leitura aberta 2 no referido vector de transferência.

[18]. O método de qualquer um de [14] a [17], em que a referida fase de leitura aberta 2 recombinante compreende ainda uma sequência seleccionada do grupo consistindo de uma sequência de Kozak em 5', um sítio EcoR1 em 3' e as suas combinações.

[19]. O método de [18], a referida sequência de Kozak em 5' compreendendo a SEQ ID N°: 1.

[20]. O método de [18], o referido sítio EcoR1 em 3' compreendendo a SEQ ID N°: 2.

[21]. O método de qualquer um de [14] a [20], a referida fase de leitura aberta 2 de PCV2 compreendendo a SEQ ID N°: 4.

[22]. O método de qualquer um de [14] a [21], a referida proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 compreendendo a SEQ ID N°: 6.

[23]. O método de qualquer um de [14] a [22], os referidos meios compreendendo meios celulares de insecto isentos de soro.

[24]. O método de qualquer um de [17] a [23], compreendendo ainda as etapas de:

- i) clonagem da referida fase de leitura aberta 2 amplificada num primeiro vector;
- ii) excisão da referida fase de leitura aberta 2 do referido primeiro vector; e
- iii) utilização da referida fase de leitura aberta 2 excisada para clonagem no referido vector de transferência.

[25]. O método de qualquer um de [14] a [24], em que as referidas células compreendem células SF+.

[26]. O método de qualquer um de [14] a [25], em que a referida etapa de recuperação compreende ainda a etapa de separação dos referidos meios das referidas células e detritos celulares.

[27]. O método de [26], em que a referida etapa de separação inclui a etapa de filtração das referidas células, detritos celulares e meios de crescimento através de um filtro possuindo poros variando em tamanho desde cerca de 0,45 μM a cerca de 1,0 μM .

[28]. O método de qualquer um de [14] a [27], em que o referido método inclui ainda a etapa de inativação do referido baculovírus por adição de etilenimina binária (BEI) ciclizada e, depois de completada a inativação, é adicionada uma solução de tiosulfato de sódio, antes da combinação com a referida proteína de fase de leitura aberta 2 recuperada com um adjuvante adequado.

[29]. Uma composição de matéria obtenível pelo método de qualquer um de [1]-[28].

[30]. A utilização da composição de [29] para a preparação de um medicamento para a prevenção de uma infecção de PCV2.

[31]. Composição de [29] para utilização como um medicamento.

[32]. Composição de [29] para utilização como uma vacina para a prevenção de infecção de PCV2.

[33]. Composição de [29] para utilização num método de prevenção de uma infecção de PCV2.

[34]. Um método para produção de um kit de diagnóstico para a detecção de uma infecção de PCV2 numa amostra, o qual compreende

- i) produção de uma proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 como exposto em qualquer um de [1]-[28];
- ii) e embalagem da referida proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 num recipiente adequado.

[35]. O método de [34], compreendendo ainda a etapa de inclusão de um manual de instruções com o recipiente que embala a proteína recombinante de fase de leitura aberta 2.

[36]. Kit incluindo, pelo menos, um recipiente compreendendo, pelo menos, uma dose da composição de [29], em que a referida composição é imunogénica e uma dose compreende, pelo menos, 2 µg de proteína de fase de leitura aberta 2 de PCV2.

[37]. Kit compreendendo i) um recipiente contendo, pelo menos, uma dose da composição de [29] e ii) um recipiente contendo uma composição imunogénica compreendendo antígeno de PRRS.

[38]. Kit de [37], em que o antígeno de PRRS é IngelVac PRRS MLV.

São aqui divulgados também:

Especificamente, um aspecto da presente divulgação proporciona métodos melhorados de produção e/ou recuperação de proteína de ORF2 recombinante de PCV2, **i)** permitindo a infecção de células susceptíveis em cultura com um vector viral recombinante contendo sequências codificantes de ADN de ORF2 de PCV2, em que a proteína de ORF2 é expressa pelo vector viral recombinante e **ii)** subsequentemente a recuperação da proteína de ORF2 no sobrenadante. Foi inesperadamente verificado que a ORF2 é libertada em grandes quantidades no sobrenadante, se a infecção e subsequente incubação das células infectadas for deixada progredir para além do típico processo de recuperação de ORF2 de PCV2 anterior, o qual extrai a ORF2 de PCV2 a partir do interior das células. Foi, além disso, surpreendentemente verificado que a proteína de ORF2 de PCV é robusta contra a degradação prototípica no exterior das células de produção. Ambas as constatações, em conjunto, permitem uma recuperação de elevadas quantidades de proteína de ORF2 de PCV2 a partir do sobrenadante de culturas celulares infectadas com vectores virais recombinantes contendo um ADN de ORF2 de PCV2 e expressando a proteína de ORF2 de PCV2. Elevadas quantidades de proteína de ORF2 de PCV2 significam mais de cerca de 20 µg/mL de sobrenadante, de um modo preferido, mais de cerca de 25 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, mais de cerca de 30 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, mais de cerca de 40 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, mais de cerca de 50 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, mais de cerca de 60 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, mais de cerca de 80 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, mais de cerca de 100 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, do que cerca de 150 µg/mL, de um modo

muito preferido, do que cerca de 190 µg/mL. Essas taxas de expressão também podem ser alcançadas, por exemplo, pelos métodos como descritos nos Exemplos 1 a 3.

As culturas celulares preferidas têm uma contagem celular entre cerca de $0,3 - 2,0 \times 10^6$ células/mL, de um modo mais preferido, desde cerca de $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL e, de um modo muito preferido, desde cerca de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. As células preferidas são determináveis pelos especialistas na técnica. As células preferidas são as susceptíveis para infecção com um vector viral recombinante apropriado, contendo um ADN de ORF2 de PCV2 e expressando a proteína de ORF2 de PCV2. De um modo preferido, as células são células de insecto e, de um modo mais preferido, incluem as células de insecto comercializadas sob a marca registada células de insecto Sf+ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT).

Os meios de crescimento apropriados também serão determináveis pelos especialistas na técnica, com os meios de crescimento preferidos sendo os meios de células de insecto isentas de soro, tal como Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) e semelhantes. Os vectores virais preferidos incluem baculovírus, tal como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), em particular, se as células de produção forem células de insecto. Embora o sistema de expressão de baculovírus seja preferido, é compreendido pelos especialistas na técnica que, para o objectivo da presente divulgação, nomeadamente a expressão de ORF2 de PCV2 para o sobrenadante de uma cultura celular, irão funcionar outros sistemas de expressão. Esses

outros sistemas de expressão podem requerer a utilização de uma sequência sinal, de modo a causar a expressão de ORF2 para os meios. Foi surpreendentemente verificado que, quando a ORF2 é produzida por um sistema de expressão de baculovírus, não requer qualquer sequência sinal ou modificação adicional para causar a expressão de ORF2 para os meios. Acredita-se que esta proteína pode formar, independentemente, partículas semelhantes a vírus (*Journal of General Virology* Vol. 81, p. 2281-2287 (2000) e ser segregada para o sobrenadante de cultura. Quando utilizado para a infecção das células susceptíveis, o vector viral recombinante contendo as sequências de ADN de ORF2 de PCV2 tem uma multiplicidade de infecção (MOI) preferida compreendida entre cerca de 0,03 - 1,5, de um modo mais preferido, desde cerca de 0,05 - 1,3, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 0,09 - 1,1 e, de um modo muito preferido, desde cerca de 0,1 - 1,0. De um modo preferido, as MOI mencionadas acima referem-se a um mL de fluido de cultura de celular. De um modo preferido, o método aqui descrito compreende a infecção de $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, de um modo ainda mais preferido, de cerca de $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, de um modo ainda mais preferido, de cerca de $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL e, de um modo muito preferido, de cerca de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL, com um vector viral recombinante contendo um ADN de ORF2 de PCV2 e expressando a proteína de ORF de PCV2 tendo uma MOI (multiplicidade de infecção) compreendida entre cerca de 0,03 - 1,5, de um modo mais preferido, de cerca desde 0,05 - 1,3, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 0,09 - 1,1 e, de um modo muito preferido, desde cerca de 0,1 - 1,0.

As células infectadas são, depois, incubadas ao longo de um período de até dez dias, de um modo mais preferido, desde cerca

de dois dias a cerca de dez dias, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de quatro dias a cerca de nove dias e, de um modo muito preferido, desde cerca de cinco dias a cerca de oito dias. As condições de incubação preferidas incluem uma temperatura entre cerca de 22 - 32 °C, de um modo mais preferido, desde cerca de 24 - 30 °C, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 25 - 29 °C, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 26 - 28 °C e, de um modo muito preferido, cerca de 27 °C. De um modo preferido, após inoculação, as células Sf+ são observadas para alterações características induzidas por baculovírus. Essa observação pode incluir a monitorização de tendências de densidade celular e a diminuição em viabilidade durante o período de pós-infecção. Verificou-se que o pico do título viral é observado 3-5 dias após infecção e o pico de libertação de ORF2 das células para o sobrenadante é obtido entre os dias 5 e 8 e/ou quando a viabilidade celular diminui para menos de 10%.

Deste modo, um aspecto da presente divulgação proporciona um método melhorado de produção e/ou recuperação de proteína de ORF2 recombinante de PCV2, de um modo preferido, nas quantidades descritas acima, **i)** permitindo a infecção de um número de células susceptíveis (ver acima) em cultura com um vector viral recombinante, com uma MOI como definida acima, **ii)** a expressão da proteína de ORF2 de PCV2 pelo vector viral recombinante e **iii)** subsequentemente a recuperação da ORF2 de PCV2 no sobrenadante de células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou diminuição de viabilidade celular para menos de 10%. De um modo preferido, o vector viral recombinante é um baculovírus recombinante contendo sequências codificantes de ADN de ORF2 de PCV2 e as células são células Sf+. Além disso, prefere-se que, durante o período de pós-infecção, a cultura

seja periodicamente examinada para evidência macroscópica e microscópica de contaminação ou para alterações atípicas na morfologia celular. Qualquer cultura exibindo qualquer contaminação deve ser descartada. De um modo preferido, a proteína recombinante de ORF2 expressa é segregada pelas células para os meios de crescimento circundantes que mantêm a viabilidade celular. A ORF2 é, depois, recuperada no sobrenadante circundando as células, em vez de ser a partir das próprias células.

O processo de recuperação começa, de um modo preferido, com a separação dos detritos celulares da ORF2 expressa nos meios, por intermédio de uma etapa de separação. As etapas de separação preferidas incluem filtração, centrifugação a velocidades de até cerca de 20000 x g, centrifugação de fluxo contínuo, separação cromatográfica utilizando troca iónica ou filtração em gel e métodos convencionais de imunoafinidade. Esses métodos são conhecidos dos especialistas na técnica, por exemplo, por (Harris e Angel (eds.), *Protein purification methods - a practical approach*, IRL press Oxford 1995). Os métodos de separação mais preferidos incluem centrifugação a velocidades de até cerca de 20000 x g e filtração. Os métodos de filtração preferidos incluem microfiltração fechada e filtração de fluxo tangencial (ou fluxo cruzado), incluindo filtração de fibra oca e microfiltração fechada. Destes, a microfiltração fechada é preferida. Os tamanhos de poro preferidos para a microfiltração fechada são entre cerca de 0,30 - 1,35 μm , de um modo mais preferido, entre cerca de 0,35 - 1,25 μm , de um modo ainda mais preferido, entre cerca de 0,40 - 1,10 μm e, de um modo muito preferido, entre cerca de 0,45 - 1,0 μm . Acredita-se que, para o objectivo da presente invenção, qualquer membrana de filtração convencional funcionará e as membranas de poliétersulfona são

preferidas. Durante a etapa de filtração, é removida qualquer espécie de ácido nucleico de baixo peso.

Deste modo, um aspecto adicional da presente divulgação proporciona um método melhorado de produção e/ou recuperação de proteína de ORF2 recombinante de PCV2, de um modo preferido, nas quantidades descritas acima, **i)** permitindo a infecção de um número de células susceptíveis (ver acima) em cultura com um vector viral recombinante, com uma MOI como definida acima, **ii)** expressão de proteína de ORF2 de PCV pelo vector viral recombinante, **iii)** recuperação da ORF2 de PCV2 no sobrenadante de células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou diminuição de viabilidade celular para menos de 10% e **iv)** separação dos detritos celulares da ORF2 de PCV2 expressa, por meio de uma etapa de separação. De um modo preferido, o vector viral recombinante é um baculovírus contendo sequências codificantes de ADN de ORF2 e as células são células SF+. As etapas de separação preferidas são as descritas acima. É muito preferida a microfiltração fechada, utilizando uma membrana tendo um tamanho de poro entre cerca de 0,30 - 1,35 μm , de um modo mais preferido, entre cerca de 0,35 - 1,25 μm , de um modo ainda mais preferido, entre cerca de 0,40 - 1,10 μm e, de um modo muito preferido, entre cerca de 0,45 - 1,0 μm .

Para recuperação da proteína ORF2 de PCV2 que será utilizada numa composição imunogénica ou imunológica, tal como uma vacina, é preferida a inclusão de uma etapa de inactivação, de modo a inactivar o vector viral. Uma "composição imunogénica ou imunológica" refere-se a uma composição de matéria que compreende, pelo menos, um antigénio, o qual deduz uma resposta imunológica no hospedeiro de uma resposta imunitária de mediação celular e/ou de anticorpo para a composição ou vacina de

interesse. Habitualmente, uma "resposta imunológica" inclui mas não está limitada a um ou mais dos seguintes efeitos: a produção ou activação de anticorpos, células B, células T auxiliares, células T supressoras e/ou células T citotóxicas e/ou células T $\gamma\delta$, dirigidos especificamente a um antigénio ou antigénios incluídos na composição ou vacina de interesse. De um modo preferido, o hospedeiro exibirá uma resposta imunológica terapêutica ou protectora, de modo que a resistência à nova infecção possa ser melhorada e/ou a gravidade clínica da doença reduzida. Essa protecção será demonstrada por uma redução ou ausência de sintomas normalmente exibidos por um hospedeiro infectado, um tempo de recuperação mais rápido e/ou um título viral diminuído no hospedeiro infectado. Deste modo, a presente divulgação também se refere a um método de produção e/ou recuperação de proteína de ORF2 recombinante de PCV2, de um modo preferido, nas quantidades descritas acima, **i)** permitindo a infecção de um número de células susceptíveis (ver acima) em cultura com um vector viral recombinante, com uma MOI como definida acima, **ii)** expressão de proteína de ORF2 de PCV pelo vector viral recombinante, **iii)** recuperação da ORF2 de PCV2 no sobrenadante de células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou diminuição de viabilidade celular para menos de 10%, **iv)** separação dos detritos celulares da ORF2 de PCV2 expressa, por meio de uma etapa de separação e **v)** inactivação do vector viral recombinante.

De um modo preferido, esta inactivação é realizada imediatamente antes ou imediatamente após a etapa de filtração, com após a etapa de filtração sendo o tempo preferido para inactivação. Para o objectivo da presente invenção, qualquer método de inactivação convencional pode ser utilizado. Deste modo, a inactivação pode ser realizada por tratamentos químicos

e/ou físicos. Em formas preferidas, o volume de fluidos de recolha é determinado e a temperatura é ajustada para entre cerca de 32 - 42 °C, de um modo mais preferido, entre cerca de 34 - 40 °C e, de um modo muito preferido, entre cerca de 35 - 39 °C. Os métodos de inactivação preferidos incluem a adição de etilenimina binária (BEI) ciclizada, de um modo preferido, numa concentração de cerca de 1 a cerca de 20 mM, de um modo preferido, de cerca de 2 a cerca de 10 mM, de um modo ainda mais preferido, de cerca de 2 a cerca de 8 mM, de um modo ainda mais preferido, de cerca de 3 a cerca de 7 mM, de um modo muito preferido, de cerca de 5 mM. Por exemplo, a inactivação inclui a adição de uma solução de bromidrato de 2-bromoetilenoamina, de um modo preferido, de cerca de 0,4 M, a qual tenha sido ciclizada para etilenimina binária (BEI) a 0,2 M em NaOH a 0,3 N, aos fluidos para dar uma concentração final de BEI de cerca de 5 mM. De um modo preferido, os fluidos são, depois, continuamente agitados, durante 72 - 96 horas e os fluidos de recolha inactivados podem ser armazenados congelados, a -40 °C, ou abaixo, ou entre cerca de 1 - 7 °C. Depois de completada a inactivação, é adicionada uma solução de tiosulfato de sódio, de um modo preferido, a 1,0 M, para neutralizar qualquer BEI residual. De um modo preferido, o tiosulfato de sódio é adicionado em quantidade equivalente, em comparação com a BEI adicionada antes para inactivação. Por exemplo, no caso da BEI ser adicionada para uma concentração final de 5 mM, é adicionada uma solução de tiosulfato de sódio a 1,0 M, para dar uma concentração mínima final de 5 mM, para neutralizar qualquer BEI residual.

Deste modo, um aspecto adicional da presente divulgação refere-se a um método de produção de proteína de ORF2 recombinante de PCV2, de um modo preferido, nas quantidades

descritas acima, **i)** permitindo a infecção de um número de células susceptíveis (ver acima) em cultura com um vector viral recombinante, com uma MOI como definida acima, **ii)** expressão de proteína de ORF2 de PCV pelo vector viral recombinante, **iii)** recuperação da ORF2 de PCV2 no sobrenadante de células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou diminuição de viabilidade celular para menos de 10%, **iv)** separação de detritos celulares da ORF2 de PCV2 expressa, por meio de uma etapa de separação e **v)** inactivação do vector viral recombinante. De um modo preferido, o vector viral recombinante é um baculovírus contendo sequências codificantes de ADN de ORF2 e as células são células SF+. As etapas de separação preferidas são as descritas acima, de um modo muito preferido, é a etapa de filtração. As etapas de inactivação preferidas são as descritas acima. De um modo preferido, a inactivação é realizada entre cerca de 35 - 39 °C e na presença de 2 a 8 mM de BEI, de um modo ainda mais preferido, na presença de cerca de 5 mM de BEI. Foi, surpreendentemente, verificado que concentrações mais elevadas de BEI afectam negativamente a proteína de ORF2 de PCV2.

De acordo um aspecto adicional da presente divulgação, o método descrito acima também inclui uma etapa de neutralização após a etapa **v)**. Esta etapa **vi)** compreende a adição de uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inactivação na solução. De um modo preferido, se o agente de inactivação for BEI, a adição de tiosulfato de sódio a uma quantidade equivalente é preferida. Deste modo, de acordo com um aspecto adicional, quando o agente de inactivação é BEI, a etapa **vi)** compreende a adição de uma solução de tiosulfato de sódio para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM, de um modo preferido, de cerca de 2 a cerca de 10 mM, de um modo ainda mais preferido, de cerca de 2 a cerca de 8 mM, de

um modo ainda mais preferido, de cerca de 3 a cerca de 7 mM, de um modo muito preferido, de cerca de 5 mM.

Em formas preferidas e, especialmente, em formas que utilizarão a proteína de ORF2 recombinante de PCV2 numa composição imunogénica, tal como uma vacina, cada lote de ORF2 recolhida será testado para inactivação por passagem nas células Sf+ dependentes de ancoragem, susceptíveis a baculovírus. Numa forma preferida deste teste, 150 cm² de monocamada de cultura celular apropriada são inoculados com 1,0 mL de fluidos de PCV2 inactivado e mantidos, a 25 - 29 °C, durante 14 dias com, pelo menos, duas passagens. No fim do período de manutenção, as monocamadas celulares são examinadas para efeito citopatogénico (CPE) típico de baculovírus de ORF2 de PCV2. De um modo preferido, também são utilizados controlos positivos de vírus. Esses controlos podem consistir de uma cultura de células Sf+ inoculadas com um baculovírus de ORF2 de PCV2 de referência não inactivado e um frasco de células Sf+ que permanecem não inoculadas. Após incubação e passagem, a ausência de células infectadas por vírus nos fluidos virais tratados com BEI constituiria um teste de inactivação satisfatório. As células de controlo inoculadas com o vírus de referência devem exibir CPE típico de baculovírus de ORF2 de PCV2 e o frasco não inoculado não deve exibir qualquer evidência de CPE de baculovírus de ORF2 de PCV2. Alternativamente, no fim do período de manutenção, as amostras de sobrenadante poderiam ser recolhidas e inoculadas numa placa de 96 poços de Sf+, a qual foi carregada com células Sf+ e, depois, mantida a 25 - 29 °C, durante 5-6 dias. A placa é, depois, fixa e corada com anticorpo de ORF2 anti-PCV2 conjugado a FITC. A ausência de CPE e expressão de ORF2, como detectados por microscopia de IFA nos fluidos virais tratados com BEI constitui um teste de inactivação satisfatório. As

células de controlo inoculadas com o vírus de referência devem exibir CPE e actividade de IFA e o frasco não inoculado não deve exibir qualquer evidência de CPE de baculovírus de ORF2 de PCV2 e não conter actividade de IFA.

Deste modo, um aspecto adicional da presente divulgação refere-se a um teste de inactivação para determinar a eficácia da inactivação do vector viral de recombinação, compreende as etapas: **i)** colocação de, pelo menos, uma porção do fluido de cultura contendo o vector viral recombinante em contacto com um agente de inactivação, de um modo preferido, como descrito acima, **ii)** adição de um agente de neutralização para neutralizar o agente de inactivação, de um modo preferido, como descrito acima e **iii)** determinação da infecciosidade residual pelos ensaios, como descritos acima.

Após inactivação, a quantidade relativa de proteína de ORF2 recombinante de PCV2 numa amostra pode ser determinada de vários modos. Os métodos preferidos de quantificação incluem estudos de densitometria de SDS-PAGE, ELISA e vacinação animal que correlacionam quantidades conhecidas de vacina com resultados clínicos (serologia, etc.). Quando o SDS-PAGE é utilizado para quantificação, o material de amostra contendo uma quantidade desconhecida de proteína de ORF2 recombinante de PCV2 é corrido num gel, juntamente com amostras que contêm quantidades conhecidas diferentes de proteína de ORF2 recombinante de PCV2. Uma curva padrão pode ser, depois, produzida com base nas amostras conhecidas e a quantidade de ORF2 recombinante de PCV2 na amostra desconhecida pode ser determinada por comparação com esta curva padrão. Devido aos ELISA serem, em geral, reconhecidos como o padrão da indústria para quantificação antigénica, são preferidos para quantificação.

Deste modo, a presente divulgação também se refere a um ELISA para a quantificação de proteína de ORF2 recombinante de PCV2. Um ELISA preferido, como aqui proporcionado, começará, em geral, com diluição do anticorpo de captura de 1:6000 ou uma diluição de trabalho apropriada em tampão de revestimento. Um anticorpo de captura preferido é o PAb Prot. G anti-PCV2 de Suíno purificado e um tampão de revestimento preferido é o tampão de Carbonato a 0,05 M, o qual pode ser preparado pela combinação de 2,93 g de NaHCO_3 (Cat. Sigma N° S-6014 ou equivalente) e 1,59 g de NaCO_3 (Cat. Sigma N° S-6139 ou equivalente). A mistura é combinada com água destilada ou equivalente, para preparar um litro, a um pH de $9,6 \pm 0,1$. Depois, o anticorpo de captura é diluído 1:6000, ou qualquer outra diluição de trabalho apropriada, em tampão de revestimento. Por exemplo, para quatro placas, seriam necessários 42 mL de tampão de revestimento e sete μL de anticorpo de captura. Utilizando um método de pipetagem inversa, 100 μL de anticorpo de captura diluído são adicionados à totalidade dos poços. De modo a obter-se um revestimento uniforme, os lados de cada placa devem ser suavemente sacudidos. As placas são, depois, vedadas com vedantes de placa, antes de empilhamento das placas e tapar o empilhado com uma placa de 96 poços vazia. As placas são incubadas, de um dia para o outro (14-24 horas), a 35-39 °C. Cada placa é, depois, lavada três vezes com tampão de lavagem, utilizando a lavadora de placas de microtitulação *ultrawash plus*, regulada a 250 μL /lavagem, com três lavagens e sem tempo de imersão. Após a última lavagem, as placas devem ser levemente sacudidas contra um toalhete de papel. Novamente, utilizando a técnica de pipetagem inversa, 250 μL de solução de bloqueio devem ser adicionados à totalidade dos poços. As placas de teste devem ser vedadas e incubadas

durante, aproximadamente, uma hora ($\pm$ cinco minutos), a 35-37 °C. De um modo preferido, após esta etapa, as placas não serão empilhadas. Durante a etapa de bloqueio, todas as amostras de teste devem ser retiradas e descongeladas, à temperatura ambiente. Depois, quatro placas de diluição separadas devem ser preparadas pela adição de 200 μ L de solução de diluente à totalidade dos poços restantes, à exceção da fila A e fila H, colunas 1-3. Depois, seis tubos de ensaio devem ser rotulados como se segue, título baixo, título médio, título elevado, inativado/filtrado (1:240), inativado/filtrado (1:480) e controlo interno. Nos tubos designados, deve ser preparada uma diluição apropriada para as seguintes amostras de teste. As amostras de teste descongeladas devem ser agitadas antes da utilização. Para quatro placas, serão preparadas as seguintes diluições: A) o título baixo não será pré-diluído: 3,0 mL de título baixo; B) controlo negativo a uma diluição de 1:30 (células SF+): 3,77 mL de diluente + 130 μ L do controlo negativo; C) título médio a uma diluição de 1:30 (8 μ g/mL): 3,77 mL de diluente + 130 μ L do título médio; D) título elevado a uma diluição de 1:90 (16 μ g/mL): 2,967 mL de diluente + 33 μ L de título elevado; E) inativado/filtrado a uma diluição de 1:240: 2,39 mL de diluente + 10 μ L de amostra inativada/filtrada; F) inativado/filtrado a uma diluição de 1:480: 1,0 mL de diluente + 1,0 mL de amostra de inact/filtrado (1:240) preparada a partir de E acima; G) controlo interno a diluição de 1:30: 3,77 mL de diluente + 130 μ L do controlo interno. Depois, adicionar 300 μ L das amostras preparadas a poços vazios correspondentes nas placas de diluição para as placas 1 até 4. O pipetador multicanal é, depois, regulado para 100 μ L e os conteúdos na Fila A são misturados por pipetagem para cima e baixo durante, pelo menos, 5 vezes e, depois, 100 μ L são transferidos para a Fila B utilizando a técnica de pipetagem

inversa. As pontas devem ser trocadas e este mesmo processo é seguido pela placa até à Fila G. As amostras nestas placas de diluição estão agora prontas para transferência para as placas de teste, assim que as placas de teste tenham sido lavadas 3 vezes com tampão de lavagem, utilizando a lavadora de placas de microtitulação *ultrawash plus* (configurações a 250 µL/lavagem, 3 lavagens, sem tempo de imersão). Após a última lavagem, as placas devem ser levemente sacudidas contra um toallete de papel. Depois, os conteúdos da placa de diluição são transferidos para a placa de teste, utilizando um simples processo de transferência. De um modo mais específico, começando na fila H, 100 µL/poço são transferidos da(s) placa(s) de diluição para poços correspondentes da(s) placa(s) de teste, utilizando a técnica de pipetagem inversa. Após cada transferência, as pontas de pipeta devem ser trocadas. Da Fila G, 100 µL/poço na(s) placa(s) de diluição são transferidos para poços correspondentes da(s) placa(s) de teste, utilizando a técnica de pipetagem inversa. O mesmo conjunto de pontas de pipeta pode ser utilizado para o resto da transferência. Para garantir uma solução homogênea para a transferência, antes da transferência, a solução deve ser pipetada para cima e baixo, pelo menos, 3 vezes. Depois, a(s) placa(s) de teste é (são) vedada(s) e incubada(s), durante 1,0 hora ± 5 minutos, a 37 °C ± 2,0 °C. Novamente, é preferido não empilhar as placas. As placas são, depois, lavadas 3 vezes com tampão de lavagem, utilizando a lavadora de placas de microtitulação *ultrawash plus* (configurações a 250 µL/lavagem, 3 lavagens e sem tempo de imersão). Após a última lavagem, as placas são levemente sacudidas contra um toallete de papel. Utilizando a técnica de pipetagem inversa, 100 µL de anticorpo de detecção, diluído 1:300, ou diluição de trabalho apropriada, em solução de diluente, são adicionados à totalidade dos poços da(s) placa(s)

de teste. Por exemplo, para quatro placas, serão necessários 42 mL de solução de diluente com 140 µL de anticorpo de captura. A(s) placa(s) de teste é (são), depois, vedada(s) e incubada(s), durante 1,0 hora $\pm$ 5 minutos, a 37 °C $\pm$ 2,0 °C. Novamente, as placas são lavadas 3 vezes com tampão de lavagem, utilizando a lavadora de placas de microtitulação *ultrawash plus* (configurações a 250 µL/lavagem, 3 lavagens e sem tempo de imersão). Após a última lavagem, as placas são levemente sacudidas contra um toalhete de papel. Depois, o diluente de conjugado é preparado pela adição de 1% de soro de coelho normal ao diluente. Por exemplo, para quatro placas, 420 µL de soro de coelho normal são adicionados a 42 mL de diluente. O anticorpo conjugado é diluído para 1:10000, ou qualquer outra diluição de trabalho apropriada, numa solução de diluente de conjugado recém-preparada, a todos os poços da(s) placa(s) de teste. Utilizando uma técnica de pipetagem inversa, 100 µL deste anticorpo conjugado diluído são adicionados a todos os poços. A(s) placa(s) de teste é (são), depois, vedada(s) e incubada(s), durante 45 $\pm$ 5 minutos, a 37 °C $\pm$ 2,0 °C. De um modo preferido, as placas não são empilhadas. As placas são, depois, lavadas 3 vezes com tampão de lavagem, utilizando a lavadora de placas de microtitulação *ultrawash plus* (configurações a 250 µL/lavagem, 3 lavagens e sem tempo de imersão). Após a última lavagem, as placas são levemente sacudidas contra um toalhete de papel. Depois, volumes iguais de Substrato de TMB Peroxidase (Reagente A) com Solução de Peroxidase B (Reagente B) são imediatamente misturados antes de utilização. A quantidade misturada irá variar, dependendo da quantidade de placas, mas cada placa irá requerer 10 mL/placa + 2 mL. Por conseguinte, para 4 placas, será 21 mL de Reagente A + 21 mL de Reagente B. Utilizando a técnica de pipetagem inversa, 100 µL de substrato são adicionados a todos os poços da(s) placa(s) de teste. As

placas são, depois, incubadas, à temperatura ambiente, durante 15 minutos $\pm$ 15 segundos. A reacção é interrompida pela adição de 100 μ L de solução de HCl a 1 N a todos os poços, utilizando a técnica de pipetagem inversa. O leitor de placas de ELISA é, depois, ligado e deixou-se continuar através das suas fases de diagnóstico e testes, num modo convencional.

Um aspecto adicional da divulgação refere-se a um método para a construção de um vector viral recombinante contendo ADN de ORF2 de PCV2 e expressão da proteína de ORF2 de PCV2 em elevadas quantidades, quando infectado em células susceptíveis. Foi verificado, surpreendentemente, que o vector viral recombinante, como aqui proporcionado, após infectar células susceptíveis, expressa elevadas quantidades, como definido acima, de ORF2 de PCV2. Por conseguinte, a presente divulgação também se refere a um método melhorado para a produção e/ou recuperação de proteína de ORF2 de PCV2, de um modo preferido, compreende a etapa: construção de um vector viral recombinante contendo ADN de ORF2 de PCV2 e expressão de proteína de ORF2 de PCV2. De um modo preferido, o vector viral é um baculovírus recombinante. Os detalhes do método para a construção de vectores virais recombinantes contendo ADN de ORF2 de PCV2 e a expressão de proteína de ORF2 de PCV2, como aqui proporcionado, são descritos no seguinte: Em formas preferidas, o vector viral recombinante, contendo ADN de ORF 2 de PCV2 e expressão de proteína de ORF2 de PCV2, utilizado para infectar as células, é produzido pela transfecção de um vector de transferência que teve um gene de ORF2 clonado neste num vector viral. De um modo preferido, apenas a porção do vector de transferência é transfectada no vector viral que contém o ADN de ORF2. A expressão "transfectado num vector viral" significa e é utilizada como um sinónimo para "introdução" ou "clonagem" de um

ADN heterólogo num vector viral, tal como, por exemplo, num vector de baculovírus. No contexto da invenção, o vector viral é um baculovírus.

Deste modo, de acordo com um aspecto adicional da presente divulgação, o vector viral recombinante é produzido por recombinação entre um vector de transferência contendo o ADN de ORF2 de PCV2 heterólogo e um vector viral, de um modo preferido, um baculovírus, de um modo ainda mais preferido, um baculovírus linearizado deficiente em replicação (tal como ADN de Baculo Gold). Um "vector de transferência" significa uma molécula de ADN que inclui, pelo menos, uma origem de replicação, o gene heterólogo, no presente caso ORF2 de PCV2, e sequências de ADN, que permitem a clonagem do referido gene heterólogo no vector viral. De um modo preferido, as sequências que permitem a clonagem do gene heterólogo no vector viral flanqueiam o gene heterólogo. De um modo ainda mais preferido, essas sequências flanqueadoras são, pelo menos, homólogas em partes com sequências do vector viral. A homologia de sequência permite, depois, que a recombinação de ambas as moléculas, o vector viral e o vector de transferência gerem um vector viral recombinante contendo o gene heterólogo. Um vector de transferência preferido é o vector pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen), o qual é concebido para co-transfecção com o ADN de BaculoGold na linha celular Sf+ preferida. De um modo preferido, o referido vector de transferência compreende um ADN de ORF2 de PCV2. A construção co-transfectada tem, aproximadamente, 10387 pares de bases em comprimento.

Em formas mais preferidas, os métodos da presente invenção iniciar-se-ão com o isolamento de ADN de ORF2 de PCV2. Em geral, este pode ser de uma estirpe conhecida ou desconhecida, dado que

o ADN de ORF2 parece ser altamente conservado com, pelo menos, cerca de 95% de identidade de sequência entre diferentes isolados. Para o objectivo da presente invenção, qualquer gene de ORF2 de PCV2 conhecido na técnica pode ser utilizado, dado que cada seria expresso no sobrenadante. O ADN de ORF2 de PCV é, de um modo preferido, amplificado utilizando métodos de PCR, de um modo ainda mais preferido, juntamente com a introdução de uma sequência consenso de Kozak flanqueadora em 5' (CCGCCAUG) (SEQ ID Nº 1) e/ou um sítio EcoR1 flanqueador em 3' (GAATTC) (SEQ ID Nº 2). Essa introdução de um consenso de Kozak em 5' remove, de um modo preferido, o codão de iniciação de ocorrência natural AUG da ORF2 de PCV2. O sítio EcoR1 em 3' é, de um modo preferido, introduzido a jusante do codão de terminação da ORF2 de PCV2. De um modo mais preferido, é introduzido a jusante de uma sequência de terminação de transcrição de poli A que, ela própria, está localizada a jusante do codão de terminação da ORF2 de PCV2. Verificou-se que a utilização de uma sequência consenso de Kozak, em particular, como descrito acima, aumenta o nível de expressão da subsequente proteína de ORF2 de PCV2. O ADN de ORF2 de PCV2 amplificado, com estas sequências adicionais, é clonado num vector. Um vector preferido para esta etapa de clonagem inicial é o Vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). O ADN de ORF2 de PCV2, incluindo algumas sequências do vector pGEM (SEQ ID Nº: 7) é, de um modo preferido, excisado do vector no sítio de restrição NotI. O ADN resultante é, depois, clonado no vector de transferência.

Deste modo, num aspecto da presente divulgação, é proporcionado um método para a construção de um vector viral recombinante contendo ADN de ORF2 de PCV2. Este método compreende as etapas: **i)** clonagem de uma ORF2 recombinante de PCV2 num vector de transferência; e **ii)** transfecção da porção do

vector de transferência contendo a ORF2 recombinante de PCV2 num vector viral, para produzir o vector viral recombinante. De um modo preferido, o vector de transferência é o descrito acima ou é construído como descrito acima ou como mostrado, de modo exemplificativo, na Figura 1. Deste modo, de acordo com um aspecto adicional, o vector de transferência, utilizado para a construção do vector viral recombinante, como aqui descrito, contém a sequência da SEQ ID Nº: 7.

De acordo com um aspecto adicional, este método compreende ainda, antes da etapa **i)**, a etapa seguinte: a amplificação do ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências flanqueadoras do ADN de ORF2 de PCV2 são modificadas como descrito acima. Os métodos *in vitro* para amplificação do ADN de ORF2 de PCV2 e modificação das sequências flanqueadoras, clonagem *in vitro* de ADN de ORF2 de PCV2 amplificado num vector de transferência e vectores de transferência adequados são descritos acima, mostrados de modo exemplificativo na Figura 1 ou conhecidos de um especialista na técnica. Deste modo, de acordo com um aspecto adicional, a presente divulgação refere-se a um método para a construção de um vector viral recombinante contendo ADN de ORF2 de PCV2 e a expressão da proteína de ORF2 de PCV2 compreende as etapas de: **i)** amplificação de ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências flanqueadoras do referido ADN de ORF2 de PCV2 são modificadas, **ii)** clonagem do ADN de ORF2 de PCV2 amplificado num vector de transferência; e **iii)** transfecção do vector de transferência ou uma sua porção, contendo o ADN de ORF2 de PCV2 recombinante num vector viral para produzir o vector viral recombinante. De um modo preferido, a modificação das sequências flanqueadoras de um ADN de ORF2 de PCV2 é realizada como descrito acima, e. g., pela introdução de uma sequência de Kozak

em 5' e/ou um sítio EcoR1, de um modo preferido, como descrito acima.

De acordo com um aspecto adicional, é proporcionado um método de produção e/ou recuperação de proteína recombinante expressa pela fase de leitura aberta 2 de PCV2. O método compreende, em geral, as etapas de: **i)** clonagem de uma ORF2 recombinante de PCV2 num vector de transferência; **ii)** transfecção da porção do vector de transferência contendo a ORF2 recombinante de PCV2 para um vírus; **iii)** infecção das células em meios com o vírus transfectado; **iv)** fazer com que o vírus transfectado expresse a proteína recombinante da ORF2 de PCV2; **v)** separação das células do sobrenadante; e **vi)** recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante.

Os métodos de como clonar um ADN de ORF2 recombinante de PCV2 num vector de transferência são descritos acima. De um modo preferido, o vector de transferência contém a sequência de SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 7. Contudo, o vector de transferência pode conter qualquer ADN de ORF2 de PCV2, não modificado ou modificado, desde que o ADN de ORF2 de PCV2, quando transfectado num vector viral recombinante, seja expresso em cultura celular. De um modo preferido, o vector viral recombinante compreende a sequência da SEQ ID N°: 8. Além disso, são descritos acima em detalhe os métodos de como infectar células, de um modo preferido, como infectar células de insecto, com um número definido de baculovírus recombinante contendo ADN de ORF2 de PCV2 e expressar a proteína de ORF2 de PCV2. Além disso, as etapas de separação de células do sobrenadante, assim como as etapas para recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 expressa, também são descritas acima em detalhe. Qualquer

destas etapas de processo específicas, como aqui descritas, são parte do método de produção e/ou recuperação de proteína recombinante expressa pela fase de leitura aberta 2 de PCV2, como descrito acima. De um modo preferido, as células são células SF+. De um modo ainda mais preferido, as culturas celulares têm uma contagem celular entre cerca de $0,3 - 2,0 \times 10^6$ células/mL, de um modo mais preferido, desde cerca $0,35 - 1,9 \times 10^6$ células/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca $0,4 - 1,8 \times 10^6$ células/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca $0,45 - 1,7 \times 10^6$ células/mL e, de um modo muito preferido, de cerca $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. De um modo preferido, quando utilizado para a infecção das células susceptíveis, o vector viral recombinante contendo o ADN de ORF2 de PCV2 tem uma multiplicidade de infecção (MOI) preferida compreendida entre cerca de $0,03 - 1,5$, de um modo mais preferido, desde cerca $0,05 - 1,3$, de um modo ainda mais preferido, desde cerca $0,09 - 1,1$, de um modo ainda mais preferido, desde cerca $0,1 - 1,0$ e, de um modo muito preferido, a cerca de $0,5$. De um modo preferido, a recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 no sobrenadante de células obtidas entre os dias 5 e 8 após infecção e/ou viabilidade celular diminui para menos de 10%. De um modo preferido, para produção da proteína de ORF2 de PCV2, as células são cultivadas a 25 até 29 °C. De um modo preferido, a etapa de separação é uma etapa de centrifugação ou filtração.

Opcionalmente, antes da clonagem do ADN de ORF2 de PCV2 no vector de transferência, este método pode incluir a etapa de amplificação do ADN de ORF2 de PCV2 de uma estirpe de PCV2. Em formas preferidas, uma sequência de Kozak em 5', um sítio EcoR1 em 3' e as suas combinações também podem ser adicionados à sequência amplificada, de um modo preferido, antes ou durante a

amplificação. Uma sequência de Kozak em 5' preferida compreende a SEQ ID N°: 1. Um sítio EcoR1 em 3' preferido compreende a SEQ ID N°: 2. O ADN de ORF2 de PCV2 preferido compreende a sequência nucleotídica com o Acesso GenBank N° AF086834 (SEQ ID N°: 3) e SEQ ID N°: 4. A proteína de ORF2 recombinante de PCV2 preferida compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 5, a qual é a proteína codificada pela SEQ ID N°: 3 (Acesso GenBank N° AF086834) e SEQ ID N°: 6, a qual é a proteína codificada pela SEQ ID N°: 4. Os meios preferidos compreendem meios de células de insecto isentos de soro, de um modo ainda mais preferido, meios Excell 420. Quando é realizada a etapa de amplificação opcional, é preferido, em primeiro lugar, clonar a fase de leitura aberta 2 amplificada num primeiro vector, excisar a fase de leitura aberta 2 do primeiro vector e utilizar a fase de leitura aberta excisada para clonagem no vector de transferência. Uma linha celular preferida para a co-transfecção é a linha celular SF+. Um vírus preferido para a co-transfecção é o baculovírus. Em formas preferidas deste método, a porção transfectada do vector de transferência compreende a SEQ ID N°: 8. Finalmente, para este método, a proteína da fase de leitura aberta 2 ORF2 de PCV2 é recuperada no sobrenadante de cultura celular, pelo menos, 5 dias após infecção das células com o vírus.

Deste modo, um aspecto adicional da divulgação refere-se a um método para a produção e/ou recuperação da fase de leitura aberta 2 de PCV2, compreende as etapas: **i)** amplificação do ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, de um modo preferido, pela adição de uma sequência de Kozak em 5' e/ou pela adição de um sítio de restrição EcoR1 em 3', **ii)** clonagem da ORF2 de PCV2 amplificada num vector de transferência; **iii)** transfecção da porção do vector de transferência contendo a ORF2 recombinante de PCV2 num

vírus; **iv)** infecção das células em meios com o vírus transfectado; **v)** fazer com que o vírus transfectado expresse a proteína recombinante da ORF2 de PCV2; **vi)** separação das células do sobrenadante; e **vii)** recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante.

Um aspecto adicional da presente divulgação refere-se a um método para a preparação de uma composição compreendendo a proteína de ORF2 de PCV2 e vector viral inactivado. Este método compreende as etapas: **i)** clonagem da ORF2 de PCV2 amplificada num vector de transferência; **ii)** transfecção da porção do vector de transferência contendo a ORF2 recombinante de PCV2 para um vírus; **iii)** infecção das células em meios com o vector viral transfectado; **iv)** fazer com que o vector viral transfectado expresse a proteína recombinante da ORF2 de PCV2; **v)** separação das células do sobrenadante; **vi)** recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante; e **vii)** inactivação do vector viral recombinante. De um modo preferido, o vector viral recombinante é um baculovírus contendo sequências codificantes de ADN de ORF2 e as células são células SF+. As etapas de separação preferidas são as descritas acima, de um modo muito preferido, é a etapa de filtração. As etapas de inactivação preferidas são as descritas acima. De um modo preferido, a inactivação é realizada entre cerca de 35 – 39 °C e na presença de 2 a 8 mM de BEI, de um modo ainda mais preferido, na presença de cerca de 5 mM de BEI. Foi surpreendentemente verificado que concentrações mais elevadas de BEI afectam negativamente a proteína de ORF2 de PCV2 e concentrações mais baixas não são eficazes para inactivar o vector viral no espaço de 24 a 72 horas da inactivação. De um modo preferido, a inactivação é realizada durante, pelo menos, 24 horas, de um modo ainda mais preferido, durante 24 a 72 horas.

De acordo com um aspecto adicional, o método para a preparação de uma composição compreendendo a proteína de ORF2 de PCV2 e vector viral inativado, como descrito acima, também inclui uma etapa de neutralização após a etapa **vii)**. Esta etapa **viii)** compreende a adição de uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inativação na solução. De um modo preferido, se o agente de inativação for BEI, a adição de tiosulfato de sódio a uma quantidade equivalente é preferida. Deste modo, de acordo com um aspecto adicional, quando o agente de inativação é BEI, a etapa **viii)** compreende a adição de uma solução de tiosulfato de sódio para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM, de um modo preferido, de cerca de 2 a cerca de 10 mM, de um modo ainda mais preferido, de cerca de 2 a cerca de 8 mM, de um modo ainda mais preferido, de cerca de 3 a cerca de 7 mM, de um modo muito preferido, de cerca de 5 mM.

De acordo com um aspecto adicional, o método para a preparação de uma composição compreendendo proteína de ORF2 de PCV2 e vector viral inativado, como descrito acima, compreende, antes da etapa **i)**, a seguinte etapa: a amplificação do ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências flanqueadoras do ADN de ORF2 de PCV2 são modificadas como descrito acima. Os métodos *in vitro* para amplificação do ADN de ORF2 de PCV2 e modificação das sequências flanqueadoras, clonagem *in vitro* de ADN de ORF2 de PCV2 amplificado num vector de transferência e vectores de transferência adequados são descritos acima, mostrados de modo exemplificativo na Figura 1 ou conhecidos de um especialista na técnica. Deste modo, de acordo com um aspecto adicional, este método compreende as etapas: **i)** amplificação de ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências flanqueadoras do

referido ADN de ORF2 de PCV2 são modificadas, **ii)** clonagem do ADN de ORF2 de PCV2 amplificado num vector de transferência; e **iii)** transfecção do vector de transferência ou uma sua porção contendo o ADN de ORF2 recombinante de PCV2 num vector viral, para produzir o vector viral recombinante, **iv)** infecção das células em meios com o vírus transfectado; **v)** fazer com que o vírus transfectado expresse a proteína recombinante da ORF2 de PCV2; **vi)** separação das células do sobrenadante; **vii)** recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante; **viii)** inactivação do vector viral recombinante, de um modo preferido, na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de BEI, de um modo muito preferido, na presença de cerca de 5 mM de BEI; e **ix)** adição de uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inactivação na solução, de um modo preferido, adição de uma solução de tiosulfato de sódio para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM, de um modo preferido, de cerca de 5 mM, quando o agente de inactivação é BEI.

Noutro aspecto da presente divulgação é proporcionado um método para a preparação de uma composição, de um modo preferido, uma composição antigénica, tal como, por exemplo, uma vacina, para provocar uma resposta imunitária contra PCV2. Em geral, este método inclui as etapas de transfecção de uma construção para um vírus, em que a construção compreende **i)** ADN recombinante da ORF2 de PCV2, **ii)** infecção das células em meios de crescimento com o vírus transfectado, **iii)** fazer com que o vírus expresse a proteína recombinante da ORF2 de PCV2, **iv)** recuperação da proteína de ORF2 expressa do sobrenadante **v)** e preparação da composição pela combinação da proteína recuperada com um adjuvante adequado e/ou outro veículo farmacêuticamente aceitável.

"Adjuvantes", como aqui utilizado, pode incluir hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, saponinas, e. g., Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsão de água-em-óleo, emulsão de óleo-em-água, emulsão de água-em-óleo-em-água. A emulsão pode ser baseada, em particular, em óleo de parafina líquida leve (tipo Farmacopeia Europeia); óleo isoprenóide, tais 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, de um modo mais particular, óleos vegetais, oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de propilenoglicol, gliceril-tri-(caprilato/caprato) ou dioleato de propilenoglicol; ésteres de ácidos gordos ramificados ou álcoois, em particular, ésteres de ácido isoesteárico. O óleo é utilizado em combinação com emulsionantes, para formar a emulsão. Os emulsionantes são, de um modo preferido, tensioactivos não iónicos, em particular, ésteres de sorbitano, de manida (e. g., oleato de anidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenoglicol e de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico ou hidroxisteárico, os quais são, opcionalmente, etoxilados, e copolímeros em bloco de polioxipropileno-polioxietileno, em particular, os produtos Pluronic, especialmente L121. Ver Hunter *et al.*, *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, N.I., pp. 51-94 (1995) e Todd *et al.*, *Vaccine* 15:564-570 (1997).

Por exemplo, é possível utilizar 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 deste mesmo livro.

É um caso adicional de um adjuvante, um composto escolhido dos polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e os copolímeros de anidrido maleico e derivado de alcenilo. São compostos adjuvantes vantajosos os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico, os quais são reticulados, especialmente com éteres de polialcenilo de açúcares ou poliálcoois. Estes compostos são conhecidos pelo termo carbómero (Phameuropa Vol. 8, Nº 2, Junho de 1996). Os especialistas na técnica também podem referir-se à Patente U.S. Nº 2909462, a qual descreve esses polímeros acrílicos reticulados com um composto poli-hidroxilado tendo, pelo menos, 3 grupos hidroxilo, de um modo preferido, não mais de 8, os átomos de hidrogénio de, pelo menos, três hidroxilos sendo substituídos por radicais alifáticos insaturados tendo, pelo menos, 2 átomos de carbono. Os radicais preferidos são os que contêm de 2 a 4 átomos de carbono, e. g., vinilos, alilos e outros grupos etilenicamente insaturados. Os radicais insaturados podem conter, eles mesmos, outros substituintes, tal como metilo. Os produtos comercializados com o nome Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EUA) são particularmente apropriados. São reticulados com uma sacarose alílica ou com pentaeritritol alílico. Entre estes, podem mencionar-se Carbopol 974P, 934P e 971P. É muito preferida a utilização de Carbopol 971P. Entre os copolímeros de anidrido maleico e derivado alcenilo, os copolímeros EMA (Monsanto), os quais são copolímeros de anidrido maleico e etileno. A dissolução destes polímeros em água conduz a uma solução ácida que será neutralizada, de um modo preferido, para pH fisiológico, de modo a dar a solução de adjuvante, dentro da qual será incorporada a própria composição imunogénica, imunológica ou vacinal.

Adjuvantes adequados adicionais incluem mas não estão limitados ao sistema adjuvante RIBI (Ribi Inc.), Copolímero em bloco (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil-lípido A, adjuvante de lípido-amina Avridine, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante ou outra), toxina da cólera, IMS 1314 ou dipéptido muramilo, entre muitos outros.

De um modo preferido, o adjuvante é adicionado numa quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. De um modo ainda mais preferido, o adjuvante é adicionado numa quantidade de cerca de 100 µg a cerca de 10 mg por dose. De um modo ainda mais preferido, o adjuvante é adicionado numa quantidade de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose. De um modo ainda mais preferido, o adjuvante é adicionado numa quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose. De um modo muito preferido, o adjuvante é adicionado numa quantidade de cerca de 1 mg por dose.

Deste modo, de acordo com um aspecto adicional, o método para a preparação de uma composição antigénica, tal como, por exemplo, uma vacina, para provocar uma resposta imunitária contra PCV2 compreende **i)** a preparação e recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 e **ii)** a mistura desta com um adjuvante adequado. De um modo preferido, o adjuvante é Carbopol 971P. De um modo ainda mais preferido, o Carbopol 971P é adicionado numa quantidade de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e, de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 1 mg por dose. De um modo preferido, a etapa **i)** de processo inclui as etapas de processo como descritas para a preparação e recuperação da ORF2 de PCV2. Por exemplo, em

formas preferidas deste método, a construção compreendendo ADN de ORF2 de PCV2 é obtida num vector de transferência. Os vectores de transferência adequados e os métodos da sua preparação são descritos acima. Opcionalmente, antes da clonagem da ORF2 no vector de transferência, o método pode incluir a etapa de amplificação da ORF2 de uma estirpe de PCV2 através de PCR. As sequências da fase de leitura aberta, sequências de Kozak, sequências do sítio EcoR1 em 3', sequências de proteína recombinante, sequências de construção transfectada, meios, células e vírus preferidos são como descritos nos métodos anteriores. Outra etapa opcional para este método inclui a clonagem do ADN de ORF2 de PCV2 amplificado num primeiro vector, excisão do ADN de ORF2 deste primeiro vector e utilização deste ADN de ORF2 de PCV2 excisado para a sua clonagem no vector de transferência. Como com os outros métodos, antes da recuperação da proteína de ORF2 recombinante do sobrenadante, prefere-se esperar durante, pelo menos, 5 dias após infecção das células pelo baculovírus transfectado. De um modo preferido, a etapa de recuperação deste método também inclui a etapa de separação dos meios das células e detritos celulares. Esta pode ser feita numa variedade de modos mas, para facilidade e conveniência, prefere-se filtrar as células, detritos celulares e meios de crescimento através de um filtro tendo poros variando em tamanho entre cerca de 0,45 μ M a cerca de 1,0 μ M. Finalmente, para este método, antes da combinação da proteína de ORF2 recombinante de PCV2 recuperada numa composição, prefere-se incluir uma etapa de inactivação de vírus. Esta pode ser feita numa variedade de modos mas prefere-se, na prática da presente invenção, utilizar BEI.

Deste modo, de acordo com um aspecto adicional, este método compreende as etapas: **i)** amplificação de ADN de ORF2 de PCV2

in vitro, em que as sequências flanqueadoras do referido ADN de ORF2 de PCV2 são modificadas, **ii)** clonagem do ADN de ORF2 de PCV2 amplificado num vector de transferência; e **iii)** transfecção do vector de transferência ou uma sua porção contendo o ADN de ORF2 recombinante de PCV2 num vector viral, para produzir o vector viral recombinante, **iv)** infecção das células em meios com o vírus transfectado; **v)** fazer com que o vírus transfectado expresse a proteína recombinante da ORF2 de PCV2; **vi)** separação das células do sobrenadante; **vii)** recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante; **viii)** inactivação do vector viral recombinante, de um modo preferido, na presença de cerca de 1 a cerca de 20 mM de BEI, de um modo muito preferido, na presença de cerca de 5 mM de BEI; **ix)** adição de uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inactivação na solução, de um modo preferido, adição de uma solução de tiosulfato de sódio para uma concentração final de cerca de 1 a cerca de 20 mM, de um modo preferido, de cerca de 5 mM, quando o agente de inactivação é BEI e **x)** adição de uma quantidade adequada de um adjuvante, de um modo preferido, adição de Carbopol, de um modo mais preferido, Carbopol 971P, de um modo ainda mais preferido, em quantidades como descritas acima (e. g., de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e, de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 1 mg por dose).

Além disso, a composição pode incluir um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis. Como aqui utilizado, "um veículo farmacêuticamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes da adsorção e

semelhantes. De um modo muito preferido, a composição aqui proporcionada contém proteína de ORF2 de PCV2 recuperada do sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, em que as referidas células foram infectadas com um vector viral recombinante contendo ADN de ORF2 de PCV2 e expressão da proteína de ORF2 de PCV2 e, em que a referida cultura celular foi tratada com cerca de 2 a cerca de 8 mM de BEI, de um modo preferido, com cerca de 5 mM de BEI, para inactivar o vector viral e uma concentração equivalente de um agente de neutralização, de um modo preferido, solução de tiosulfato de sódio para uma concentração final de cerca de 2 a cerca de 8 mM, de um modo preferido, de cerca de 5 mM de Carbopol, de um modo mais preferido, Carbopol 971P, de um modo preferido, em quantidades de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e, de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 1 mg por dose e solução salina fisiológica, de um modo preferido, numa quantidade de cerca de 50 a cerca de 90% (v/v), de um modo mais preferido, a cerca de 60 a 80% (v/v), de um modo ainda mais preferido, de cerca de 70% (v/v).

Deste modo, um aspecto adicional refere-se a um método para a preparação de uma composição antigénica, tal como, por exemplo, uma vacina, para provocar uma resposta imunitária contra PCV2, compreendendo as etapas: **i)** amplificação de ADN de ORF2 de PCV2 *in vitro*, em que as sequências flanqueadoras do referido ADN de ORF2 de PCV2 são modificadas, **ii)** clonagem do ADN de ORF2 de PCV2 amplificado num vector de transferência; e **iii)** transfecção do vector de transferência ou uma sua porção contendo o ADN de ORF2 recombinante de PCV2 num vector viral, para produzir o vector viral recombinante, **iv)** infecção das células em meios com o vírus transfectado; **v)** fazer com que o

vírus transfectado expresse a proteína recombinante de ORF2 de PCV2; **vi)** separação das células do sobrenadante; **vii)** recuperação da proteína de ORF2 de PCV2 expressa do sobrenadante; **viii)** inactivação do vector viral recombinante, de um modo preferido, na presença de cerca de 2 a cerca de 20 mM de BEI, de um modo muito preferido, na presença de cerca de 5 mM de BEI; **ix)** adição de uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inactivação na solução, de um modo preferido, adição de uma solução de tiosulfato de sódio para uma concentração final de cerca de 0,5 a cerca de 20 mM, de um modo preferido, de cerca de 5 mM, quando o agente de inactivação é BEI, **x)** adição de uma quantidade adequada de um adjuvante, de um modo preferido, adição de Carbopol, de um modo mais preferido, Carbopol 971P, de um modo ainda mais preferido, em quantidades como descritas acima (e. g., de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e, de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 1 mg por dose); e **xi)** adição de uma solução salina fisiológica, de um modo preferido, numa quantidade de cerca de 50 a cerca de 90% (v/v), de um modo mais preferido, de cerca de 60 a 80% (v/v), de um modo ainda mais preferido, de cerca de 70% (v/v). Opcionalmente, este método também pode incluir a adição de um conservante. Um conservante, como aqui utilizado, refere-se a um agente activo anti-microbiológico, tais como, por exemplo, Gentamicina, Mertiolo e semelhantes. Em particular, a adição de um conservante é muito preferida para a preparação de uma composição multidoses. Os agentes activos anti-microbiológicos são adicionados em concentrações eficazes para impedirem a composição de interesse de qualquer contaminação microbiológica ou para inibição de qualquer crescimento microbiológico na composição de interesse.

Além disso, este método também pode compreender a adição de qualquer agente estabilizante, tais como, por exemplo, sacáridos, trealose, manitol, sacarose e semelhantes, para aumentar e/ou manter a estabilidade em armazenamento do produto. Contudo, foi, surpreendentemente, verificado, que a formulação resultante é imunologicamente eficaz ao longo de um período de, pelo menos, 24 meses, sem adição de qualquer agente estabilizante adicional.

Um aspecto adicional da presente divulgação refere-se aos produtos resultantes dos métodos como descritos acima. Em particular, a presente divulgação refere-se a uma composição de matéria compreendendo proteína de ORF2 de PCV2 recombinantemente expressa. Além disso, a presente divulgação também se refere a uma composição de matéria que compreende proteína de ORF2 de PCV2 recombinantemente expressa, recuperada do sobrenadante de uma cultura celular de insecto. Além disso, a presente divulgação também se refere a uma composição de matéria compreendendo proteína de ORF2 de PCV2 recombinantemente expressa, recuperada do sobrenadante de uma cultura celular de insecto. De um modo preferido, esta composição de matéria também compreende um agente adequado para a inactivação de vectores virais. De um modo preferido, o referido agente de inactivação é BEI. Além disso, a presente divulgação também se refere a uma composição de matéria que compreende proteína de ORF2 de PCV2 recombinantemente expressa, recuperada do sobrenadante de uma cultura celular de insecto e compreende um agente, adequado para a inactivação de vectores virais, de um modo preferido, BEI, e um agente de neutralização para neutralização do agente de inactivação. De um modo preferido, quando a BEI é utilizada como

um agente de inactivação, esse agente de neutralização é o tiossulfato de sódio.

Ainda noutro aspecto da presente divulgação, é proporcionada uma composição imunogénica que induz uma resposta imunitária e, de um modo mais preferido, confere imunidade protectora contra os sinais clínicos de infecção de PCV2. A composição compreende, em geral, o polipéptido ou um seu fragmento, expresso pela Fase de Leitura Aberta 2 (ORF2) de PCV2, como o componente antigénico da composição.

ADN e proteína de ORF2 de PCV2, como aqui utilizados para a preparação das composições e também como utilizados nos processos aqui proporcionados, é um domínio altamente conservado em isolados de PCV2 e, desse modo, qualquer ORF2 de PCV2 seria eficaz como a fonte do ADN e/ou polipéptido de ORF2 de PCV2, como aqui utilizada. Uma proteína de ORF2 de PCV2 preferida é a da SEQ ID N.º: 11. Um polipéptido de ORF2 de PCV preferido é aqui proporcionado como SEQ ID N.º: 5, mas é compreendido pelos especialistas na técnica que esta sequência poderia variar tanto como 6-10% em homologia de sequência e ainda reter as características antigénicas que a tornam útil em composições imunogénicas. As características antigénicas de uma composição imunológica podem ser, por exemplo, estimadas pela experiência de estímulo, como proporcionada pelo Exemplo 4. Além disso, a característica antigénica de um antígeno modificado é ainda retida quando o antígeno modificado confere, pelo menos, 70%, de um modo preferido, 80%, de um modo mais preferido, 90% da imunidade protectora, em comparação com a proteína de ORF2 de PCV2, codificada pela sequência polinucleotídica da SEQ ID N.º: 3 ou SEQ ID N.º: 4. Uma "composição imunogénica", como aqui utilizada, significa uma proteína de ORF2 de PCV2, a qual deduz

uma "resposta imunológica" no hospedeiro de uma resposta imunitária de mediação celular e/ou de anticorpo para a proteína de ORF2 de PCV2. De um modo preferido, esta composição imunogénica é capaz de conferir imunidade protectora contra infecção de PCV2 e os sinais clínicos que lhe estão associados. Em algumas formas, as porções imunogénicas da proteína de ORF2 de PCV2 são utilizadas como o componente antigénico na composição. A expressão "porção imunogénica", como aqui utilizada, refere-se a formas truncadas e/ou substituídas ou fragmentos de proteína e/ou polinucleótido de ORF2 de PCV2, respectivamente. De um modo preferido, essas formas truncadas e/ou substituídas ou fragmentos compreenderão, pelo menos, 6 aminoácidos contíguos do polipéptido de ORF2 de comprimento completo. De um modo mais preferido, as formas truncadas ou substituídas ou fragmentos terão, pelo menos, 10, de um modo mais preferido, pelo menos, 15 e, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 19 aminoácidos contíguos do polipéptido de ORF2 de comprimento completo. A este respeito, duas sequências preferidas são aqui proporcionadas como SEQ ID N°: 9 e 10. É ainda compreendido que essas sequências podem ser uma parte de fragmentos maiores ou formas truncadas. Um polipéptido de ORF2 de PCV2 preferido adicional aqui proporcionado é codificado pela sequência nucleotídica da SEQ ID N°: 3 ou SEQ ID N°: 4. Mas é compreendido pelos especialistas na técnica, que esta sequência poderia variar tanto quanto 6-20% em homologia de sequência e ainda reter as características antigénicas que a tornam útil em composições imunogénicas. Em algumas formas, uma forma truncada ou substituída ou fragmento de ORF2 é utilizado como o componente antigénico na composição. De um modo preferido, essas formas truncadas ou substituídas ou fragmentos compreenderão, pelo menos, 18 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica de ORF2 de comprimento completo,

e. g., da SEQ ID N°: 3 ou SEQ ID N°: 4. De um modo mais preferido, as formas truncadas ou substituídas ou fragmentos terão, pelo menos, 30, de um modo mais preferido, pelo menos, 45 e, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 57 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica de ORF2 de comprimento completo, e. g., SEQ ID N°: 3 ou SEQ ID N°: 4.

"Identidade de sequência", como é conhecida na técnica, refere-se a uma relação entre duas ou mais sequências polipeptídicas ou duas ou mais sequências polinucleotídicas, nomeadamente uma sequência de referência e uma dada sequência a ser comparada com a sequência de referência. A identidade de sequência é determinada pela comparação da sequência dada à sequência de referência, depois de as sequências terem sido alinhadas de um modo óptimo, para produzir o grau mais elevado de semelhança de sequência, como determinado pela correspondência entre segmentos dessas sequências. Após esse alinhamento, a identidade de sequência é averiguada numa base de posição-a-posição, e. g., as sequências são "idênticas" numa posição particular se, nessa posição, os nucleótidos ou resíduos de aminoácidos forem idênticos. O número total dessas identidades de posição é, depois, dividido pelo número total de nucleótidos ou resíduos na sequência de referência, para dar a % de identidade de sequência. A identidade de sequência pode ser facilmente calculada por métodos conhecidos, incluindo mas não limitados aos descritos em *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nova Iorque (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nova Iorque (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A.M. e Griffin, H. G., ed., Humana Press, Nova Jérсия (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence*

Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., ed., M. Stockton Press, Nova Iorque (1991); e Carillo, H. e Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Os métodos preferidos para determinar a identidade de sequência são concebidos para darem a maior correspondência entre as sequências testadas. Os métodos para determinar a identidade de sequência estão codificados em programas de computador publicamente disponíveis, que determinam a identidade de sequência entre sequências dadas. Os exemplos desses programas incluem mas não estão limitados ao pacote de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). O programa BLASTX está publicamente disponível a partir da NCBI e outras fontes (*BLAST Manual*, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). Estes programas alinham sequências de um modo óptimo, utilizando as ponderações de lacuna predefinidas, de modo a produzir o nível mais elevado de identidade de sequência entre as sequências dada e de referência. Como uma ilustração, por um polinucleótido tendo uma sequência nucleotídica tendo, pelo menos, por exemplo, 85%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95% de "identidade de sequência" com uma sequência nucleotídica de referência, pretende-se que a sequência nucleotídica do polinucleótido dado seja idêntica à sequência de referência, excepto que a sequência polinucleotídica dada pode incluir até 15, de um modo preferido, até 10, de um modo ainda mais preferido, até 5 mutações pontuais por cada 100 nucleótidos da sequência nucleotídica de referência. Por outras palavras, num polinucleótido tendo uma sequência nucleotídica tendo, pelo menos, 85%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95% de identidade relativamente à sequência nucleotídica de referência,

até 15%, de um modo preferido, 10%, de um modo ainda mais preferido, 5% dos nucleótidos na sequência de referência podem ser deleccionados ou substituídos com outro nucleótido, ou um número de nucleótidos até 15%, de um modo preferido, 10%, de um modo ainda mais preferido, 5% dos nucleótidos totais na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência. Estas mutações da sequência de referência podem ocorrer nas posições 5' ou 3' terminais da sequência nucleotídica de referência ou em qualquer parte entre essas posições terminais, interdispersas individualmente entre nucleótidos na sequência de referência ou num ou mais grupos contíguos na sequência de referência. De um modo análogo, por um polipéptido tendo uma dada sequência de aminoácidos tendo, pelo menos, por exemplo, 85%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de referência, pretende-se que a dada sequência de aminoácidos do polipéptido seja idêntica à sequência de referência, excepto que a dada sequência polipeptídica pode incluir até 15, de um modo preferido, até 10, de um modo ainda mais preferido, até 5 alterações de aminoácido por cada 100 aminoácidos da sequência de aminoácidos de referência. Por outras palavras, para se obter uma dada sequência polipeptídica tendo, pelo menos, 85%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de referência, até 15%, de um modo preferido, até 10%, de um modo ainda mais preferido, até 5% dos resíduos de aminoácido na sequência de referência podem ser deleccionados ou substituídos com outro aminoácido, ou um número de aminoácidos até 15%, de um modo preferido, até 10%, de um modo ainda mais preferido, até 5% do número total de resíduos de aminoácido na sequência de referência pode ser inserido na sequência de referência. Estas

alterações da sequência de referência podem ocorrer nas posições amino ou carboxilo terminais da sequência de aminoácidos de referência ou em qualquer parte entre essas posições terminais, interdispersas individualmente entre resíduos na sequência de referência, ou no um ou mais grupos contíguos na sequência de referência. De um modo preferido, as posições de resíduos que não são idênticas, diferem em substituições conservativas de aminoácidos. Contudo, quando se determina a identidade de sequência, as substituições conservativas não são incluídas como uma correspondência.

A "homologia de sequência", como aqui utilizada, refere-se a um método de determinação do parentesco de duas sequências. Para determinar a homologia de sequência, duas ou mais sequências são alinhadas de modo óptimo e, se necessário, são introduzidas lacunas. Contudo, em contraste com a "identidade de sequência", quando se determina a homologia de sequência, as substituições conservativas de aminoácidos são contadas como uma correspondência. Por outras palavras, para se obter um polipéptido ou polinucleótido tendo 95% de homologia de sequência com uma sequência de referência, 85%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95% dos resíduos de aminoácido ou nucleótidos na sequência de referência devem corresponder ou compreender uma substituição conservativa com outro aminoácido ou nucleótido, ou um número de aminoácidos ou nucleótidos até 15%, de um modo preferido, até 10%, de um modo ainda mais preferido, até 5% dos resíduos de aminoácido ou nucleótidos totais, não incluindo substituições conservativas, na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência. De um modo preferido, a sequência homóloga compreende, pelo menos, um segmento de 50, de um modo ainda mais

preferido, de 100, de um modo ainda mais preferido, de 250, de um modo ainda mais preferido, de 500 nucleótidos.

Uma "substituição conservativa" refere-se à substituição de um resíduo de aminoácido ou nucleótido com outro resíduo de aminoácido ou nucleótido tendo características ou propriedades semelhantes, incluindo tamanho, hidrofobicidade, etc., de modo que a funcionalidade global não se altere significativamente.

"Isolado" significa alterado "pela mão do homem" do seu estado natural, *i. e.*, se ocorre na natureza, foi alterado ou removido do seu ambiente original ou ambos. Por exemplo, um polinucleótido ou polipéptido naturalmente presente num organismo vivo não está "isolado", mas o mesmo polinucleótido ou polipéptido separado dos materiais coexistentes do seu estado natural está "isolado", como o termo é aqui empregue.

Deste modo, um aspecto adicional da presente divulgação refere-se a uma composição imunogénica eficaz para atenuar a gravidade dos sintomas clínicos associados a infecção de PCV2, compreendendo proteína de ORF2 de PCV2. De um modo preferido, a proteína de ORF2 de PCV2 é qualquer uma das descritas acima. De um modo preferido, a referida proteína de ORF2 de PCV2 é

- i)** um polipéptido compreendendo a sequência de SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 11;
- ii)** qualquer polipéptido que seja, pelo menos, 80% homólogo ao polipéptido de i),

- iii)** qualquer porção imunogénica dos polipéptidos de i) e/ou ii)
- iv)** a porção imunogénica de iii), compreendendo, pelo menos, 10 aminoácidos contíguos incluídos nas sequências de SEQ ID N^o: 5, SEQ ID N^o: 6, SEQ ID N^o: 9, SEQ ID N^o: 10 ou SEQ ID N^o: 11,
- v)** um polipéptido que é codificado por um ADN compreendendo a sequência de SEQ ID N^o: 3 ou SEQ ID N^o: 4.
- vi)** qualquer polipéptido que é codificado por um polinucleótido que é, pelo menos, 80% homólogo ao polinucleótido de v),
- vii)** qualquer porção imunogénica dos polipéptidos codificados pelo polinucleótido de v) e/ou vi)
- viii)** a porção imunogénica de vii), em que o polinucleótido codificando para a referida porção imunogénica compreende, pelo menos, 30 nucleótidos contíguos incluídos nas sequências de SEQ ID N^o: 3 ou SEQ ID N^o: 4.

De um modo preferido, qualquer dessas porções imunogénicas tendo as características imunogénicas da proteína de ORF2 de PCV2 é codificada pela sequência de SEQ ID N^o: 3 ou SEQ ID N^o: 4.

De acordo com um aspecto adicional, a proteína de ORF2 de PCV2 é proporcionada na composição imunológica a um nível de

inclusão de antígeno eficaz para indução da resposta imunitária desejada, nomeadamente, redução da incidência ou atenuação da gravidade dos sinais clínicos resultando de infecção de PCV2. De um modo preferido, o nível de inclusão de proteína de ORF2 de PCV2 é, pelo menos, 0,2 µg de antígeno/mL da composição imunogénica final (µg/mL), de um modo mais preferido, desde cerca 0,2 a cerca de 400 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,3 a cerca de 200 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,35 a cerca de 100 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,4 a cerca de 50 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,45 a cerca de 30 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,6 a cerca de 15 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,75 a cerca de 8 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 1,0 a cerca de 6 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 1,3 a cerca de 3,0 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 1,4 a cerca de 2,5 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 1,5 a cerca de 2,0 µg/mL e, de um modo muito preferido, cerca de 1,6 µg/mL.

De acordo com um aspecto adicional, o nível de inclusão de antígeno de ORF2 é, pelo menos, 0,2 µg de proteína de ORF2 de PCV2, como descrito acima, por dose da composição antigénica final (µg/dose), de um modo mais preferido, desde cerca 0,2 a cerca de 400 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,3 a cerca de 200 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,35 a cerca de 100 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,4 a cerca de 50 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,45 a cerca de 30 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,6 a cerca de 15 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 0,75 a cerca de 8 µg/dose, de um modo ainda mais

preferido, desde cerca 1,0 a cerca de 6 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 1,3 a cerca de 3,0 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 1,4 a cerca de 2,5 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca 1,5 a cerca de 2,0 µg/dose e, de um modo muito preferido, cerca de 1,6 µg/dose.

O polipéptido de ORF2 de PCV2 utilizado numa composição imunogénica de acordo com a presente divulgação pode ser derivado em qualquer modo, incluindo isolamento e purificação da ORF2 de PCV2, síntese proteica corrente e metodologia recombinante. Os métodos preferidos para obtenção de polipéptido de ORF2 de PCV2 são aqui descritos acima e também são proporcionados no Pedido de Patente U.S. com o N° de Série 11/034797. Resumidamente, as células susceptíveis são infectadas com um vector viral recombinante contendo sequências codificantes de ADN de ORF2 de PCV2, o polipéptido de ORF2 de PCV2 é expresso pelo vírus recombinante e o polipéptido de ORF2 de PCV2 expresso é recuperado do sobrenadante por filtração e inativado por qualquer método convencional, de um modo preferido, utilizando etilenimina binária, a qual é, depois, neutralizada, para parar o processo de inactivação.

Deste modo, de acordo com um aspecto adicional, a composição imunogénica compreende **i)** qualquer da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima e **ii)**, pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, de um modo preferido, de um baculovírus recombinante. Além disso, de acordo com um aspecto adicional, a composição imunogénica compreende **i)** qualquer da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima,

ii) pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, de um modo preferido, de um baculovírus recombinante e **iii)** uma porção do sobrenadante de cultura celular.

De acordo com uma forma de realização específica do processo de produção e recuperação para a proteína de ORF2 de PCV2, o sobrenadante de cultura celular é filtrado através de uma membrana tendo um tamanho de poro, de um modo preferido, entre cerca de 0,45 a 1 μm . Deste modo, um aspecto adicional refere-se a uma composição imunogénica que compreende **i)** qualquer da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, **ii)** pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, de um modo preferido, de um baculovírus recombinante e **iii)** uma porção da cultura celular; em que cerca de 90% dos componentes têm um tamanho inferior a 1 μm .

De acordo com um aspecto adicional, a presente divulgação refere-se a uma composição imunogénica que compreende **i)** qualquer da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, **ii)** pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, **iii)** uma porção da cultura celular **iv)** e agente de inactivação para inactivar o vector viral recombinante, de um modo preferido, BEI, em que cerca de 90% dos componentes i) até iii) têm um tamanho inferior a 1 μm . De um modo preferido, a BEI está presente em concentrações eficazes para inactivar o baculovírus. As concentrações eficazes são descritas acima.

De acordo com um aspecto adicional, a presente divulgação refere-se a uma composição imunogénica que compreende **i)** qualquer da proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, **ii)**, pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, **iii)** uma porção da cultura celular, **iv)** um agente de inactivação para inactivar o vector viral recombinante, de um modo preferido, BEI e **v)** um agente de neutralização para parar a inactivação mediada pelo agente de inactivação, em que cerca de 90% dos componentes i) até iii) têm um tamanho inferior a 1 µm. De um modo preferido, se o agente de inactivação for BEI, a referida composição compreende tiossulfato de sódio em quantidades equivalentes a BEI.

O polipéptido está incorporado numa composição que pode ser administrada a um animal susceptível a infecção de PCV2. Em formas preferidas, a composição também pode incluir componentes adicionais conhecidos dos especialistas na técnica (ver, também, Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18ª ed. Mack Publ., Easton). Além disso, a composição pode incluir um ou mais veículos veterinariamente aceitáveis. Como aqui utilizado, "um veículo veterinariamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, adjuvantes, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes da adsorção e semelhantes.

Numa forma de realização preferida, a composição imunogénica compreende a proteína de ORF2 de PCV2, como aqui proporcionada, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, como um componente antigénico, misturado com um

adjuvante, de um modo preferido, Carbopol e solução salina fisiológica.

Os especialistas na técnica compreenderão que a composição aqui pode incorporar soluções estéreis injectáveis, fisiologicamente aceitáveis, conhecidas. Para a preparação de uma solução pronta a utilizar para injeção parentérica ou infusão, estão facilmente disponíveis soluções isotónicas aquosas, tais como, e. g., soluções salinas ou proteicas plasmáticas correspondentes. Além disso, as composições imunogénicas e vacinais da presente invenção, podem incluir diluentes, agentes isotónicos, estabilizantes ou adjuvantes. Os diluentes podem incluir água, solução salina, dextrose, etanol, glicerol e semelhantes. Os agentes isotónicos podem incluir, entre outros, cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose. Os estabilizantes incluem albumina e sais de álcali de ácido etilenodiaminotetracético, entre outros. Os adjuvantes adequados são os descritos acima. É muito preferida a utilização de Carbopol, em particular, a utilização de Carbopol 971P, de um modo preferido, em quantidades como descritas acima (e. g., de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e, de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 1 mg por dose).

Deste modo, a presente divulgação também se refere a uma composição imunogénica que compreende **i)** qualquer das proteínas de ORF2 de PCV2 descritas acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, **II)** pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, **iii)** uma porção da cultura celular, **iv)** um agente de inactivação para inactivar o vector viral recombinante, de um modo

preferido, BEI e **v)** um agente de neutralização para parar a inativação mediada pelo agente de inativação, de um modo preferido, tiosulfato de sódio, em quantidades equivalentes a BEI; e **vi)** um adjuvante adequado, de um modo preferido, Carbopol 971, em quantidades descritas acima; em que cerca de 90% dos componentes i) a iii) têm um tamanho inferior a 1 μ m. De acordo com um aspecto adicional, esta composição imunogénica compreende ainda um sal farmacêutico aceitável, de um modo preferido, um sal de fosfato, em concentrações fisiologicamente aceitáveis. De um modo preferido, o pH da referida composição imunogénica é ajustado para um pH fisiológico, significando entre cerca de 6,5 e 7,5.

Deste modo, a presente divulgação também se refere a uma composição imunogénica, compreende, por um mL, **i)** pelo menos, 1,6 μ g de proteína de ORF2 de PCV2 descrita acima, **ii)** pelo menos, uma porção de baculovírus expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2 **iii)** uma porção da cultura celular, **iv)** cerca de 2 a 8 mM de BEI, **v)** tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes a BEI; e **vi)** cerca de 1 mg de Carbopol 971 e **vii)** sal de fosfato numa concentração fisiologicamente aceitável; em que cerca de 90% dos componentes i) a iii) têm um tamanho inferior a 1 μ m e o pH da referida composição imunogénica é ajustado para cerca de 6,5 a 7,5.

As composições imunogénicas podem ainda incluir um ou mais outros agentes imunomoduladores, tais como, e. g., interleucinas, interferões ou outras citocinas. As composições imunogénicas também podem incluir Gentamicina e Mertiolato. Embora as quantidades e concentrações de adjuvantes e aditivos úteis no contexto da presente invenção possam ser facilmente determinadas pelo especialista na técnica, a presente divulgação

contempla composições compreendendo desde cerca de 50 µg a cerca de 2000 µg de adjuvante e, de um modo preferido, cerca de 250 µg/mL de dose da composição vacinal. Noutra forma de realização preferida, a presente divulgação contempla composições vacinais compreendendo desde cerca de 1 µg/mL a cerca de 60 µg/mL de antibióticos e, de um modo mais preferido, menos de cerca de 30 µg/mL de antibióticos.

Deste modo, a presente divulgação também se refere a uma composição imunogénica que compreende **i)** qualquer das proteínas de ORF2 de PCV2 descritas acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, **ii)**, pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína de ORF2 de PCV2, **iii)** uma porção da cultura celular, **iv)** um agente de inactivação para inactivar o vector viral recombinante, de um modo preferido, BEI e **v)** um agente de neutralização para parar a inactivação mediada pelo agente de inactivação, de um modo preferido, tiosulfato de sódio, em quantidades equivalentes a BEI; **vi)** um adjuvante adequado, de um modo preferido, Carbopol 971, em quantidades descritas acima; **vii)** uma concentração farmacêutica aceitável de um tampão de solução salina, de um modo preferido, de um sal de fosfato e **viii)** um agente anti-microbiológico activo; em que cerca de 90% dos componentes i) até iii) têm um tamanho inferior a 1 µm.

Foi verificado, surpreendentemente, que a composição imunogénica proporcionada aqui compreendida foi altamente estável ao longo de um período de 24 meses. Também foi verificado que as composições imunogénicas aqui proporcionadas, compreendendo proteína de ORF2 de PCV2 recombinante, expressa por baculovírus, como aqui proporcionada, são muito eficazes na redução dos sintomas clínicos associados a infecções de PCV2.

Foi verificado, surpreendentemente, que as composições imunogénicas, compreendendo a proteína de ORF2 de PCV2 recombinante expressa por baculovírus como aqui proporcionada, são mais eficazes do que uma composição imunogénica compreendendo o vírus PCV2 intacto numa forma inactivada ou antigénio de ORF2 de PCV2 viral isolado. Em particular, foi verificado, surpreendentemente, que a proteína de ORF2 de PCV2 recombinante expressa por baculovírus é eficaz em concentrações muito baixas, o que significa em concentrações até 0,25 µg/dose. Este inesperado elevado potencial imunogénico da proteína de ORF2 de PCV2 poderia ser ainda aumentado pela adição de Carbopol.

Um aspecto adicional refere-se a um recipiente, que compreende, pelo menos, uma dose da composição imunogénica de proteína de ORF2 de PCV2, como aqui proporcionada, em que uma dose compreende, pelo menos, 2 µg de proteína de ORF2 de PCV2, de um modo preferido, 2 a 16 µg de proteína de ORF2 de PCV2. O referido recipiente pode compreender 1 a 250 doses da composição imunogénica, de um modo preferido, contém 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ou 250 doses da composição imunogénica de proteína de ORF2 de PCV2. De um modo preferido, cada dos recipientes compreendendo mais do que uma dose da composição imunogénica de proteína de ORF2 de PCV2 compreende ainda um agente activo anti-microbiológico. Esses agentes são, por exemplo, antibióticos, incluindo Gentamicina e Mertiolato e semelhantes. Deste modo, um aspecto da presente divulgação refere-se a um recipiente que compreende 1 a 250 doses da composição imunogénica de proteína de ORF2 de PCV2, em que uma dose compreende, pelo menos, 2 µg de proteína de ORF2 de PCV2 e Gentamicina e/ou Mertiolato, de um modo preferido, de cerca de

1 µg/mL a cerca de 60 µg/mL de antibióticos e, de um modo mais preferido, inferior a cerca de 30 µg/mL.

Um aspecto adicional refere-se a um kit, compreendendo qualquer dos recipientes descritos acima e um manual de instruções, incluindo a informação para a aplicação intramuscular de, pelo menos, uma dose da composição imunogénica de proteína de ORF2 de PCV2 em leitões, para atenuar a gravidade dos sintomas clínicos associados a infecção de PCV2. Além disso, de acordo com um aspecto adicional, o referido manual de instruções compreende a informação de uma segunda administração ou administração(ções) adicional(ais) de, pelo menos, uma dose da composição imunogénica de ORF2 de PCV2, em que a segunda administração ou qualquer administração adicional é, pelo menos, 14 dias para além da administração inicial ou qualquer administração anterior. De um modo preferido, o referido manual de instruções também inclui a informação para administrar um estimulante imunitário. De um modo preferido, o referido estimulante imunitário deve ser dado, pelo menos, duas vezes. De um modo preferido, pelo menos, 3, de um modo mais preferido, pelo menos, 5, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 7 dias estão entre a primeira e a segunda administração ou qualquer administração adicional do estimulante imunitário. De um modo preferido, o estimulante imunitário é dado, pelo menos, 10 dias, de um modo preferido, 15, de um modo ainda mais preferido, 20, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 22 dias para além da administração inicial da composição imunogénica da proteína de ORF2 de PCV2. Um estimulante imunitário preferido é, por exemplo, a hemocianina da lapa californiana (KLH), ainda de um modo preferido, emulsionado com adjuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA). Contudo, é aqui compreendido que também pode ser utilizado qualquer outro

estimulante imunitário conhecido de um especialista na técnica. "Estimulante imunitário", como aqui utilizado, significa qualquer agente ou composição que pode provocar a resposta imunitária, de um modo preferido, sem iniciar ou aumentar uma resposta imunitária específica, por exemplo, a resposta imunitária contra um patógeno específico. É ainda instruído administrar o estimulante imunitário numa dose adequada. Além disso, o kit também pode compreender um recipiente, incluindo, pelo menos, uma dose do estimulante imunitário, de um modo preferido, uma dose de KLH ou KLH/ICFA.

Além disso, também foi verificado, surpreendentemente, que o potencial imunogénico das composições imunogénicas compreendendo proteína de ORF2 de PCV2 expressa em baculovírus recombinante, de um modo preferido, em combinação com Carbopol, pode ser ainda melhorado pela administração da vacina IngelVac PRRS MLV (ver o Exemplo 5). Os sinais clínicos e manifestações de doença de PCV2 são bastante aumentados quando a infecção de PRRS está presente. Contudo, as composições imunogénicas e estratégias de vacinação, como aqui proporcionadas, atenuaram bastante este efeito e mais do que o esperado. Por outras palavras, foi observado um efeito sinérgico inesperado quando animais, de um modo preferido, porcos, são tratados com qualquer composição imunogénica de ORF2 de PCV2, como aqui proporcionada, e a vacina Ingelvac PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

Deste modo, um aspecto adicional da presente invenção refere-se a um kit, como descrito acima, compreendendo a composição imunogénica de ORF2 de PCV2, como aqui proporcionada, e o manual de instruções, em que o manual de instruções inclui ainda a informação para administrar a composição imunogénica de ORF2 de PCV2, juntamente com composição imunogénica que

compreende antigénio de PRRS, de um modo preferido, com antigénio de PRRS com adjuvante. De um modo preferido, o antigénio de PRRS é IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

Um aspecto adicional da presente invenção também se refere a um kit compreendendo **i)** um recipiente contendo, pelo menos, uma dose de uma composição imunogénica de ORF2 de PCV2, como aqui proporcionada, e **ii)** um recipiente contendo uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PRRS, de um modo preferido, antigénio de PRRS com adjuvante. De um modo preferido, o antigénio de PRRS é IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). De um modo mais preferido, o kit compreende, ainda, um manual de instruções, incluindo a informação para administrar ambas as composições farmacêuticas. De um modo preferido, contém a informação de que a composição contendo ORF2 de PCV2 é administrada, de um modo temporal, antes da composição contendo PRRS.

Um aspecto adicional refere-se à utilização de qualquer das composições aqui proporcionadas como um medicamento, de um modo preferido, como um medicamento veterinário, de um modo ainda mais preferido, como uma vacina. Além disso, a presente divulgação também se refere à utilização de qualquer das composições aqui descritas, para a preparação de um medicamento para atenuar a gravidade dos sintomas clínicos associados a infecção de PCV2. De um modo preferido, o medicamento é para a prevenção de uma infecção de PCV2, de um modo ainda mais preferido, em leitões.

Um aspecto adicional refere-se a um método para **(i)** a prevenção de uma infecção ou reinfeção com PCV2 ou **(ii)** a redução ou eliminação de sintomas clínicos causados por PCV2 num

indivíduo, compreendendo a administração de qualquer das composições imunogénicas aqui proporcionadas a um indivíduo que delas necessita. De um modo preferido, o indivíduo é um porco. De um modo preferido, a composição imunogénica é administrada intramuscular. De um modo preferido, é/são administrada/s uma dose ou duas doses da composição imunogénica, em que uma dose, de um modo preferido, compreende, pelo menos, cerca de 2 µg de proteína de ORF2 de PCV2, de um modo ainda mais preferido, cerca de 2 a cerca de 16 µg e, pelo menos, cerca de 0,1 a cerca de 5 mg de Carbopol, de um modo preferido, cerca de 1 mg de Carbopol. Um aspecto adicional refere-se ao método de tratamento, como descrito acima, em que é administrada uma segunda aplicação da composição imunogénica. De um modo preferido, a segunda administração é feita com a mesma composição imunogénica, de um modo preferido, tendo a mesma quantidade de proteína de ORF2 de PCV2. De um modo preferido, a segunda administração também é dada intramuscular. De um modo preferido, a segunda administração é feita, pelo menos, 14 dias para além da administração inicial, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 4 semanas para além da administração inicial.

De acordo com aspecto adicional, o método de tratamento também compreende a administração de um estimulante imunitário. De um modo preferido, o referido estimulante imunitário é administrado, pelo menos, duas vezes. De um modo preferido, pelo menos, 3, de um modo mais preferido, pelo menos, 5 dias, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 7 dias estão entre a primeira e a segunda administração do estimulante imunitário. De um modo preferido, o estimulante imunitário é administrado, pelo menos, 10 dias, de um modo preferido, 15, de um modo ainda mais preferido, 20, de um modo ainda mais preferido, pelo menos,

22 dias para além da administração inicial da composição imunogénica de ORF2 de PCV2. Um estimulante imunitário preferido é, por exemplo, a hemocianina da lapa californiana (KLH), ainda de um modo preferido, emulsionado com adjuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA). Contudo, é aqui compreendido que também pode ser utilizado qualquer outro estimulante imunitário conhecido de um especialista na técnica. Está dentro do conhecimento geral de um especialista na técnica administrar o estimulante imunitário numa dose adequada.

De acordo com um aspecto adicional, o método de tratamento descrito acima também pode compreender a administração de antigénio de PRRS. De um modo preferido, o antigénio de PRRS é IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). De um modo preferido, o referido antigénio de PRRS é administrado, temporalmente, para além da administração da composição imunogénica de proteína de ORF2 de PCV2.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um fluxograma esquemático de uma construção preferida de baculovírus recombinante de ORF2 de PCV2; e

As Fig. 2a e 2b são um fluxograma esquemático de como produzir uma composição de acordo com a presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

Os seguintes exemplos expõem materiais e processos preferidos de acordo com a presente invenção. Contudo, deve ser

compreendido que estes exemplos são proporcionados apenas a título de ilustração e nenhum deles deve ser considerado como uma limitação do âmbito global da invenção, a qual é definida pelas reivindicações.

EXEMPLO 1

Este exemplo compara os rendimentos relativos de ORF2 utilizando métodos da presente invenção, com métodos que são conhecidos na técnica anterior. Quatro frascos rotativos de 1000 mL foram, cada, semeados com, aproximadamente, $1,0 \times 10^6$ células Sf+/mL em 300 mL de meios de insecto isentos de soro, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). A cultura celular principal é identificada como Stock Celular Principal SF+ (*Spodoptera frugiperda*), passagem 19, Lote N° N112-095W. As células utilizadas para produzir o Stock Celular Principal SF+ foram obtidas da Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. A linha celular SF+ para este exemplo estava confinada entre as passagens 19 e 59. Para fins da presente invenção, outras passagens terão efeito mas, de modo a aumentar a escala do processo para produção de grande escala, serão provavelmente necessárias, pelo menos, 19 passagens e as passagens para além de 59 podem ter um efeito na expressão, embora este não fosse investigado. Em maior detalhe, as culturas celulares SF+ iniciais de armazenamento em azoto líquido foram cultivadas em meios Excell 420 em suspensão em frascos rotativos estéreis, com agitação constante. As culturas foram cultivadas em frascos rotativos de 100 mL a 250 mL, com 25 a 150 mL de meios Excell 420 isentos de soro. Quando as células se multiplicaram a uma densidade celular de $1,0 - 8,0 \times 10^6$ células/mL, foram repartidas em novos recipientes, com uma densidade de plantação

de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/mL. As culturas de expansão subsequentes foram cultivadas em frascos rotativos até 36 litros em tamanho ou em biorreactores de aço inoxidável de até 300 litros, durante um período de 2-7 dias, a 25 - 29 °C.

Após sementeira, os frascos foram incubados, a 27 °C, durante quatro horas. Subsequentemente, cada frasco foi semeado com um baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2 (SEQ ID Nº: 4). O baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2 foi produzido como se segue: o gene de ORF2 de PCV2 de uma estirpe Norte-Americana de PCV2 foi amplificado por PCR para conter uma sequência de Kozak em 5' (SEQ ID Nº: 1) e um sítio EcoR1 em 3' (SEQ ID Nº: 2), clonados no vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Depois, foi subsequentemente excisado e subclonado no vector de transferência pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). A porção subclonada é aqui representada como SEQ ID Nº: 7. O plasmídeo pVL1392 contendo o gene de ORF2 de PCV2 foi designado N47-064Y e, depois, co-transfectado com ADN de baculovírus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) em células de insecto Sf+ (Protein Sciences, Meriden, CT), para produzir o baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2. A nova construção é aqui proporcionada como SEQ ID Nº: 8. O baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2 foi purificado de placa e o Vírus de Sementeira Principal (MSV) foi propagado na linha celular SF+, colocado em alíquota e armazenado a -70 °C. O MSV foi positivamente identificado como baculovírus de ORF2 de PCV2, por PCR-RFLP, utilizando iniciadores específicos de baculovírus. As células de insecto infectadas com baculovírus de ORF2 de PCV2 para produzir MSV ou Vírus de Sementeira de Trabalho expressam antigénio de ORF2 de PCV2, como detectado por soro policlonal ou anticorpos monoclonais num ensaio de anticorpo fluorescente

indirecto. Além disso, a identidade do baculovírus de ORF2 de PCV2 foi confirmada por sequenciação de aminoácido N-terminal. O MSV de baculovírus de ORF2 de PCV2 também foi testado para pureza, de acordo com 9 C.F.R. 11327 (c), 11328 e 11355. Cada baculovírus recombinante semeado nos frascos rotativos teve multiplicidades de infecção (MOI) variáveis. O frasco 1 foi semeado com 7,52 mL de semente de 0,088 MOI; o frasco 2 foi semeado com 3,01 mL de semente de 0,36 MOI; o frasco 3 foi semeado com 1,5 mL de semente de 0,18 MOI; e o frasco 4 foi semeado com 0,75 mL de semente de 0,09 MOI. Um fluxograma esquemático ilustrando as etapas básicas utilizadas para construção de um baculovírus recombinante de ORF2 de PCV2 é aqui proporcionado como Figura 1.

Após serem semeados com o baculovírus, os frascos foram, depois, incubados a 27 ± 2 °C, durante 7 dias e, durante esse tempo, também foram agitados a 100 rpm. Os frascos utilizavam tampas ventiladas para permitir o fluxo de ar. As amostras de cada frasco foram retiradas, de 24 em 24 horas, durante os 7 dias seguintes. Após extração, cada amostra foi centrifugada e o sedimento e o sobrenadante foram separados e, depois, microfiltrados através de uma membrana, com tamanho de poro de 0,45-1,0 μm .

A quantidade de ORF2 presente nas amostras resultantes foi quantificada por meio de ensaio de ELISA. O ensaio de ELISA foi conduzido com o anticorpo de captura Suíno anti-PCV2 Pab IgG Prot. G purificado (diluído 1:250 em PBS), diluído para 1:6000, em tampão de Carbonato a 0,05 M (pH 9,6). Depois, foram colocados 100 μL do anticorpo nos poços da placa de microtitulação, vedada e incubada, de um dia para o outro, a 37 °C. A placa foi, depois, 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, foram adicionados a cada dos poços 250 µL de uma solução de bloqueio (5 g de leite magro Desidratado Carnation (Nestle, Glendale, CA) em 10 mL de D-PBS QS para 100 mL com água destilada). A etapa seguinte foi lavar a placa de teste e, depois, adicionar antigénio pré-diluído. O antigénio pré-diluído foi produzido pela adição de 200 µL de solução de diluente (0,5 mL de Tween 20 em 999,5 mL de D-PBS) a cada dos poços numa placa de diluição. A amostra foi, depois, diluída a uma razão de 1:240 e uma razão de 1:480 e 100 µL de cada destas amostras diluídas foram, depois, adicionados a um dos poços de topo na placa de diluição (*i. e.*, um poço de topo recebeu 100 µL da diluição de 1:240 e o outro recebeu 100 µL da diluição de 1:480). Foram, depois, feitas diluições em série para o resto da placa, pela remoção de 100 µL de cada poço sucessivo e sua transferência para o poço seguinte na placa. Antes de se realizar a transferência seguinte, cada poço foi misturado. A lavagem da placa de teste incluiu a lavagem da placa, três vezes, com o tampão de lavagem. A placa foi, depois, vedada e incubada, durante uma hora, a 37 °C, antes de ser lavada mais três vezes com o tampão de lavagem. O anticorpo de detecção utilizado foi o anticorpo monoclonal para ORF2 de PCV. Foi diluído para 1:300 em solução de diluente e 100 µL do anticorpo de detecção diluído foram, depois, adicionados aos poços. A placa foi, depois, vedada e incubada, durante uma hora, a 37 °C, antes de ser lavada três vezes com o tampão de lavagem. O diluente de conjugado foi, depois, preparado pela adição de soro de coelho normal (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) à solução de diluente para concentração de 1%. O anticorpo anti-murganho de Cabra conjugado (H+1)-HRP (Jackson ImmunoResearch) foi diluído no diluente de

conjugado para 1:10000. Foram, depois, adicionados 100 µL do anticorpo conjugado diluído a cada dos poços. A placa foi, depois, vedada e incubada, durante 45 minutos, a 37 °C, antes de ser lavada três vezes com o tampão de lavagem. Foram adicionados a cada dos poços 100 µL de substrato (Substrato de Peroxidase TMB, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), misturado com um volume igual de Substrato B de Peroxidase (KPL). A placa foi incubada, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Foram, depois, adicionados 100 µL de solução de HCl a 1 N à totalidade dos poços para parar a reacção. A placa foi, depois, corrida através de um leitor de ELISA. Os resultados deste ensaio são proporcionados na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1

Dia	Frasco	ORF2 no sedimento (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

(continuação)

Dia	Frasco	ORF2 no sedimento (μg)	ORF2 no sobrenadante (μg)
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

Estes resultados indicam que, quando o tempo de incubação é prolongado, a expressão da ORF2 no sobrenadante das células e meios centrifugados é superior à expressão no sedimento das células e meios centrifugados. Consequentemente, permitindo que a expressão de ORF2 continue durante, pelo menos, 5 dias e recuperando-a no sobrenadante, em vez de permitir que a expressão continue durante menos de 5 dias e recuperando a ORF2 a partir das células, proporciona um grande aumento nos rendimentos de ORF2 e um melhoramento significativo em relação a métodos anteriores.

EXEMPLO 2

Este exemplo proporciona dados quanto à eficácia das vacinas aqui divulgadas. Um frasco rotativo de 1000 mL foi semeado com, aproximadamente, $1,0 \times 10^6$ células Sf+/mL em 300 mL de meios Excell 420. O frasco foi, depois, incubado a 27 °C e agitado a 100 rpm. Subsequentemente, o frasco foi semeado com 10 mL de semente de vírus de ORF2 de PCV2/Bac p+6 (o baculovírus recombinante contendo o gene de ORF2 de PCV2 com 6 passagens adicionais nas células de insecto Sf9), com uma MOI de 0,1, após 24 horas de incubação.

O frasco foi, depois, incubado a 27 °C, durante um total de 6 dias. Após incubação, o frasco foi, depois, centrifugado e três amostras do sobrenadante resultante foram recolhidas e inactivadas. O sobrenadante foi inactivado levando a sua temperatura para 37 ± 2 °C. À primeira amostra, uma solução de bromidrato de 2-bromoetilenoamina a 0,4 M, a qual tinha sido ciclizada para etilenimina binária (BEI) a 0,2 M em NaOH a 0,3 N, é adicionada ao sobrenadante, para dar uma concentração final de BEI de 5 mM. À segunda amostra, BEI a 10 mM foi adicionada ao sobrenadante. À terceira amostra, não foi adicionada BEI ao sobrenadante. As amostras foram, depois, agitadas continuamente, durante 48 h. Uma solução de tiossulfato de sódio a 1,0 M, para dar uma concentração mínima final de 5 mM, foi adicionada para neutralizar qualquer BEI residual. A quantidade de ORF2 em cada amostra foi, depois, quantificada utilizando o mesmo processo de ensaio de ELISA, como descrito no Exemplo 1. Os resultados deste podem ser verificados na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2

Amostra	ORF2 no sobrenadante (µg)
1	78,71
2	68,75
3	83,33

Este exemplo demonstra que a neutralização com BEI não remove ou degrada quantidades significativas do produto de proteína de ORF2 recombinante de PCV2. Isto é evidenciado pelo facto de que não ocorre grande perda de ORF2 no sobrenadante da BEI ou temperaturas elevadas. Os especialistas na técnica reconhecerão que a ORF2 recuperada é um produto proteico estável.

EXEMPLO 3

Este exemplo demonstra que o método aqui divulgado é escalável de produção de pequena escala de ORF2 recombinante de PCV2 a produção de grande escala de ORF2 recombinante de PCV2. $5,0 \times 10^5$ células/mL de células SF+/mL em 7000 mL de meios ExCell 420 foram plantadas num Biorreactor de 20000 mL Applikon. Os meios e as células foram, depois, incubados a 27 °C e agitados, a 100 RPM, durante as 68 horas seguintes. Na 68ª hora, 41,3 mL de Baculovírus de ORF2 de PCV2 MSV+3 foram adicionados a 7000 mL de meio ExCell 420. A mistura resultante foi, depois, adicionada ao biorreactor. Durante os sete dias seguintes, a mistura foi incubada a 27 °C e agitada a 100 RPM. As amostras do

biorreactor foram extraídas de 24 em 24 horas, com início no dia 4 pós-infecção e cada amostra foi centrifugada. O sobrenadante das amostras foi preservado e a quantidade de ORF2 foi, depois, quantificada utilizando densitometria de SDS-PAGE. Os resultados desta podem ser verificados na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3

Dia após infecção:	ORF2 no sobrenadante (µg/mL)
4	29,33
5	41,33
6	31,33
7	60,67

EXEMPLO 4

Este exemplo testa a eficácia de sete vacinas candidatas de PCV2 e ainda define parâmetros de eficácia após exposição a uma estirpe virulenta de PCV2. Cento e oito (108) leitões privados de colostro nascidos de cesariana (CDCD), 9-14 dias de idade, foram aleatoriamente divididos em 9 grupos de igual tamanho. A Tabela 4 expõe a Concepção Estudo Geral para este Exemplo.

Tabela 4. Concepção de Estudo Geral

Grupo	Nº de Porcos	Tratamento	Dia de Tratamento	KLH/ICF A no Dia 21 e Dia 27	Estimulado com PCV2 Virulento no Dia 24	Necropsia no Dia 49
1	12	Vacina de PCV2 Nº 1 – (16 µg de vORF2)	0	+	+	+
2	12	Vacina de PCV2 Nº 2 – (8 µg de vORF2)	0	+	+	+
3	12	Vacina de PCV2 Nº 3 – (4 µg de vORF2)	0	+	+	+
4	12	Vacina de PCV2 Nº 4 – (16 µg de rORF2)	0	+	+	+
5	12	Vacina de PCV2 Nº 5 – (8 µg de rORF2)	0	+	+	+
6	12	Vacina de PCV2 Nº 6 – (4 µg de rORF2)	0	+	+	+
7	12	Vacina de	0	+	+	+

(continuação)

Grupo	Nº de Porcos	Tratamento	Dia de Tratamento	KLH/ICF A no Dia 21 e Dia 27	Estimulado com PCV2 Virulento no Dia 24	Necropsia no Dia 49
		PCV2 Nº 7 - (Vírus de célula intacta morto)				
8	12	Nenhum - Controlos de Estímulo	N/A	+	+	+
9	12	Nenhum - Grupo de Controlo Negativo Estrito	N/A	+	-	+

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

Sete dos grupos (Grupos 1 - 7) receberam doses de polipéptido de ORF2 de PCV2, um dos grupos actuou como um controlo de estímulo e não recebeu ORF2 de PCV2 e o outro grupo actuou como o grupo de controlo negativo estrito e também não recebeu ORF2 de PCV2. No Dia 0, os Grupos 1 até 7 foram tratados com vacinas atribuídas. Aos leitões no Grupo 7 foi dado um tratamento de reforço no Dia 14. Os leitões foram observados para eventos adversos e reacções de local de injeção após

vacinação e, no Dia 19, os leitões foram deslocados para o segundo local de estudo. No segundo local de estudo, os Grupos 1-8 foram alojados em grupo num edifício, enquanto o Grupo 9 foi alojado num edifício separado. Todos os porcos receberam hemocianina da lapa californiana (KLH)/adjuvante incompleto de Freund (ICFA) nos Dias 21 e 27 e, no Dia 24, os Grupos 1-8 foram estimulados com um PCV2 virulento.

As amostras de sangue pré- e pós-estímulo foram recolhidas para serologia de PCV2. Foram recolhidos os dados de peso corporal pós-estímulo, para determinação de ganho de peso diário médio (ADWG) e sintomas clínicos, assim como amostras de esfregaços nasais para determinar a libertação nasal de PCV2. No Dia 49, todos os porcos sobreviventes foram necropsiados, os pulmões foram pontuados para lesões e os tecidos seleccionados foram preservados em formalina para testes de Imuno-histoquímica (IHC), numa data posterior.

Materiais e Métodos

Este foi um estudo de exequibilidade de vacinação-estímulo, de ocultação parcial, conduzido em porcos CDCD, 9 a 14 dias de idade, no Dia 0. A serem incluídos no estudo, os títulos de IFA de PCV2 de porcas eram $\leq 1:1000$. Além disso, o estado serológico das porcas era de uma vara negativa para PRRS conhecida. Vinte e oito (28) porcas foram testadas para estado serológico de PCV2. Catorze (14) porcas tinham um título de PCV2 de ≤ 1000 e foram transferidas para o primeiro local de estudo. Cento e dez (110) leitões foram dados à luz por cirurgias de incisão cesariana e ficaram disponíveis para este estudo no Dia -4. No Dia -3, 108 porcos CDCD no primeiro local de estudo foram pesados,

identificados com marcas auriculares, bloqueados por peso e atribuídos aleatoriamente a 1 de 9 grupos, como exposto acima na tabela 4. Se qualquer animal de teste cumprindo os critérios de inclusão fosse inscrito no estudo e fosse mais tarde excluído por qualquer razão, o Investigador e Monitor eram consultados, de modo a determinar a utilização dos dados recolhidos do animal na análise final. Eram documentadas a data em que os leitões inscritos eram excluídos e a razão para a exclusão. Inicialmente, não foram excluídas porcas. Um total de 108 de 110 porcos disponíveis foi aleatoriamente atribuído a um de 9 grupos no Dia -3. Os dois porcos mais pequenos (Nº 17 e 19) não foram atribuídos a um grupo e estavam disponíveis como extras, se necessários. Durante a duração do estudo, foram removidos vários animais. O Porco 82 (Grupo 9) no Dia -1, Porco Nº 56 (Grupo 6) no Dia 3, Porco Nº 53 (Grupo 9) no Dia 4, Porco Nº 28 (Grupo 8) no Dia 8, Porco Nº 69 (Grupo 8) no Dia 7 e Porco Nº 93 (Grupo 4) no Dia 9, foram, cada, encontrados mortos antes do estímulo. Estes seis porcos não foram incluídos nos resultados do estudo final. O Porco Nº 17 (um dos porcos extra) foi atribuído ao Grupo 9. O porco extra restante, Nº 19, foi excluído do estudo.

As formulações dadas a cada dos grupos foram como se segue: O Grupo 1 foi concebido para administrar 1 mL de ORF2 viral (vORF2) contendo 16 µg de ORF2/mL. Isto foi feito pela mistura de 10,24 mL de ORF2 viral ($256 \mu\text{g}/25 \mu\text{g/mL} = 10,24 \text{ mL de vORF2}$) com 3,2 mL de Carbopol a 0,5% e 2,56 mL de solução salina tamponada com fosfatos, a um pH de 7,4. Isto produziu 16 mL de formulação para o Grupo 1. O Grupo 2 foi concebido para administrar 1 mL de vORF2 contendo 8 µg de vORF2/mL. Isto foi feito pela mistura de 5,12 mL de vORF2 ($128 \mu\text{g}/25 \mu\text{g/mL} = 5,12 \text{ mL de vORF2}$) com 3,2 mL de Carbopol a

0,5% e 7,68 mL de solução salina tamponada com fosfatos, a um pH de 7,4. Isto produziu 16 mL de formulação para o grupo 2. O Grupo 3 foi concebido para administrar 1 mL de vORF2 contendo 4 µg de vORF2/mL. Isto foi feito pela mistura de 2,56 mL de vORF2 ($64 \text{ µg}/25 \text{ µg/mL} = 2,56 \text{ mL de vORF2}$) com 3,2 mL de Carbopol a 0,5% e 10,24 mL de solução salina tamponada com fosfatos, a um pH de 7,4. Isto produziu 16 mL de formulação para o grupo 3. O Grupo 4 foi concebido para administrar 1 mL de ORF2 recombinante (rORF2) contendo 16 µg de rORF2/mL. Isto foi feito pela mistura de 2,23 mL de rORF2 ($512 \text{ µg}/230 \text{ µg/mL} = 2,23 \text{ mL de vORF2}$) com 6,4 mL de Carbopol a 0,5% e 23,37 mL de solução salina tamponada com fosfatos, a um pH de 7,4. Isto produziu 32 mL de formulação para o grupo 4. O Grupo 5 foi concebido para administrar 1 mL de rORF2 contendo 8 µg de rORF2/mL. Isto foi feito pela mistura de 1,11 mL de rORF2 ($256 \text{ µg}/230 \text{ µg/mL} = 1,11 \text{ mL de rORF2}$) com 6,4 mL de Carbopol a 0,5% e 24,49 mL de solução salina tamponada com fosfatos, a um pH de 7,4. Isto produziu 32 mL de formulação para o grupo 5. O Grupo 6 foi concebido para administrar 1 mL de rORF2 contendo 8 µg de rORF2/mL. Isto foi feito pela mistura de 0,56 mL de rORF2 ($128 \text{ µg}/230 \text{ µg/mL} = 0,56 \text{ mL de rORF2}$) com 6,4 mL de Carbopol a 0,5% e 25,04 mL de solução salina tamponada com fosfatos, a um pH de 7,4. Isto produziu 32 mL de formulação para o grupo 6. O Grupo 7 foi concebido para administrar 2 mL de vacina celular morta intacta de PCV2 (PCV2 KV), contendo o MAX PCV2 KV. Isto foi feito pela mistura de 56 mL de KV de PCV2 com 14 mL de Carbopol a 0,5%. Isto produziu 70 mL de formulação para o grupo 7. Finalmente, o grupo 8 foi concebido para administrar KLH, a 0,5 µg/mL ou 1,0 µg/mL por dose de 2 mL. Isto foi feito pela mistura de 40,71 mL KLH ($7,0 \text{ µg proteína/mL a } 0,5 \text{ µg/mL} = 570 \text{ mL } (7,0 \text{ µg/mL}) (x) = (0,5) (570 \text{ mL})$), 244,29 mL de solução salina tamponada com fosfatos, a um pH de 7,4, e 285 mL

de adjuvante de Freund. A Tabela 5 descreve os períodos de tempo para as actividades chave deste Exemplo.

Tabela 5. Actividades de Estudo

Dia de Estudo	Actividade de Estudo
-4, 0 a 49	Observações gerais para saúde global e sintomas clínicos
-3	Pesados; Aleatorizados para grupos; Amostras de sangue recolhidas de todos os porcos
0	Exame de saúde; IVP N° 1-7 administrados aos Grupos 1-7, respectivamente
0-7	Porcos observados para reacções de local de injeção
14	Grupo 7 reforçado com Vacina de PCV2 N° 7; Amostras de sangue de todos os porcos
14-21	Grupo 7 observado para reacções de local de injeção
16-19	Todos os porcos tratados com antibióticos (dados ausentes)
19	Porcos transportados do primeiro local de teste para um segundo local de teste
21	Grupos 1-9 tratados com KLH/ICFA
24	Amostras de sangue e de esfregaço nasal recolhidas de todos os porcos; Todos os porcos pesados; Grupos 1-8 estimulados com material de estímulo de PCV2

(continuação)

Dia de Estudo	Actividade de Estudo
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47	Amostras de esfregaços nasais recolhidas de todos os porcos
27	Grupos 1-9 tratados com KLH/ICFA
31	Amostras de sangue recolhidas de todos os porcos
49	Amostras de sangue e de esfregaço nasal recolhidas de todos os porcos; Todos os porcos pesados; Necropsia a todos os porcos; Lesões grosseiras notadas, com ênfase colocada em íctero e úlceras gástricas; Pulmões avaliados para lesões; Amostras de tecido frescas e fixas em formalina guardadas; Fase em vida do estudo completada

Após a conclusão da fase em vida do estudo, os tecidos fixos em formalina foram examinados por Imuno-histoquímica (IHC) para detecção de antigénio de PCV2, por um patologista, as amostras de sangue foram avaliadas para serologia de PCV2, as amostras de esfregaços nasais foram avaliadas para libertação de PCV2 e o ganho de peso diário médio (ADWG) foi determinado do Dia 24 ao Dia 49.

Os animais foram alojados no primeiro local de estudo, em gaiolas individuais, em cinco salas desde o nascimento até, aproximadamente, 11 dias de idade (aproximadamente, Dia 0 do

estudo). Cada sala era idêntica em disposição e consistia de gaiolas de aço inoxidável individuais empilhadas, com ar aquecido e filtrado proporcionado separadamente a cada unidade de isolamento. Cada sala tinha aquecimento e ventilação separados prevenindo, desse modo, a contaminação cruzada de ar entre salas. No segundo local de estudo, os animais foram alojados em dois edifícios diferentes. O Grupo 9 (O grupo de controlo negativo Estrito) foi alojado separadamente num edifício de acabamento convertido e os Grupos 1-8 foram alojados em edifício de criação convertido. Cada grupo foi alojado numa pocilga separada (11-12 porcos por pocilga) e cada pocilga proporcionava, aproximadamente, 3,0 pés quadrados por porco. Cada pocilga estava num piso elevado, com pavimentos de ripas de plástico. Um poço debaixo das pocilgas servia como um tanque de retenção para excremento e desperdício. Cada edifício tinha os seus próprios sistemas de aquecimento e ventilação separados, com pouca probabilidade de contaminação cruzada de ar entre edifícios.

No primeiro local de estudo, os leitões foram alimentados com uma ração de leite, especialmente formulada desde o nascimento até, aproximadamente, 3 semanas de idade. Todos os leitões estavam a consumir ração mista sólida, especial, até ao Dia 19 (aproximadamente, 4 ½ semanas de idade). No segundo local de estudo, todos os leitões eram alimentados com uma ração mista comercial não medicada personalizada, apropriada para a sua idade e peso, *ad libitum*. A água em ambos os locais de estudo também estava disponível *ad libitum*.

Todos os porcos de teste foram tratados com Vitamina E no Dia -2, com injeções de ferro no Dia -1 e com NAXCEL® (1,0 mL, IM, nas fossas popliteais alternadas) nos Dias 16, 17, 18 e 19.

Além disso, o Porco N° 52 (Grupo 9) foi tratado com uma injeção de ferro no Dia 3, o Porco 45 (Grupo 6) foi tratado com uma injeção de ferro no Dia 11, o Porco N° 69 (Grupo 8) foi tratado com NAXCEL® no Dia 6, o Porco N° 74 (Grupo 3) foi tratado com dexametazona e penicilina no Dia 14 e o Porco N° 51 (Grupo 1) foi tratado com dexametazona e penicilina no Dia 13 e com NAXCEL® no Dia 14, por diversas razões de saúde.

Enquanto em ambos os locais de estudo, os porcos estavam sob cuidado veterinário. Os exames de saúde animal foram conduzidos no Dia 0 e foram registados no Formulário de Registo de Exame de Saúde. Antes da vacinação, todos os animais estavam de boa saúde e estado nutricional, como determinado por observação no Dia 0. Antes do estímulo, todos os animais de teste foram observados como estando de boa saúde e estado nutricional. As carcaças e tecidos foram eliminados por entrega. A eliminação final dos animais de estudo foi registada no Registo de Eliminação Animal.

No Dia 0, os porcos atribuídos aos Grupos 1-6 receberam 1,0 mL de Vacinas 1-6 de PCV2, respectivamente, IM na região esquerda do pescoço, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x ½" estéril. Os porcos atribuídos ao Grupo 7 receberam 2,0 mL de Vacina N° 7 de PCV2, IM na região esquerda do pescoço, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x ½" estéril. No Dia 14, os porcos atribuídos ao Grupo 7 receberam 2,0 mL de Vacina N° 7 de PCV2, IM na região direita do pescoço, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x ½" estéril.

No Dia 21, todos os porcos de teste receberam 2,0 mL de KLH/ICFA, IM na região da fossa poplíteica direita, utilizando uma

seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x 1" estéril. No Dia 27, todos os porcos de teste receberam 2,0 mL de KLH/ICFA, na região da fossa poplíteia esquerda, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x 1" estéril.

No Dia 24, os porcos atribuídos aos Grupos 1-8 receberam 1,0 mL de material de estímulo de ISUVDL de PCV2 ($5,11 \log_{10}$ TCID₅₀/mL), IM na região esquerda do pescoço, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x 1" estéril. 1,0 mL adicional do mesmo material foi administrado, IN, a cada porco (0,5 mL por narina), utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e cânula nasal.

Os porcos de teste foram observados diariamente para saúde global e eventos adversos no Dia -4 e do Dia 0 ao Dia 19. As observações foram registadas no Registo de Observação Clínica. Todos os porcos de teste foram observados do Dia 0 ao Dia 7 e o Grupo 7 foi ainda observado do Dia 14 ao 21, para reacções de local de injeção. O ganho de peso diário médio foi determinado pelo peso de cada porco numa balança calibrada nos Dias -3, 24 e 49, ou no dia em que um porco fosse encontrado morto após estímulo. Os pesos corporais foram registados no Formulário de Peso Corporal. Os pesos corporais do Dia -3 foram utilizados para bloquear os porcos antes da aleatorização. Os dados de peso do Dia 24 e Dia 49 foram utilizados para determinar o ganho de peso diário médio (ADWG) para cada porco, durante estes intervalos de tempo. Para os porcos que morreram após estímulo e antes do Dia 49, o ADWG foi ajustado para representar o ADWG do Dia 24 ao dia da morte.

De modo a determinar a serologia de PCV2, foi recolhido sangue venoso total de cada leitão do seio venoso orbital nos Dias -3 e 14. Para cada leitão, o sangue foi recolhido do seio venoso orbital pela inserção de um tubo capilar estéril na comissura palpebral medial de um dos olhos e drenagem de, aproximadamente, 3,0 mL de sangue total para dentro de um Tubo Separador de Soro de 4,0 mL (SST). Nos Dias 24, 31 e 49, o sangue venoso total de cada porco foi recolhido da veia cava anterior utilizando uma agulha estéril Vacutainer 18 g x 1 ½" (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jérсия), um suporte de agulhas Vacutainer e um SST de 13 mL. As recolhas de sangue, em cada intervalo de tempo, foram registadas no Registo de Recolha de Amostras. O sangue em cada SST foi deixado coagular, cada SST foi, depois, centrifugado e o soro recolhido. O soro recolhido foi transferido para um tubo com tampa de encaixe estéril e armazenado a $-70 \pm 10^{\circ}$ C até ser testado numa data ulterior. As amostras de soro foram testadas para a presença de anticorpos de PCV2 por pessoal de BIVI-R&D.

Os porcos foram observados uma vez por dia, do Dia 20 ao Dia 49, para sintomas clínicos e as observações clínicas foram registadas no Registo de Observação Clínica.

Para testar para libertação nasal de PCV2, nos Dias 24, 25 e, depois, de dois em dois dias de estudo numerados até e incluindo o Dia 49, um esfregaço de dacron estéril foi inserido intranasalmente na narina esquerda ou direita de cada porco (um esfregaço por porco) tão assepticamente como possível, mexido durante alguns segundos e, depois, removido. Cada esfregaço foi, depois, colocado num único tubo com tampa de encaixe estéril contendo 1,0 mL de meios de EMEM com IFBS a 2%, 500 unidades/mL de Penicilina, 500 µg/mL de Estreptomicina e 2,5 µg/mL de

Fungizona. O esfregaço foi partido no tubo e o tubo com tampa de encaixe foi vedado e rotulado apropriadamente com número de animal, número de estudo, data de recolha, dia de estudo e "esfregaço nasal". Os tubos com tampa de encaixe vedados foram armazenados a -40 ± 10 °C até serem transportados, de um dia para o outro, sobre gelo para BIVI-St. Joseph. As recolhas de esfregaços nasais foram registadas no Formulário de Recolha de Amostras de Esfregaços Nasais. A BIVI-R&D conduziu os testes de isolamento de vírus (VI) quantitativo para PCV2 nas amostras de esfregaços nasais. Os resultados foram expressos em valores de $\log_{10}$. Um valor de 1,3 log, ou inferior, foi considerado negativo e qualquer valor superior a 1,3 log foi considerado positivo.

Os porcos que morreram (N° 28, 52, 56, 69, 82 e 93) no primeiro local de estudo foram necropsiados para o nível necessário para determinar um diagnóstico. As lesões grosseiras foram registadas e não foram retidos tecidos para estes porcos. No segundo local de estudo, os porcos que morreram antes do Dia 49 (N° 45, 23, 58, 35), os porcos encontrados mortos no Dia 49 antes da eutanásia (N° 2, 43) e os porcos eutanasiados no Dia 49 foram necropsiados. Quaisquer lesões grosseiras foram anotadas e as percentagens de lobos pulmonares com lesões foram registadas no Formulário de Relatório de Necropsia.

De cada dos 103 porcos necropsiados no segundo local de estudo, uma amostra de tecido de amígdala, pulmão, coração, fígado, nódulo linfático mesentérico, rim e nódulo linfático inguinal, foi colocada num único recipiente com formalina a 10% tamponada; enquanto outra amostra de tecido dos mesmos órgãos mencionados acima foi colocada num Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, RU) e cada Whirl-pak foi colocado sobre gelo. Cada recipiente foi devidamente rotulado. As recolhas de

amostras foram registadas no Formulário de Relatório de Necropsia. Depois, as amostras de tecido fixas em formalina e um Formulário de Pedido de Diagnóstico foram submetidos para testes de IHC. Os testes de IHC foram conduzidos de acordo com os processos laboratoriais ISU padrão para recepção de amostras, preparação de amostras e lâminas e técnicas de coloração. Os tecidos frescos em Whirl-pak foram enviados com sacos de gelo para a Monitorização de Estudo para armazenamento ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ} \text{C}$) e possível utilização futura. Os tecidos fixos em formalina foram examinados por um patologista para detecção de PCV2 por IHC e pontuados utilizando o seguinte sistema de pontuação: 0 = Nenhum; 1 = Coloração positiva escassa, poucos locais; 2 = Coloração positiva moderada, múltiplos locais; e 3 = Coloração positiva abundante, difusa por todo o tecido. Devido ao facto de que o patologista não pôde diferenciar positivamente LN inguinal de LN mesentérico, os resultados para estes tecidos foram simplesmente rotulados como Nódulo Linfático e a pontuação dada foi a pontuação mais elevada para cada dos dois tecidos por animal.

Resultados

Os resultados para este exemplo são dados abaixo. Importa notar que um porco do Grupo 9 morreu antes do Dia 0 e mais 5 porcos morreram após vacinação (1 porco do Grupo 4; 1 porco do Grupo 6; 2 porcos do Grupo 8; e 1 porco do Grupo 9). O exame *post mortem* indicou que todos os seis morreram devido a infecções subjacentes que não estavam associadas a vacinação ou PMWS. Além disso, não foram notados eventos adversos ou reacções de local de injeção com quaisquer grupos.

Os resultados de ganho de peso diário médio (ADWG) são apresentados abaixo na Tabela 6. O Grupo 9, o grupo de controlo negativo estrito, teve o ADWG mais elevado ($1,06 \pm 0,17$ lb/dia), seguido do Grupo 5 ($0,94 \pm 0,22$ lb/dia), o qual recebeu uma dose de 8 µg de rORF2. O Grupo 3, o qual recebeu uma dose de µg de vORF2, teve o ADWG mais baixo ($0,49 \pm 0,21$ lb/dia), seguido do Grupo 7 ($0,50 \pm 0,15$ lb/dia), o qual recebeu 2 doses de vacina inactivada.

Tabela 6. Sumário de Ganho de Peso Diário Médio (ADWG) de Grupo

Grupo	Tratamento	N	ADWG - lb/dia (Dia 24 ao Dia 49) ou ajustado para porcos mortos antes do Dia 29
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	$0,87 \pm 0,29$ lb/dia
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	$0,70 \pm 0,32$ lb/dia
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	$0,49 \pm 0,21$ lb/dia
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	$0,84 \pm 0,30$ lb/dia
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	$0,94 \pm 0,22$ lb/dia
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	$0,72 \pm 0,25$ lb/dia
7	KV (2 doses)	12	$0,50 \pm 0,15$ lb/dia
8	Controlos de Estímulo	10	$0,76 \pm 0,19$ lb/dia
9	Controlos Negativos Estritos	11	$1,06 \pm 0,17$ lb/dia

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

Os resultados de serologia de PCV2 são apresentados abaixo na Tabela 7. Todos os nove grupos eram seronegativos para PCV2 no Dia -3. No Dia 14, os Grupos recebendo vacinas de vORF2 tiveram os títulos mais elevados, os quais variaram de 187,5 a 529,2. Os porcos recebendo vacina viral morta tiveram os títulos mais elevados seguintes, seguidos dos grupos recebendo vacinas de rORF2. Neste momento, os Grupos 8 e 9 permaneceram seronegativos. No Dia 24 e Dia 31, os porcos recebendo vacinas de vORF2 continuaram a demonstrar uma forte resposta serológica, seguidos de perto pelo grupo que recebeu duas doses de uma vacina viral morta. Os porcos recebendo vacinas de rORF2 foram mais lentos a responder serologicamente e os Grupos 8 e 9 continuaram a permanecer seronegativos. No Dia 49, os porcos recebendo vacina de vORF2, 2 doses da vacina viral morta e a dose mais baixa de rORF2 demonstraram as respostas serológicas mais fortes. Os porcos recebendo 16 µg e 8 µg de vacinas de rORF2 tinham títulos de IFA ligeiramente mais elevados do que os controlos de estímulo. O Grupo 9 no Dia 49 demonstrou uma forte resposta serológica.

Tabela 7. Sumário de Títulos de IFA de PCV2 de Grupo

TÍTULO MÉDIO DE IFA						
Grupo	Tratamento	Dia -3	Dia 14	Dia 24	Dia 31**	Dia 49***
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	50,0	529,2	4400,0	7866,7	11054,5
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	50,0	500,0	3466,7	6800,0	10181,8

(continuação)

TÍTULO MÉDIO DE IFA

Grupo	Tratamento	Dia -3	Dia 14	Dia 24	Dia 31**	Dia 49***
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	50,0	187,5	1133,3	5733,3	9333,3
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	50,0	95,5	1550,0	3090,9	8000,0
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	50,0	75,0	887,5	2266,7	7416,7
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	50,0	50,0	550,0	3118,2	10570,0
7	KV (2 doses)	50,0	204,2	3087,5	4620,8	8680,0
8	Controlos de Estímulo	50,0	55,0	50,0	50,0	5433,3
9	Controlos Negativos Estritos	50,0	59,1	59,1	54,5	6136,4

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

*Para fins de cálculo, um título de IFA ≤ 100 foi designado como um título de "50"; um título de IFA ≥ 6400 foi designado como um título de "12800",

**Dia de Estímulo

***Dia de Necropsia

Os resultados das observações clínicas pós-estímulo são apresentados abaixo na Tabela 8. Este sumário de resultados inclui observações para Comportamento Anormal, Respiração Anormal, Tosse e Diarreia. A Tabela 9 inclui os resultados do Sumário de Incidência Global de Grupo de Sintomas Clínicos e a Tabela 10 inclui resultados do Sumário de Taxas de Mortalidade de Grupo Pós-estímulo. O sintoma clínico mais comum notado neste estudo foi o comportamento anormal, o qual foi pontuado como

letargia branda a grave. Os porcos recebendo a 2 doses mais baixas de vORF2, porcos recebendo 16 µg de rORF2 e porcos recebendo 2 doses de vacina de KV, tinham taxas de incidência de $\geq 27,3\%$. Os porcos recebendo 8 µg de rORF2 e o grupo de controlo negativo estrito não tiveram comportamento anormal. Nenhum dos porcos neste estudo demonstrou qualquer respiração anormal. A tosse foi notada, frequentemente, em todos os grupos (0 a 25%), como foi a diarreia (0-20%). Nenhum dos sintomas clínicos notados era patognomónico para PMWS.

A incidência global de sintomas clínicos variou entre grupos. Os grupos recebendo qualquer das vacinas de vORF2, o grupo recebendo 16 µg de rORF2, o grupo recebendo 2 doses de vacina de KV e o grupo de controlo de estímulo tiveram a incidência mais elevada de sintomas clínicos globais ($\geq 36,4\%$). O grupo de controlo negativo estrito, o grupo recebendo 8 µg de rORF2 e o grupo recebendo 4 µg de rORF2 tiveram taxas de incidência global de sintomas clínicos de 0%, 8,3% e 9,1%, respectivamente.

As taxas de mortalidade global entre grupos também variaram. O grupo recebendo 2 doses de vacina de KV teve a taxa de mortalidade mais elevada (16,7%); enquanto os grupos que receberam 4 µg de vORF2, 16 µg de rORF2 ou 8 µg de rORF2 e o grupo de controlo negativo estrito tiveram todos 0% de taxa de mortalidade.

Tabela 8. Sumário de Observações de Grupo para Comportamento Anormal, Respiração Anormal, Tosse e Diarreia

Grupo	Tratamento	N	Comportamento Anormal ¹	Comportamento Anormal ²	Tosse ³	Diarreia ⁴
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	4/12 (33,3%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	1/12 (8,3%)
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	8/12 (66,7%)	0/12 (0%)	2/12 (16,7%)	1/12 (8,3%)
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	3/11 (27,3%)	0/11 (0%) -	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 doses)	12	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)
8	Controlos de Estímulo	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	Controlos Negativos Estritos	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

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

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

³Número total de porcos em cada grupo que demonstrou uma tosse durante, pelo menos, um dia

⁴Número total de porcos em cada grupo que demonstrou diarreia durante, pelo menos, um dia

Tabela 9. Sumário de Incidência Global de Grupo de Sintomas Clínicos

Grupo	Tratamento	N	Incidência de porcos com Sintomas Clínicos ¹	Taxa de Incidência
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	5	41,7%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	5	41,7%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	8	66,7%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	4	36,4%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8,3%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1	9,1%
7	KV (2 doses)	12	7	58,3%
8	Controlos de Estímulo	10	4	40%
9	Controlos Negativos Estritos	11	0	0%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

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

Tabela 10. Sumário de Taxas de Mortalidade de Grupo Pós-estímulo

Grupo	Tratamento	N	Morte Pós-estímulo	Taxa de Mortalidade
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	1	8,3%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8,3%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	0	0%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	1	0	0%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	0	0%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1	9,1%
7	KV (2 doses)	12	2	16,7%
8	Controlos de Estímulo	10	1	10%
9	Controlos Negativos Estritos	11	0	0%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

Os resultados de libertação nasal de PCV2 são apresentados abaixo na Tabela 11. Após estímulo no Dia 24, 1 porco no Grupo 7 começou a libertar PCV2 no Dia 27. Nenhum dos outros grupos sentiu libertação até ao Dia 33. O grosso da libertação nasal foi notado do Dia 35 ao Dia 45. Os grupos recebendo qualquer das três vacinas de vORF2 e os grupos recebendo 4 ou 8 µg de rORF2

tiveram a incidência mais baixa de libertação nasal de PCV2 ($\leq 9,1\%$). O grupo de controlo de estímulo (Grupo 8) teve a taxa de libertação mais elevada (80%), seguido do grupo de controlo negativo estrito (Grupo 9), o qual teve uma taxa de incidência de 63,6%.

Tabela 11. Sumário de Incidência de Grupo de Libertação Nasal de PCV2

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que libertaram durante, pelo menos, um dia	Taxa de Incidência
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	1	8,3%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8,3%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	1	8,3%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	2	18,2%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8,3%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1	9,1%
7	KV (2 doses)	12	5	41,7%
8	Controlos de Estímulo	10	8	80%
9	Controlos Negativos Estritos	11	7	63,6%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

O Sumário de Incidência de Grupo de Íctero, Incidência de Grupo de Úlceras Gástricas, Pontuações de Lesões Pulmonares Médias de Grupo e Incidência de Grupo de Lesões Pulmonares é mostrado abaixo na Tabela 12. Seis porcos morreram no primeiro local de teste, durante a fase de pós-vacinação do estudo (Grupo 4, N=1; Grupo 6, N=1; Grupo 8, N=2; Grupo 9, N=2). Quatro em seis porcos tiveram lesões fibrinosas em uma ou mais cavidades corporais, um porco (Grupo 6) teve lesões consistentes com doença clostridiana e um porco (Grupo 9) não teve lesões grosseiras. Nenhum dos porcos que morreu durante a pós-vacinação faseada do estudo teve lesões consistentes com PMWS.

Os porcos que morreram pós-estímulo e os porcos eutanasiados no Dia 49 foram necropsiados. Na necropsia, íctero e úlceras gástricas não estavam presentes em qualquer grupo. Com respeito a % médias de lesões pulmonares, o Grupo 9 teve a % média mais baixa de lesões pulmonares (0%), seguido do Grupo 1, com $0,40 \pm 0,50\%$ e Grupo 5, com $0,68 \pm 1,15\%$. Os Grupos 2, 3, 7 e 8 tiveram a % média mais elevada de lesões pulmonares ($\geq 7,27\%$). Cada destes quatro grupos continha um porco com % de lesões pulmonares $\geq 71,5\%$, a qual enviesou superiormente os resultados para estes quatro grupos. Com a exceção do Grupo 9, com 0% de lesões pulmonares notadas, os restantes 8 grupos tiveram $\leq 36\%$ de lesões pulmonares. Quase todas as lesões pulmonares notadas foram descritas como vermelhidão/púrpura e consolidadas.

Tabela 12. Sumário de Incidência de Grupo de Íctero, Incidência de Grupo de Úlceras Gástricas, % Média de Pontuações de Lesões Pulmonares de Grupo e Incidência de Grupo de Lesões Pulmonares Notadas

Grupo	Tratamento	Íctero	Úlceras Gástricas	% Média de Lesões Pulmonares	Incidência de Lesões Pulmonares Notadas
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,40 ± 0,50%	10/12 (83%)
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,41 ± 20,2%	10/12 (83%)
3	vORF2-4 µg (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	9,20 ± 20,9%	10/12 (83%)
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	0/11 (0%)	0/1 (0%)	1,5 ± 4,74%	4/11 (36%)
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,68 ± 1,15%	9/12 (75%)
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2,95 ± 5,12%	7/11 (64%)
7	KV (2 doses)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,27 ± 22,9%	9/12 (75%)
8	Controlos de Estímulo	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9,88 ± 29,2%	8/10 (80%)
9	Controlos Negativos Estritos	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

O Sumário dos Resultados de Incidência Positiva de IHC de Grupo é mostrado na Tabela 13. O Grupo 1 (vORF2 - 16 µg) e o Grupo 5 (rORF2 - 8 µg) tiveram a taxa mais baixa de resultados positivos de IHC (16,7%). O Grupo 8 (Controlos de Estímulo) e o Grupo 9 (Controlos Negativos Estritos) tiveram a taxa mais elevada de resultados positivos de IHC, 90% e 90,9%, respectivamente.

Tabela 13. Sumário de Taxa de Incidência Positiva de IHC de Grupo

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que tiveram, pelo menos, um tecido positivo para PCV2	Taxa de Incidência
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	2	16,7%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	3	25,0%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	8	66,7%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	4	36,3%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	2	16,7%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	4	36,4%

(continuação)

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que tiveram, pelo menos, um tecido positivo para PCV2	Taxa de Incidência
7	KV (2 doses)	12	5	41,7%
8	Controlos de Estímulo	10	9	90,0%
9	Controlos Negativos Estritos	11	10	90,9%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

Pós-estímulo, Grupo 5, o qual recebeu uma dose de 8 µg de antígeno de rORF2, superou os outros 6 grupos de vacina. O Grupo 5 teve o ADWG mais elevado ($0,94 \pm 0,22$ lb/dia), a incidência mais baixa de comportamento anormal (0%), a segunda incidência mais baixa de tosse (8,3%), a incidência mais baixa de sintomas clínicos globais (8,3%), a taxa de mortalidade mais baixa (0%), a taxa de libertação nasal mais baixa de PCV2 (8,3%), a segunda taxa mais baixa para % média de lesões pulmonares ($0,68 \pm 1,15\%$) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos positivos (16,7%). Os grupos recebendo diversos níveis de antígeno de rORF2 superaram globalmente os grupos recebendo diversos níveis de vORF2 e o grupo recebendo 2 doses de vacina de PCV2 de célula intacta morta teve o pior desempenho. As Tabelas 14 e 15 contêm sumários de dados de pós-estímulo de grupo.

Tabela 14. Sumário de Dados de Pós-estímulo de Grupo - Parte 1

Grupo	N	Tratamento	ADWG (lb/dia)	Comportamento Anormal	Tosse	Incidência Global de Sintomas Clínicos
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dose)	0,87 ± 0,29	2/12 (16,7%)	3/12 (25%)	41,7%
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dose)	0,70 ± 0,32	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)	41,7%
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dose)	0,49 ± 0,21	8/12 (66,7%)	2/12 (16,7%)	66,7%
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dose)	0,84 ± 0,30	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	36,4%
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dose)	0,94 ± 0,22	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	8,3%
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dose)	0,72 ± 0,25	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	9,1%
7	12	KV (2 doses)	0,50 ± 0,15	7/12 (58,3%)	0/12 (0%)	58,3%
8	10	Controlos de Estímulo	0,76 ± 0,19	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40%
9	11	Controlos Negativos Estritos	1,06 ± 0,17	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

Tabela 15. Sumário de Dados de Pós-estímulo de Grupo - Parte 2

Grupo	N	Tratamento	Taxa de Mortalidade	Libertação Nasal	% Média de Lesões Pulmonares	Taxa de Incidência de, pelo menos, um tecido de IHC positivo para PCV2
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dose)	8,3%	8,3%	0,40 ± 0,50%	16,7%
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dose)	8,3%	8,3%	7,41 ± 20,2%	25,0%
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dose)	0%	8,3%	9,20 ± 20,9%	66,7%
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dose)	0%	18,2%	1,50 ± 4,74%	36,3%
5	12	rORF2-8 µg (1 dose)	0%	8,3%	0,68 ± 1,15%	16,7%

(continuação)

Grupo	N	Tratamento	Taxa de Mortalidade	Libertação Nasal	% Média de Lesões Pulmonares	Taxa de Incidência de, pelo menos, um tecido de IHC positivo para PCV2
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dose)	9,1%	9,1%	2,95 ± 5,12%	36,4%
7	12	KV (2 doses)	16,7%	41,7%	7,27 ± 22,9%	41,7%
8	10	Controlos de Estímulo	10%	80%	9,88 ± 29,2%	90,0%
9	11	Controlos Negativos Estritos	0%	63,6%	0/11 (0%)	90,9%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

Os resultados deste estudo indicam que todos os esforços vacinais adicionais se devem focar numa vacina de rORF2. Globalmente, a libertação nasal de PCV2 foi detectada pós-estímulo e a vacinação com uma vacina de PCV2 resultou numa redução da libertação. A imuno-histoquímica de tecidos linfóides seleccionados, também serviu como um bom parâmetro para a eficácia vacinal, enquanto que grandes diferenças em ADWG,

sintomas clínicos e lesões grosseiras não foram detectadas entre grupos. Este estudo foi complicado pelo facto de que o PCV2 estranho foi introduzido num determinado momento durante o estudo, como evidenciado pela libertação nasal de PCV2, seroconversão de PCV2 e tecidos de IHC positivos no Grupo 9, o grupo de controlo negativo estrito.

Discussão

Sete vacinas de PCV2 foram avaliadas neste estudo, o qual incluiu três níveis de dose de antígeno de vORF2 diferentes, administrado uma vez no Dia 0, três níveis de dose de antígeno de rORF2 diferentes, administrado uma vez no Dia 0 e um nível de dose de vacina de PCV2 de célula intacta morta, administrada no Dia 0 e Dia 14. Globalmente, o Grupo 5, o qual recebeu 1 dose de vacina contendo 8 µg de antígeno de rORF2, teve os melhores resultados. O Grupo 5 teve o ADWG mais elevado, a incidência mais baixa de comportamento anormal, a incidência mais baixa de respiração anormal, a segunda incidência mais baixa de tosse, a incidência mais baixa de sintomas clínicos globais, a taxa de mortalidade mais baixa, a taxa de libertação nasal de PCV2 mais baixa, a segunda taxa mais baixa para % média de lesões pulmonares e a taxa de incidência mais baixa para tecidos de IHC positivos.

Interessantemente, o Grupo 4, o qual recebeu uma dose de antígeno de rORF2 mais elevada do que o Grupo 5, não teve um desempenho tão bom ou melhor do que o Grupo 5. O Grupo 4 teve um ADWG ligeiramente inferior, uma incidência mais elevada de comportamento anormal, uma incidência mais elevada de sintomas clínicos globais, uma taxa de libertação nasal de PCV2 mais

elevada, uma % média mais elevada de lesões pulmonares e uma taxa mais elevada para tecidos de IHC positivos do que o Grupo 5. A análise estatística, a qual pode ter indicado que as diferenças entre estes dois grupos não eram estatisticamente significativas, não foi conduzida nestes dados, mas existiu uma tendência observada de que o Grupo 4 não teve um desempenho tão bom quanto o Grupo 5.

Após a vacinação, 6 porcos morreram no primeiro local de estudo. Quatro dos seis porcos eram do Grupo 8 ou Grupo 9, os quais não receberam vacina. Nenhum dos seis porcos demonstrou lesões consistentes com PMWS, não foram referidos eventos adversos e, globalmente, todas as sete vacinas pareceram ser seguras quando administradas a porcos com, aproximadamente, 11 dias de idade. Durante a fase de pós-vacinação do estudo, os porcos recebendo qualquer dos três níveis de dose de vacina de vORF2 ou vacina de célula intacta morta, tiveram os níveis mais elevados de IFAT, enquanto o Grupo 5 teve os níveis mais baixos de IFAT imediatamente antes do estímulo, dos grupos vacinais.

Embora não formalmente provado, acredita-se que a via predominante de transmissão de PCV2 a suínos jovens pouco depois do desmame é por contacto oronasal directo e uma vacina eficaz que reduz a libertação nasal de PCV2 num quadro de produção ajudaria a controlar a propagação da infecção. Os grupos recebendo um de três níveis de antigénio de vORF2 e o grupo recebendo 8 µg de rORF2 tiveram a taxa de incidência mais baixa de libertação nasal de PCV2 (8,3%). De modo esperado, o grupo de controlo de estímulo teve a taxa de incidência mais elevada de libertação nasal (80%).

As lesões grosseiras em porcos com PMWS secundária a infecção de PCV2, tipicamente, consistem de linfadenopatia generalizada, em combinação com um ou um múltiplo dos seguintes: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou íctero, (3) fígados atroficos mosqueados, (4) úlceras gástricas e (5) nefrite. Na necropsia, não foram notados íctero, hepatite, nefrite e úlceras gástricas em quaisquer grupos e a linfadenopatia não foi especificamente examinada. A % média de pontuações de lesões pulmonares variou entre grupos. O grupo recebendo 16 µg de antigénio de vORF2 teve a % média mais baixa de pontuação de lesão pulmonar ($0,40 \pm 0,50\%$), seguido do grupo que recebeu 8 µg de rORF2 ($0,68 \pm 1,15\%$). Como esperado, o grupo de controlo de estímulo teve a % média mais elevada de pontuação de lesão pulmonar ($9,88 \pm 29,2\%$). Em todos os quatro grupos, a % média de pontuações de lesões pulmonares foi elevada, devido a um porco em cada destes grupos que teve pontuações de lesões pulmonares muito elevadas. A maioria das lesões pulmonares foi descrita como vermelhidão/púrpura e consolidada. Tipicamente, as lesões pulmonares associadas a PMWS são descritas como castanho-claras e não colapsáveis com edema interlobular. As lesões pulmonares notadas neste estudo ou não estavam associadas a infecção de PCV2 ou pode ter estado presente um segundo agente infeccioso pulmonar. No contexto deste estudo, a % de pontuações de lesões pulmonares provavelmente não reflecte uma verdadeira medida da quantidade de infecção pulmonar devido a PCV2.

Outros investigadores demonstraram uma correlação directa entre a presença de antigénio de PCV2 por IHC e histopatologia. A histopatologia em tecidos seleccionados não foi conduzida com este estudo. O Grupo 1 (16 µg de vORF2) e o Grupo 5 (8 µg de rORF2) tiveram a taxa de incidência mais baixa de porcos positivos para antigénio de PCV2 (8,3%), enquanto o Grupo 9 (o

grupo de controlo negativo estrito - 90,9%) e o Grupo 8 (o grupo de controlo de estímulo - 90,0%) tiveram as taxas de incidência mais elevadas para porcos positivos para antígeno de PCV2. Devido à natureza não subjectiva deste teste, os resultados de IHC são, provavelmente, um dos melhores parâmetros para avaliar a eficácia vacinal.

Deste modo, foi determinada a Dosagem Mínima Protectora (MPD) de um produto recombinante de 1 mL/L de dose, com antígeno de ORF2 de PCV2 (rORF2) extraído no modelo de porco de CDCD perante um estímulo de PCV2. Dos três grupos que receberam níveis variáveis de antígeno de rORF2, o Grupo 5 (8 µg de antígeno de rORF2) teve, claramente, o nível mais elevado de protecção. Com respeito à totalidade dos parâmetros examinados, o Grupo 5 ou tinha os melhores resultados ou estava empatado para os resultados mais favoráveis. Quando o Grupo 5 foi comparado com os outros seis grupos vacinais pós-estímulo, o Grupo 5 teve o ADWG mais elevado ($0,94 \pm 0,22$ lb/dia), a incidência mais baixa de comportamento anormal (0%), a segunda incidência mais baixa de tosse (8,3%), a incidência mais baixa de sintomas clínicos globais (8,3%), a taxa de mortalidade mais baixa (0%), a taxa mais baixa de libertação nasal de PCV2 (8,3%), a segunda taxa mais baixa para % média de lesões pulmonares ($0,68 \pm 1,15\%$) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos de IHC positivos (16,7%).

Foi determinada a MPD de um produto convencional de 1 mL/L de dose que é antígeno de ORF2 de PCV2 (vORF2) parcialmente purificado no modelo de porco de CDCD perante um estímulo de PCV2. Dos três grupos que receberam níveis variáveis de antígeno de vORF2, o Grupo 1 (16 µg de vORF2) teve o nível mais elevado de protecção. O Grupo 1 superou os Grupos 2 e 3 em

relação à ADWG, % média de lesões pulmonares e IHC. Os Grupos 1 e 2 (8 µg de antígeno de vORF2) tiveram um desempenho igual em relação à incidência global de sintomas clínicos, o Grupo 3 (4 µg de antígeno de vORF2) teve a taxa de mortalidade mais baixa e todos os três grupos tiveram um desempenho igual em relação à libertação nasal. Globalmente, as vacinas de vORF não tiveram um desempenho tão bom quanto as vacinas de rORF.

Foi determinada a eficácia de uma dose máxima de uma vacina de PCV2 Morta Convencional de 2 mL/2 dose no modelo de porco de CDCD perante um estímulo de PCV2. Das sete vacinas avaliadas neste estudo, a vacina de PCV2 de célula intacta morta teve o pior desempenho. Os leitões recebendo duas doses de vacina de PCV2 de célula intacta morta tiveram o ADWG mais baixo, a segunda taxa mais elevada de comportamento anormal (58,3%), a segunda incidência global mais elevada de sintomas clínicos (58,3%), a taxa de mortalidade mais elevada (16,7%), a segunda incidência mais elevada de libertação nasal (41,7%), a % média mais elevada de lesões pulmonares ($9,88 \pm 29,2\%$), uma elevada incidência de lesões pulmonares notadas (75%) e uma taxa de incidência de IHC moderada em tecidos (41,7%). Contudo, era ainda eficaz a provocar uma resposta imunitária.

A libertação nasal de PCV2 foi avaliada como um parâmetro de eficácia e os parâmetros de eficácia de PCV2 anteriores de estudos anteriores foram reconfirmados. Os resultados deste estudo indicam que a libertação nasal de PCV2 ocorre após estímulo intranasal e que as vacinas de PCV2 reduzem a libertação nasal de PCV2 pós-estímulo. Além disso, os resultados deste estudo e referências na literatura indicam que a IHC também deve continuar a ser avaliada em futuros ensaios vacinais de PCV2.

Algumas conclusões adicionais surgindo deste estudo são que a linfadenopatia é um dos traços distintivos da PMWS. Outro dos traços distintivos da PMWS é a depleção linfóide e histiócitos multinucleados/gigantes. Além disso, não foram notados eventos adversos ou reacções de local de injeção para qualquer das 7 vacinas de PCV2 e todas as 7 vacinas de PCV2 pareceram ser seguras quando administradas a porcos jovens.

EXEMPLO 5

Este exemplo testa a eficácia de oito vacinas candidatas de PCV2 e reconfirma os parâmetros de estímulo de PCV2 de estudos de estímulo anteriores após exposição a uma estirpe virulenta de PCV2. Cento e cinquenta (150) leitões privados de colostro nascidos de cesariana (CDCD), 6-16 dias de idade, foram bloqueados por peso e aleatoriamente divididos em 10 grupos de igual tamanho. A Tabela 16 expõe a Concepção Estudo Geral para este Exemplo.

Tabela 16. Concepção de Estudo Geral

Grupo	Nº de Porcos	Tratamento	Dia de Tratamento	KLH/ICFA no Dia 22 e Dia 28	Estímulo com PCV2 Virulento no Dia 25	PRRSV MLV no Dia 46	Necropsia no Dia 50
1	15	Vacina 1 de PCV2 16 µg de rORF2 – IMS 1314	0 & 14	+	+	+	+
2	15	Vacina 2 de PCV2 16 µg de vORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
3	15	Vacina 3 de PCV2 16 µg de rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
4	15	Vacina 2 de PCV2 16 µg de vORF2 – Carbopol	0	+	+	+	+
5	15	Vacina 3 de PCV2 4 µg de rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+

(continuação)

Grupo	Nº de Porcos	Tratamento	Dia de Tratamento	KLH/ICFA no Dia 22 e Dia 28	Estímulo com PCV2 Virulento no Dia 25	PRRSV MLV no Dia 46	Necropsia no Dia 50
6	15	Vacina 3 de PCV2 1 µg de rORF2 - Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
7	15	Vacina 3 de PCV2 0,25 µg de rORF2 - Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
8	15	Vacina 4 de PVC2, KV > 8,0 log - Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
9	15	Controlos de Estímulo	N/A	+	+	+	+
10	15	Nenhum - Grupo de Controlo Negativo Estrito	N/A	+	-	+	+

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

A formulação vacinal dada a cada grupo foi como se segue. Vacina Nº 1 de PCV2, administrada a 1 x 2 mL de dose ao Grupo 1, era uma dose elevada (16 µg/2 mL de dose) de antígeno de ORF2 recombinante inativado, com o adjuvante IMS 1314 (16 µg de rORF2 - IMS 1314). Vacina Nº 2 de PCV2, administrada a 1 x 2 mL de dose ao Grupo 2, era uma dose elevada (16 µg/2 mL de dose) de um antígeno de ORF2 de PCV2 produzido de VIDO R-1 parcialmente purificado, com o adjuvante Carbopol (16 µg de vORF2 - Carbopol). Vacina Nº 3 de PCV2, administrada a 1 x 2 mL de dose ao Grupo 3, era uma dose elevada (16 µg/2 mL de dose) de antígeno de ORF2 recombinante inativado, com o adjuvante Carbopol (16 µg de rORF2 - Carbopol). Vacina Nº 4 de PCV2, administrada a 1 x 1 mL de dose ao Grupo 4, era uma dose elevada (16 µg/1 mL de dose) de um antígeno de ORF2 de PCV2 produzido de VIDO R-1 parcialmente purificado, com o adjuvante Carbopol (16 µg de vORF2 - Carbopol). Vacina Nº 5, administrada a 1 x 2 mL de dose ao Grupo 5, era uma dose de 4 µg/2 mL de um antígeno de ORF2 recombinante inativado, com o adjuvante Carbopol (4 µg de rORF2 - Carbopol). Vacina Nº 6 de PCV2, administrada a 1 x 2 mL de dose ao Grupo 6, era uma dose de 1 µg/2 mL de um antígeno de ORF2 recombinante inativado, com o adjuvante Carbopol (1 µg de rORF2 - Carbopol). Vacina Nº 7 de PCV2, administrada a 1 x 2 mL de dose ao Grupo 7, era uma dose baixa (0,25 µg/2 mL de dose) de antígeno de ORF2 recombinante inativado, com o adjuvante Carbopol (0,25 µg de rORF2 - Carbopol). Vacina Nº 8 de PCV2, administrada a 1 x 2 mL de dose ao Grupo 8, era um antígeno de PCV2 Struve produzido a partir de VIDO R-1 Morta Convencional Inativada de dose elevada (título de pré-inativação >8,0 log/2 mL de dose), com o adjuvante Carbopol ((KV >8,0 log - Carbopol). No Dia 0, os Grupos 1-8 foram tratados com as suas vacinas atribuídas. Os Grupos 1-3 e 5-8 receberam reforços das suas respectivas vacinas

novamente no Dia 14. A eficácia de uma dose única de 16 µg de vORF2 - Carbopol foi testada no Grupo 4, o qual não recebeu um reforço no Dia 14. Os leitões foram observados para eventos adversos e reacções de local de injeção após ambas as vacinações. No Dia 21, os leitões foram deslocados para um segundo local de estudo, onde os Grupos 1-9 foram alojados em grupo num edifício e o Grupo 10 foi alojado num edifício separado. Todos os porcos receberam hemocianina da lapa californiana emulsionada com adjuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA), nos Dias 22 e 28. No Dia 25, os Grupos 1-9 foram estimulados com, aproximadamente, 4 log de vírus PCV2 virulento. No Dia 46, tinham ocorrido muito poucas mortes no grupo de controlo de estímulo. Numa tentativa para imunoestimular os porcos e aumentar a virulência do material de estímulo de PCV2, todos os Grupos foram tratados com INGELVAC® PRRSV MLV (Vacina Reprodutiva e Respiratória Porcina, Vírus Vivo Modificado), no Dia 46.

As amostras de sangue pré- e pós-estímulo foram recolhidas para serologia de PCV2. Foram recolhidos dados de peso corporal pós-estímulo para determinação de ganho de peso diário médio (ADWG) e observações de sinais clínicos. No Dia 50, todos os porcos sobreviventes foram necropsiados, as lesões grosseiras foram registadas, os pulmões foram pontuados para patologia e os tecidos seleccionados foram preservados em formalina para examinação por Imuno-histoquímica (IHC), para detecção de um antígeno de PCV2 numa data ulterior.

Materiais e Métodos

Este foi um estudo de exequibilidade de vacinação-estímulo, de ocultação parcial, conduzido em porcos CDCD, 6 a 16 dias de idade, no Dia 0. A serem incluídos no estudo, os títulos de IFA de PCV2 de porcas eram $\leq 1:1000$. Além disso, o estado serológico das porcas era de uma vara negativa para PRRS conhecida. Dezasseis (16) porcas foram testadas para o estado serológico de PCV2 e todas as dezasseis (16) tinham um título de PCV2 de ≤ 1000 e foram transferidas para o primeiro local de estudo. Cento e cinquenta (150) leitões foram dados à luz por cirurgias de incisão cesariana e ficaram disponíveis para este estudo no Dia -3. No Dia -3, 150 porcos CDCD no primeiro local de estudo foram pesados, identificados com marcas auriculares, bloqueados por peso e atribuídos aleatoriamente a 1 de 10 grupos, como exposto acima na tabela 16. Amostras de sangue foram recolhidas de todos os porcos. Se qualquer animal de teste cumprindo os critérios de inclusão fosse inscrito no estudo e fosse mais tarde excluído por qualquer razão, o Investigador e Monitor eram consultados, de modo a determinar a utilização dos dados recolhidos do animal na análise final. Eram documentadas a data em que os leitões inscritos eram excluídos e a razão para a exclusão. Não foram excluídas porcas cumprindo os critérios de inclusão, seleccionadas para o estudo e transportadas para o primeiro local de estudo. Não foram excluídos leitões do estudo e não foram removidos animais de teste do estudo antes do seu término. A Tabela 17 descreve os períodos de tempo para as actividades chave deste Exemplo.

Tabela 17. Actividades de Estudo

Dia de Estudo	Datas Reais	Actividade de Estudo
-3	4-04-03	Porcos pesados; exame de saúde; aleatorizados para grupos; amostras de sangue recolhidas
-3, 0-21	4-04-03 4-07-03 a 5-27-03	Observados para saúde global e para eventos adversos pós-vacinação
0	4-07-03	Respectivos IVP administrados aos Grupos 1-8
0-7	4-07-03 a 4-14-03	Porcos observados para reacções de local de injeção
14	4-21-03	Grupos 1-3, 5-8 reforçados com respectivos IVP; sangue amostrado a todos os porcos
14-21	4-21-03 a 4-28-03	Porcos observados para reacções de injeção
19-21	4-26-03 a 4-28-03	Todos os porcos tratados com antibióticos
21	4-28-03	Porcos transportados de Struve Labs, Inc., para Veterinary Resources, Inc. (VRI)
22-50	4-28-03 a 5-27-03	Porcos observados para sinais clínicos pós-estímulo
22	4-29-03	Grupos 1-10 tratados com KLH/ICFA
25	5-02-03	Amostras de sangue recolhidas de todos os porcos; todos os porcos pesados; Grupos 1-9 estimulados com material de estímulo de PCV2
28	5-05-03	Grupos 1-10 tratados com KLH/ICFA
32	5-09-03	Amostras de sangue recolhidas de todos os porcos

(continuação)

Dia de Estudo	Datas Reais	Actividade de Estudo
46	5-23-03	INGELVAC® PRRS MLV administrada a todos os grupos
50	5-27-03	Amostras de sangue recolhidas, todos os porcos pesados e necropsiados; as lesões grosseiras foram registadas; os pulmões foram avaliados para lesões; as amostras de tecido frescas e fixas em formalina foram guardadas; a fase em vida do estudo foi completada

Após a conclusão da fase em vida do estudo, os tecidos fixos em formalina foram examinados por Imuno-histoquímica (IHC) para detecção de antígeno de PCV2, por um patologista, as amostras de sangue foram avaliadas para serologia de PCV2 e o ganho de peso diário médio (ADWG) foi determinado do Dia 25 ao Dia 50.

Os animais foram alojados no primeiro local de estudo, em gaiolas individuais, em sete salas desde o nascimento até, aproximadamente, 11 dias de idade (aproximadamente, Dia 0 do estudo). Cada sala era idêntica em disposição e consistia de gaiolas de aço inoxidável individuais empilhadas, com ar aquecido e filtrado proporcionado separadamente a cada unidade de isolamento. Cada sala tinha aquecimento e ventilação separados, prevenindo, desse modo, a contaminação cruzada de ar entre salas. No segundo local de estudo, os animais foram alojados em dois edifícios diferentes. O Grupo 10 (O grupo de controlo negativo Estrito) foi alojado separadamente num

edifício de criação convertido e os Grupos 1-9 foram alojados em edifício de partos convertido. Cada grupo foi alojado numa pocilga separada (14-15 porcos por pocilga) e cada pocilga proporcionava, aproximadamente, 2,3 pés quadrados por porco. Os Grupos 2, 4 e 8 foram colocados em pocilga em três pocilgas adjacentes num lado da viela e os Grupos 1, 3, 5, 6, 7 e 9 foram colocados em pocilga em seis pocilgas adjacentes no outro lado da viela. A separação de Grupo deveu-se a uma preocupação do Monitor do Estudo, porque as vacinas administradas aos Grupos 2, 4 e 8 não tinham sido totalmente inactivadas. Cada pocilga estava num piso elevado, com pavimentos de ripas de plástico. Um poço debaixo das pocilgas servia como um tanque de retenção para excremento e desperdício. Cada edifício tinha os seus próprios sistemas de aquecimento e ventilação separados, com pouca probabilidade de contaminação cruzada de ar entre edifícios.

No primeiro local de estudo, os leitões foram alimentados com uma ração de leite especialmente formulada desde o nascimento até, aproximadamente, 3 semanas de idade. Todos os leitões estavam a consumir ração mista sólida, especial, até ao Dia 21 (aproximadamente, 4 ½ semanas de idade). No segundo local de estudo, todos os leitões foram alimentados com uma ração mista comercial não medicada personalizada, apropriada para a sua idade e peso, *ad libitum*. A água em ambos os locais de estudo também estava disponível *ad libitum*.

Todos os porcos de teste foram tratados com 1,0 mL de NAXCEL[®], IM, em fossas popliteais alternadas, nos Dias 19, 20 e 21. Além disso, o Porco N^o 11 (Grupo 1) foi tratado com 0,5 mL de NAXCEL[®] IM no Dia 10, o Porco N^o 13 (Grupo 10) foi tratado com 1 mL de Penicilina e 1 mL de PREDEF[®] 2X no Dia 10, o Porco N^o 4 (Grupo 9) foi tratado com 1,0 mL de NAXCEL[®] IM no Dia 11 e os

Porcos 1 (Grupo 1), 4 e 11 foca cada tratados com 1,0 mL de NAXCEL® no Dia 14, por diversas razões de saúde.

Enquanto em ambos os locais de estudo, os porcos estavam sob cuidado veterinário. Os exames de saúde animal foram conduzidos no Dia -3 e foram registados no Formulário de Registo de Exame de Saúde. Antes da vacinação, todos os animais estavam de boa saúde e estado nutricional, como determinado por observação no Dia 0. Antes do estímulo, todos os animais de teste foram observados como estando de boa saúde e estado nutricional. As carcaças e tecidos foram eliminados por entrega. A eliminação final dos animais de estudo foi registada no Registo de Eliminação Animal.

Nos Dias 0 e 14, os porcos atribuídos aos Grupos 1-3 e 5-8 receberam 2,0 mL de Vacinas 1-4 de PCV2 atribuídas, respectivamente, IM na região direita e esquerda do pescoço, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20g x ½" estéril. Os porcos atribuídos ao Grupo 4 receberam 1,0 mL de Vacina Nº 2 de PCV2, IM na região direita do pescoço, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20g x ½" estéril, apenas no Dia 0.

No Dia 22, todos os porcos de teste receberam 2,0 mL de KLH/ICFA, IM na região esquerda do pescoço, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x 1" estéril. No Dia 28, todos os porcos de teste receberam 2,0 mL de KLH/ICFA, na região da fossa poplíteia direita, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x 1" estéril.

No Dia 25, os porcos atribuídos aos Grupos 1-9 receberam 1,0 mL de material de estímulo de ISUVDL de PCV2 ($3,98 \log_{10}$ TCID₅₀/mL), IM na região direita do pescoço, utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x 1" estéril. 1,0 mL adicional do mesmo material foi administrado, IN, a cada porco (0,5 mL por narina), utilizando uma seringa Luer-lock de 3,0 mL estéril e cânula nasal.

No Dia 46, todos os porcos de teste receberam 2,0 mL de INGELVAC® PRRS MLV, IM, na região direita do pescoço, utilizando uma seringa Luer lock de 3,0 mL estéril e uma agulha 20 g x 1" estéril. A PRRSV MLV foi administrada numa tentativa para aumentar a virulência do material de estímulo de PCV2.

Os porcos de teste foram observados diariamente para saúde global e eventos adversos no Dia -3 e do Dia 0 ao Dia 21. Cada dos porcos foi pontuado para comportamento normal ou anormal, respiração ou tosse. As observações foram registadas no Registo de Observação Clínica. Todos os porcos de teste foram observados do Dia 0 ao Dia 7 e o Grupo 7 foi ainda observado do Dia 14 ao 21, para reacções de local de injeção. O ganho de peso diário médio foi determinado pelo peso de cada porco numa balança calibrada nos Dias -3, 25 e 50, ou no dia em que um porco fosse encontrado morto após estímulo. Os pesos corporais foram registados no Formulário de Peso Corporal. Os pesos corporais do Dia -3 foram utilizados para bloquear os porcos antes da aleatorização. Os dados de peso do Dia 25 e Dia 50 foram utilizados para determinar o ganho de peso diário médio (ADWG) para cada porco durante estes intervalos de tempo. Para os porcos que morreram após estímulo e antes do Dia 50, o ADWG foi ajustado para representar o ADWG do Dia 25 ao dia da morte.

De modo a determinar a serologia de PCV2, sangue venoso total foi recolhido de cada leitão do seio venoso orbital nos Dias -3 e 14. Para cada leitão, o sangue foi recolhido do seio venoso orbital pela inserção de um tubo capilar estéril na comissura palpebral medial de um dos olhos e drenagem de, aproximadamente, 3,0 mL de sangue total para dentro de um Tubo Separador de Soro de 4,0 mL (SST). Nos Dias 25, 32 e 50, o sangue venoso total de cada porco foi recolhido da veia cava anterior utilizando uma agulha estéril Vacutainer® 20 g x 1 ½" (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jérсия), um suporte de agulhas Vacutainer® e um SST de 13 mL. As recolhas de sangue em cada intervalo de tempo foram registadas no Registo de Recolha de Amostras. O sangue em cada SST foi deixado coagular, cada SST foi, depois, centrifugado e o soro recolhido. O soro recolhido foi transferido para um tubo estéril e armazenado a -70 ± 10 °C até ser testado numa data ulterior. As amostras de soro foram testadas para a presença de anticorpos de PCV2 por pessoal de BIVI-R&D.

Os porcos foram observados uma vez, diariamente, do Dia 22 ao Dia 50 para sintomas clínicos e pontuados para comportamento normal ou anormal, respiração ou tosse. As observações clínicas foram registadas no Registo de Observação Clínica.

Os porcos N° 46 (Grupo 1) e 98 (Grupos 9) morreram no primeiro local de estudo. Ambas estas mortes foram categorizadas como mortes de sangramento e as necropsias não foram conduzidas nestes dois porcos. No segundo local de estudo, os porcos que morreram após estímulo e antes do Dia 50 e os porcos eutanasiados no dia 50 foram necropsiados. Quaisquer lesões grosseiras foram anotadas e as percentagens de lobos pulmonares

com lesões foram registadas no Formulário de Relatório de Necropsia.

De cada dos porcos necropsiados no segundo local de estudo, uma amostra de tecido de amígdala, pulmão, coração e nódulo linfático mesentérico foi colocada num único recipiente com formalina a 10% tamponada; enquanto outra amostra de tecido dos mesmos órgãos mencionados acima foi colocada num Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, RU) e cada Whirl-pak® foi colocado sobre gelo. Cada recipiente foi devidamente rotulado. As recolhas de amostras foram registadas no Formulário de Relatório de Necropsia. Depois, as amostras de tecido fixas em formalina e um Formulário de Pedido de Diagnóstico foram submetidos para testes de IHC. Os testes de IHC foram conduzidos de acordo com processos laboratoriais padrão para recepção de amostras, preparação de amostras e lâminas e técnicas de coloração. Os tecidos frescos em Whirl-pak® foram enviados com sacos de gelo para a Monitorização de Estudo para armazenamento ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ} \text{ C}$) e possível utilização futura.

Os tecidos fixos em formalina foram examinados por um patologista para detecção de PCV2 por IHC e pontuados utilizando o seguinte sistema de pontuação: 0 = Nenhum; 1 = Coloração positiva escassa, poucos locais; 2 = Coloração positiva moderada, múltiplos locais; e 3 = Coloração positiva abundante, difusa por todo o tecido. Para fins analíticos, uma pontuação de 0 foi considerada "negativa" e uma pontuação superior a 0 foi considerada "positiva".

Resultados

Os resultados para este exemplo são dados abaixo. Importa notar que os Porcos N° 46 e 98 morreram nos Dias 14 e 25, respectivamente. Estas mortes foram categorizadas como mortes de sangramento. O Porco N° 11 (Grupo 1) estava ofegante, com respiração rápida, no Dia 15. De outro modo, durante este período de observação, todos os porcos eram normais em comportamento, respiração e tosse e não foram notados eventos adversos sistémicos com quaisquer grupos. Não foram notadas reacções de local de injeção após a vacinação no Dia 0. Após a vacinação no Dia 14, sete (7) em catorze (14) porcos do Grupo 1 (50,0%) tiveram inchaço, com uma pontuação de "2" no Dia 15. Quatro (4) em catorze (14) do Grupo 1 (28,6%) tiveram ainda um inchaço de "2" no Dia 16. Nenhum dos outros grupos sentiu reacções de local de injeção após qualquer vacinação.

Os resultados de ganho de peso diário médio (ADWG) são apresentados abaixo na Tabela 18. Os Porcos N° 46 e 98 que morreram de sangramento foram excluídos dos resultados de grupo. O Grupo 4, o qual recebeu uma dose de 16 µg de vORF2 - Carbopol, teve o ADWG mais elevado ($1,16 \pm 0,26$ lb/dia), seguido dos Grupos 1, 2, 3, 5, 6 e 10, os quais tiveram ADWG que variaram desde $1,07 \pm 0,23$ lb/dia a $1,11 \pm 0,26$ lb/dia. O Grupo 9 teve o ADWG mais baixo ($0,88 \pm 0,29$ lb/dia), seguido dos Grupos 8 e 7, os quais tiveram ADWG de $0,93 \pm 0,33$ lb/dia e $0,99 \pm 0,44$ lb/dia, respectivamente.

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

Grupo	Tratamento	N	ADWG - lb/dia (Dia 25 ao Dia 50) ou ajustado para porcos mortos antes do Dia 50
1	rORF2 - 16 µg - IMS 1314 2 doses	14	1,08 ± 0,30 lb/dia
2	vORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	1,11 ± 0,16 lb/dia
3	rORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	1,07 ± 0,21 lb/dia
4	vORF2 - 16 µg - Carbopol 1 dose	15	1,16 ± 0,26 lb/dia
5	rORF2 - 4 µg - Carbopol 1 dose	15	1,07 ± 0,26 lb/dia
6	rORF2 - 1 µg - Carbopol 2 doses	15	1,11 ± 0,26 lb/dia
7	rORF2 - 0,25 µg - Carbopol 2 doses	15	0,99 ± 0,44 lb/dia
8	KV > 8,0 log - Carbopol 2 doses	15	0,93 ± 0,33 lb/dia
9	Controlos de Estímulo	14	0,88 ± 0,29 lb/dia
10	Controlos Negativos Estritos	15	1,07 ± 0,23 lb/dia

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

Os resultados de serologia de PCV2 são apresentados abaixo na Tabela 19. Todos os dez (10) grupos eram seronegativos para PCV2 no Dia -3. No Dia 14, os títulos de PCV2 permaneceram baixos para todos os dez (10) grupos (gama de 50-113). No Dia 25, o Grupo 8, o qual recebeu a vacina de vírus morto de célula intacta, teve o título de PCV2 mais elevado (4617), seguido do Grupo 2, o qual recebeu 16 µg de vORF2 - Carbopol, Grupo 4, o qual recebeu como dose única de 16 µg de vORF2 - Carbopol e Grupo 3, o qual recebeu 16 µg de rORF2 - Carbopol, o qual teve títulos de 2507, 1920 e 1503, respectivamente. No Dia 32 (uma semana após estímulo), os títulos para os Grupos 1-6 e Grupo 8 variaram desde 2360 a 7619; enquanto os Grupos 7 (0,25 µg de rORF2 - Carbopol), 9 (Controlo de Estímulo) e 10 (controlo negativo Estrito) tiveram títulos de 382, 129 e 78, respectivamente. No Dia 50 (dia de necropsia), todos os dez (10) grupos demonstraram títulos elevados de PCV2 (≥ 1257).

Nos Dias 25, 32 e 50, o Grupo 3, o qual recebeu duas doses de 16 µg de rORF2 - Carbopol, teve títulos de anticorpo mais elevados do que o Grupo 1, o qual recebeu duas doses de 16 µg de rORF2 - IMS 1314. Nos Dias 25, 32 e 50, o Grupo 2, o qual recebeu duas doses de 16 µg de vORF2, teve títulos mais elevados do que o Grupo 4, o qual recebeu apenas uma dose da mesma vacina. Os Grupos 3, 5, 6, 7, os quais receberam níveis decrescentes de rORF2 - Carbopol, de 16, 4, 1 e 0,25 µg, respectivamente, demonstraram títulos de anticorpo correspondentemente decrescentes nos Dias 25 e 32.

Tabela 19. Sumário de Títulos de IFA de PCV2 de Grupo

Grupo	Tratamento	Dia -3	Dia 14**	Dia 25***	Dia 32	Dia 50****
1	rORF2 - 16 µg - IMS 1314 2 doses	50	64	646	3326	4314
2	vORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2 - 16 µg - Carbopol 1 dose	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2 - 4 µg - Carbopol 1 dose	50	61	1867	3933	4533
6	rORF2 - 1 µg - Carbopol 2 doses	50	70	490	2360	5740
7	rORF2 - 0,25 µg - Carbopol 2 doses	50	73	63	382	5819
8	KV > 8,0 log - Carbopol 2 doses	50	97	4617	7619	10817
9	Controlos de Estímulo	50	53	50	129	4288
10	Controlos Negativos Estritos	50	50	50	78	11205

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

*Para fins de cálculo, um título de IFA ≤100 foi designado como um título de "50"; um título de IFA ≥6400 foi designado como um título de "12800",

**Dia de Estímulo

***Dia de Necropsia

Os resultados das observações clínicas pós-estímulo são apresentados abaixo. A Tabela 20 inclui observações para Comportamento Anormal, Respiração Anormal, Tosse e Diarreia. A Tabela 21 inclui os resultados do Sumário de Incidência Global de Grupo de Sintomas Clínicos e a Tabela 22 inclui resultados do Sumário de Taxas de Mortalidade de Grupo Pós-estímulo. A incidência de comportamento anormal, respiração e tosse pós-estímulo foi baixa em porcos recebendo 16 µg de rORF2-IMS 1314 (Grupo 1), 16 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 3), 1 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 6), 0,25 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 7) e em porcos no Grupo de Controlo de Estímulo (Grupo 9). A incidência de comportamento anormal, respiração e tosse pós-estímulo foi zero em porcos recebendo 16 µg de vORF2-Carbopol (Grupo 2), uma única dose de 16 µg de vORF2-Carbopol (Grupo 4), 4 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 5), KV >8 log - Carbopol (Grupo 8) e em porcos no grupo de controlo negativo estrito (Grupo 10).

A incidência global de sintomas clínicos variou entre grupos. Os porcos recebendo 16 µg de vORF2-Carbopol (Grupo 2), uma dose única de 16 µg de vORF2-Carbopol (Grupo 4) e porcos no grupo de controlo negativo Estrito (Grupo 10) tiveram taxas de incidência de 0%; os porcos recebendo 16 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 3) e 1 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 6) tiveram taxas de incidência de 6,7%; os porcos recebendo 16 µg de rORF2-IMS 1314 (Grupo 1) tiveram uma taxa de incidência global de 7,1%; os porcos recebendo 4 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 5), 0,25 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 7) e vacina de KV >8 log tiveram taxas de

incidência de 13,3%; e os porcos no Grupo de Controlo de Estímulo (Grupo 9) tiveram uma taxa de incidência de 14,3%.

As taxas de mortalidade global entre grupos também variaram. O Grupo 8, o qual recebeu 2 doses de vacina de KV, teve a taxa de mortalidade mais elevada de 20,0%; seguido do Grupo 9, o grupo de controlo de estímulo, e o Grupo 7, o qual recebeu 0,25 µg de rORF2-Carbopol, e tiveram taxas de mortalidade de 14,3% e 13,3%, respectivamente. O Grupo 4, o qual recebeu uma dose de 16 µg de vORF2-Carbopol, teve uma taxa de mortalidade de 6,7%. A totalidade dos outros Grupos, 1, 2, 3, 5, 6, e 10, teve uma taxa de mortalidade de 0%.

Tabela 20. Sumário de Observações de Grupo para Comportamento Anormal, Respiração Anormal e Tosse Pós-estímulo

Grupo	Tratamento	N	Comportamento Anormal ¹	Comportamento Anormal ²	Tosse ³
1	rORF2 - 16 µg - IMS 1314 2 doses	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7,1%)
2	vORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
4	vORF2 - 16 µg - Carbopol 1 dose	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2 - 4 µg - Carbopol 1 dose	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)

(continuação)

Grupo	Tratamento	N	Comportamento Anormal ¹	Comportamento Anormal ²	Tosse ³
6	rORF2 - 1 µg - Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
7	rORF2 - 0,25 µg - Carbopol 2 doses	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)
8	KV > 8,0 log - Carbopol 2 doses	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
9	Controlos de Estímulo	14	1/14 (7,1 %)	1/14 (7,1 %)	2/14 (14/3%)
10	Controlos Negativos Estritos	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

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

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

³Número total de porcos em cada grupo que demonstrou uma tosse durante, pelo menos, um dia

Tabela 21. Sumário de Incidência Global de Grupo de Sintomas Clínicos Pós-estímulo

Grupo	Tratamento	N	Incidência de porcos com Sintomas Clínicos ¹	Taxa de Incidência
1	rORF2 - 16 µg - IMS 1314 2 doses	14	1	7,1%
2	vORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	0	0,0%

(continuação)

Grupo	Tratamento	N	Incidência de porcos com Sintomas Clínicos ¹	Taxa de Incidência
3	rORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	1	6,7%
4	vORF2 - 16 µg - Carbopol 1 dose	15	0	0,0%
5	rORF2 - 4 µg - Carbopol 1 dose	15	2	13,3%
6	rORF2 - 1 µg - Carbopol 2 doses	15	1	6,7%
7	rORF2 - 0,25 µg - Carbopol 2 doses	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log - Carbopol 2 doses	15	2	13,3%
9	Controlos de Estímulo	14	2	14,3%
10	Controlos Negativos Estritos	15	0	0,0%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

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

Tabela 22. Sumário de Taxas de Mortalidade de Grupo Pós-Estímulo

Grupo	Tratamento	N	Morte Pós-estímulo	Taxa de Mortalidade
1	rORF2 - 16 µg - IMS 1314 2 doses	14	0	0,0%
2	vORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	0	0,0%

(continuação)

Grupo	Tratamento	N	Morte Pós-estímulo	Taxa de Mortalidade
3	rORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	0	0,0%
4	vORF2 - 16 µg - Carbopol 1 dose	15	1	6,7%
5	rORF2 - 4 µg - Carbopol 1 dose	15	0	0,0%
6	rORF2 - 1 µg - Carbopol 2 doses	15	0	0,0%
7	rORF2 - 0,25 µg - Carbopol 2 doses	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log - Carbopol 2 doses	15	3	20,0%
9	Controlos de Estímulo	14	2	14,3%
10	Controlos Negativos Estritos	15	0	0,0%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

O Sumário de Percentagem Média de Grupo de Lesões Pulmonares e Diagnóstico Experimental é dado abaixo na Tabela 23. O Grupo 9, o grupo de controlo de estímulo, teve a percentagem mais elevada de lesões pulmonares, com uma média de $10,81 \pm 23,27\%$, seguido do Grupo 7, o qual recebeu 0,25 µg de rORF2-Carbopol e teve uma média de $6,57 \pm 24,74\%$, Grupo 5, o qual recebeu 4 µg de rORF2-Carbopol e teve uma média de $2,88 \pm 8,88\%$ e Grupo 8, o qual recebeu a vacina de KV e teve uma média de $2,01 \pm 4,98\%$. Os restantes seis (6) grupos tiveram percentagem média inferior de lesões pulmonares que variou de $0,11 \pm 0,38\%$ a $0,90 \pm 0,15\%$.

O diagnóstico experimental de pneumonia variou entre os grupos. O Grupo 3, o qual recebeu duas doses de 16 µg de rORF2-Carbopol, teve o diagnóstico experimental de pneumonia mais baixo, com 13,3%. O Grupo 9, o grupo de controlo de estímulo, teve 50% do grupo diagnosticado experimentalmente com pneumonia, seguido do Grupo 10, o grupo de controlo negativo estrito e o Grupo 2, o qual recebeu duas doses de 16 µg de vORF2-Carbopol, com 46,7% de 40%, respectivamente, diagnosticados experimentalmente com pneumonia.

Os Grupos 1, 2, 3, 5, 9 e 10 tiveram 0% do grupo diagnosticado experimentalmente como infectado com PCV2; enquanto o Grupo 8, o qual recebeu duas doses de vacina de KV, teve a taxa de grupo mais elevada de diagnóstico experimental de infecção de PCV2, 20%. O Grupo 7, o qual recebeu duas doses de 0,25 µg de rORF2-Carbopol, e o Grupo 4, o qual recebeu uma dose de 16 µg de vORF2-Carbopol, tiveram diagnósticos de grupo experimentais de infecção de PCV2 em 13,3% e 6,7% de cada grupo, respectivamente.

As úlceras gástricas foram apenas diagnosticadas num porco no Grupo 7 (6,7%); enquanto os outros 9 grupos permaneceram livres de úlceras gástricas.

Tabela 23. Sumário de % Média de Grupo de Lesão Pulmonar e Diagnóstico Experimental

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que libertaram durante, pelo menos, um dia	Taxa de Incidência
1	rORF2 = 16 µg - IMS 1314 2 doses	15	0	0%
2	vORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	1	6,7%
3	rORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	3	20,0%
4	vORF2 - 16 µg - Carbopol 1 dose	15	2	13,3%
5	rORF2 - 4 µg - Carbopol 1 dose	15	3	20,0%
6	rORF2 - 1 µg - Carbopol 2 doses	15	6	40,0%
7	rORF2 - 0,25 µg - Carbopol 2 doses	15	7	46,7%
8	KV > 8,0 log - Carbopol 2 doses	15	12	80%
9	Controlos de Estímulo	14	14	100,0%
10	Controlos Negativos Estritos	15	14	93,3%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

O Sumário dos Resultados de Incidência Positiva de IHC de Grupo é mostrado abaixo na Tabela 24. O Grupo 1 (16 µg de rORF2 - IMS 1314) teve a taxa de grupo mais baixa de resultados positivos de IHC, com 0% dos porcos positivos para PCV2, seguido do Grupo 2 (16 µg de vORF2 - Carbopol) e Grupo 4 (dose única de 16 µg de vORF2 - Carbopol), os quais tiveram taxas de IHC de grupo de 6,7% e 13,3%, respectivamente. O Grupo 9, o grupo de controlo de estímulo, teve a taxa de incidência positiva de IHC mais elevada, com 100% dos porcos positivos para PCV2, seguido do Grupo 10, o grupo de controlo negativo estrito e Grupo 8 (vacina de KV), com 93,3% e 80% dos porcos positivos para PCV2, respectivamente.

Tabela 24. Sumário de Taxa de Incidência Positiva de IHC de Grupo

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que libertaram durante, pelo menos, um dia	Taxa de Incidência
1	rORF2 - 16 µg - IMS 1314 2 doses	15	0	0%
2	vORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	1	6,7%
3	rORF2 - 16 µg - Carbopol 2 doses	15	3	20,0%
4	vORF2 - 16 µg - Carbopol 1 dose	15	2	13,3%
5	rORF2 - 4 µg - Carbopol 1 dose	15	3	20,0%

(continuação)

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que libertaram durante, pelo menos, um dia	Taxa de Incidência
6	rORF2 - 1 µg - Carbopol 2 doses	15	6	40,0%
7	rORF2 - 0,25 µg - Carbopol 2 doses	15	7	46,7%
8	KV > 8,0 log - Carbopol 2 doses	15	12	80%
9	Controlos de Estímulo	14	14	100,0%
10	Controlos Negativos Estritos	15	14	93,3%

vORF2 = ORF2 viral isolada; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou vírus de célula intacta morto = vírus PCV2 cultivado em cultura celular adequada

Discussão

Neste exemplo, foram avaliadas sete vacinas de PCV2, as quais incluíam uma dose elevada (16 µg) de antígeno de rORF2 com o adjuvante IMS 1314 administrado duas vezes, uma dose elevada (16 µg) de antígeno de vORF2 com o adjuvante Carbopol administrado uma vez a um grupo de porcos e duas vezes a um segundo grupo de porcos, uma dose elevada (16 µg) de antígeno de rORF2 com o adjuvante Carbopol administrado duas vezes, uma dose de 4 µg de antígeno de rORF2 com o adjuvante Carbopol administrado duas vezes, uma dose de 1 µg de antígeno de rORF2

com o adjuvante Carbopol administrado duas vezes, uma dose baixa (0,25 µg) de antígeno de rORF2 com o adjuvante Carbopol administrado duas vezes e uma dose elevada (> 8 log) de vacina de PCV2 de célula intacta morta com o adjuvante Carbopol. Globalmente, o Grupo 1, o qual recebeu duas doses de 16 µg de rORF2 - IMS 1314, teve um desempenho ligeiramente melhor do que os Grupos 2 até 7, os quais receberam vacinas contendo diversos níveis de antígeno de vORF2 ou rORF2 com o adjuvante Carbopol e muito melhor do que o Grupo 8, o qual recebeu duas doses de vacina de PCV2 de célula intacta morta. O Grupo 1 teve o terceiro ADWG mais elevado ($1,80 \pm 0,30$ lb/dia), a incidência mais baixa de comportamento anormal (0%), a incidência mais baixa de respiração anormal (0%), uma baixa incidência de tosse (7,1%), uma baixa incidência de sintomas clínicos globais (7,1%), ficou empatado com três outros grupos para a taxa de mortalidade mais baixa (0%), a segunda taxa mais baixa para % média de lesões pulmonares ($0,15 \pm 0,34\%$), a segunda taxa mais baixa para pneumonia (21,4%) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos de IHC positivos (0%). O Grupo 1 foi, contudo, o único grupo no qual foram notadas as reações de local de injeção, as quais incluíam 50% dos vacinados 1 dia após a segunda vacinação. As outras vacinas administradas aos Grupos 2 até 7 tiveram um desempenho melhor do que a vacina inativada e quase tão bom quanto a vacina administrada ao Grupo 1.

O Grupo 8, o qual recebeu duas doses de vacina de PCV2 morta com o adjuvante Carbopol, teve o pior conjunto de resultados para qualquer grupo vacinal. O Grupo 8 teve o ADWG mais baixo ($0,93 \pm 0,33$ lb/dia), a segunda taxa mais elevada de comportamento anormal (6,7%), a taxa mais elevada de respiração anormal (6,7%), estava empatado com três outros grupos para a taxa de incidência global mais elevada de sintomas clínicos

(13,3%), teve a taxa de mortalidade mais elevada de todos os grupos (20%) e teve a taxa de IHC positiva mais elevada (80%) de qualquer grupo vacinal. Existiu a preocupação de que a vacina de PCV2 de célula intacta morta pudesse não ter sido totalmente inactivada antes da administração ao Grupo 8, o que pode explicar estes fracos resultados do grupo. Infelizmente, não estavam disponíveis dados definitivos para confirmar esta preocupação. Globalmente, no contexto deste exemplo, uma vacina de PCV2 Morta Convencional não ajudou na redução de doença associada a PCV2.

Como mencionado anteriormente, não foram associados eventos adversos às vacinas de teste, com excepção da vacina com o adjuvante IMS 1314. As reacções de local de injeção foram notadas em 50,0% dos porcos, 1 dia após a segunda vacinação com a vacina formulada com IMS 1314 e em 28,6% dos porcos, 2 dias após a segunda vacinação. Não foram notadas reacções em quaisquer porcos recebendo vacinas com o adjuvante Carbopol. Quaisquer estudos adicionais que incluam porcos vacinados com vacinas com o adjuvante IMS 1314 devem continuar a monitorizar de perto porcos para reacções de local de injeção.

Todos os porcos eram seronegativos para PCV2 no Dia -3 e apenas o Grupo 2 teve um título acima de 100 no Dia 14. No Dia 25 (dia de estímulo), o Grupo 8 teve o título mais elevado de anticorpo de PCV2 (4619), seguido do Grupo 2 (2507). Com a excepção dos Grupos 7, 9 e 10, todos os grupos demonstraram uma forte resposta de anticorpo no Dia 32. No Dia 50, todos os grupos, incluindo os Grupos 7, 9 e 10, demonstraram uma forte resposta de anticorpo.

Um dos traços distintivos da infecção de PCV2 de fase tardia e subsequente desenvolvimento de PMWS é a retardação do crescimento em porcos desmamados e, em casos graves, é notada a perda de peso. O ganho de peso diário médio de grupos é um método quantitativo de demonstrar a retardação do crescimento ou perda de peso. Neste exemplo, não existiu uma grande diferença em ADWG entre grupos. O Grupo 8 teve o ADWG mais baixo, de $0,88 \pm 0,29$ lb/dia, enquanto o Grupo 4 teve o ADWG mais elevado, de $1,16 \pm 0,26$ lb/dia. No contexto deste estudo, não existiu uma diferença suficiente entre grupos para basear a eficácia vacinal futura em ADWG.

Além da perda de peso - dispneia, letargia, palidez da pele e, por vezes, íctero são sintomas clínicos associados a PMWS. Neste exemplo, comportamento anormal e respiração anormal e tosse, foram notados raramente para cada grupo. Como evidenciado neste estudo, este modelo de estímulo e estirpe de estímulo não resultam em sintomas clínicos esmagadores e este não é um forte parâmetro sobre o qual basear a eficácia vacinal.

Globalmente, neste exemplo, as taxas de mortalidade não foram elevadas e a ausência de uma taxa de mortalidade elevada no grupo de controlo de estímulo limita este parâmetro sobre o qual basear a eficácia vacinal. Antes do Dia 46, os Grupos 4 e 7 tiveram, cada, um em quinze porcos mortos, o Grupo 9 teve dois em catorze porcos mortos e o Grupo 8 teve três em quinze porcos mortos. Devido ao facto de o Grupo 9, o grupo de controlo de estímulo, não ter demonstrado sintomas clínicos de PCV2 e tenham ocorrido apenas duas mortes neste grupo até ao Dia 46, a vacina de MLV do Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Porcina (PRRSV) foi administrada a todos os porcos no Dia 46. Estudos anteriores utilizaram INGELVAC® PRRS MLV como um imunoestimulante

para exasperar a doença de PMWS associada a PCV2 e as taxas de mortalidade foram mais elevadas nestes estudos anteriores. Ocorreram duas mortes pouco depois da administração da vacina de PRRS no Dia 46 - o Grupo 4 teve uma morte no Dia 46 e o Grupo 7 teve uma morte no Dia 47 - as quais, provavelmente, não estavam associadas à administração da vacina de PRRS. No Dia 50, o Grupo 8, o qual recebeu duas doses de vacina inactivada, teve a taxa de mortalidade mais elevada (20%), seguido do Grupo 9 (controlo de estímulo) e Grupo 7 (0,25 µg de rORF2 - Carbopol), com taxa de mortalidade de 14,3% e 13,3%, respectivamente. Globalmente, a administração da vacina de PRRS ao modelo de estímulo mais tarde na fase de observação de pós-estímulo deste exemplo não aumentou significativamente as taxas de mortalidade.

As lesões grosseiras em porcos com PMWS secundária à infecção de PCV2, tipicamente, consistem de linfadenopatia generalizada, em combinação com um ou mais dos seguintes: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou íctero, (3) fígados atroficos mosqueados, (4) úlceras gástricas e (5) nefrite. Na necropsia (Dia 50), íctero, hepatite e nefrite não foram notados em quaisquer grupos. Uma úlcera gástrica foi notada num porco do Grupo 7, mas a linfadenopatia não foi especificamente examinada. Com base na presença de lesões que eram consistentes com infecção de PCV2, três grupos tiveram, pelo menos, um porco experimentalmente diagnosticado com PCV2 (PMWS). O Grupo 8, o qual recebeu duas doses de vacina inactivada, foi 20% diagnosticado experimentalmente com PCV2, enquanto o Grupo 7 e Grupo 4 foram 13,3% e 6,7%, respectivamente, experimentalmente diagnosticados com PCV2. A % média de pontuações de lesões pulmonares variou entre grupos na necropsia. Os Grupos 1, 2, 3, 4, 6 e 10 tiveram baixa % de pontuações de lesões pulmonares, que variou desde $0,11 \pm 0,38\%$ a

0,90 ± 0,15%. Como esperado, o Grupo 9, o grupo de controlo de estímulo, teve a % média mais elevada de pontuação de lesão pulmonar (10,81 ± 23,27%). Em quatro grupos, a % média de pontuações de lesões pulmonares foi elevada, devido a um a três porcos em cada destes grupos ter pontuações de lesões pulmonares muito elevadas. As lesões pulmonares eram vermelhidão/púrpura e consolidadas. Tipicamente, as lesões pulmonares associadas a PMWS são descritas como castanho-claras, não colapsáveis, com edema interlobular. As lesões pulmonares notadas neste estudo ou não estavam associadas a infecção de PCV2 ou pode ter estado presente um segundo agente infeccioso pulmonar. No contexto deste estudo, a % de pontuações de lesões pulmonares provavelmente não reflecte uma verdadeira medida da quantidade de infecção pulmonar devido a PCV2. Do mesmo modo, o diagnóstico experimental de pneumonia também pode ter sido sobreutilizado. Quaisquer porcos com lesões pulmonares, algumas tão pequena quanto 0,10%, foram listados com um diagnóstico experimental de pneumonia. Neste exemplo, não existiu diferença suficiente entre grupos com respeito a lesões grosseiras e % de lesões pulmonares sobre as quais basear a eficácia vacinal.

Os resultados de IHC mostram as maiores diferenças entre grupos. O Grupo 1 (16 µg de rORF2 - IMS 1314) teve os resultados de IHC positivos mais baixos para antígeno de PCV2 (0%); enquanto os Grupos 9 e 10 tiveram os resultados de IHC positivos mais elevados, com taxas de incidência de 100% e 93,3%, respectivamente. Os Grupos 3, 5, 6 e 7, os quais receberam 16, 4, 1 ou 0,25 µg de antígeno de rORF2, respectivamente, com o adjuvante Carbopol, tiveram taxas positivas de IHC de 20%, 20%, 40% e 46,7%, respectivamente. O Grupo 2, o qual recebeu duas doses de 16 µg de vORF2 com o adjuvante Carbopol, teve uma taxa positiva de IHC de 6,7%, enquanto o Grupo 4, o qual recebeu

apenas uma dose da mesma vacina, teve uma taxa positiva de IHC de 13,3%. Devido à natureza objectiva deste teste e ao facto de que os resultados de IHC se correlacionaram com resultados esperados, os testes de IHC são provavelmente um dos melhores parâmetros sobre os quais basear a eficácia vacinal.

É determinada a Dosagem Mínima Protectora (MPD) do antígeno de rORF2 de PCV2 com o adjuvante Carbopol no modelo de porco de CDCD perante um estímulo de PCV2. Os Grupos 3, 5, 6 e 7 receberam, cada, duas doses de antígeno de rORF2 com o adjuvante Carbopol, mas o nível de antígeno de rORF2 variou para cada grupo. Os Grupos 3, 5, 6 e 7 receberam, cada, 16, 4, 1 ou 0,25 µg de antígeno de rORF2, respectivamente. Em geral, diminuindo o nível de antígeno de rORF2 diminuía os títulos de anticorpo de PCV2 e aumentava a taxa de mortalidade, % média de lesões pulmonares e a incidência de tecidos positivos de IHC. Dos quatro grupos recebendo níveis variáveis de rORF2 - Carbopol, os Grupos 3 e 5, os quais receberam duas doses de 16 ou 4 µg de antígeno de rORF2, respectivamente, tiveram, cada, uma taxa positiva de IHC de apenas 20% e tiveram, cada, títulos de anticorpo semelhantes. Globalmente, com base nos resultados positivos de IHC, a dosagem mínima protectora de antígeno de rORF2, administrado duas vezes, é, aproximadamente, 4 µg.

A antigenicidade dos antígenos de PCV2 recombinante (rORF2) e VIDO R-1 (vORF2) foi avaliada. O Grupo 2 recebeu duas doses de 16 µg de vORF2 e o Grupo 3 recebeu duas doses de 16 µg de rORF2. Ambas as vacinas tinham adjuvante de Carbopol. Ambas as vacinas verificaram ser seguras e ambas tiveram taxa de mortalidade de 0%. O Grupo 2 teve um título de anticorpo de PCV2 de 2507 no Dia 25, enquanto o Grupo 3 teve um título de

anticorpo de PCV2 de 1503. O Grupo 3 teve uma % média de pontuação de lesão pulmonar inferior ao Grupo 2 ($0,11 \pm 0,38\%$ vs. $0,90 \pm 0,15\%$), mas o Grupo 2 teve uma taxa de incidência positiva de IHC mais baixa do que o Grupo 3 ($6,7\%$ vs. 20%). Globalmente, ambas as vacinas tiveram antigenicidade semelhante, mas a vORF2 estava associada a resultados de IHC ligeiramente melhores.

A adequação de dois adjuvantes diferentes (Carbopol e IMS 1314) foi determinada. Os Grupos 1 e 3 receberam ambos duas doses de vacina contendo $16 \mu\text{g}$ de antígeno de rORF2, mas o Grupo 1 recebeu o antígeno com o adjuvante IMS 1314, enquanto o Grupo 3 recebeu o antígeno com o adjuvante Carbopol. Ambos os grupos tiveram, essencialmente, o mesmo ADWG, essencialmente, a mesma incidência de sinais clínicos pós-estímulo, a mesma taxa de mortalidade e, essencialmente, a mesma % média de lesões pulmonares; mas o Grupo 1 teve uma taxa positiva de IHC de 0% , enquanto o Grupo 3 teve uma taxa positiva de IHC de 20% . Contudo, o Grupo 3, o qual recebeu a vacina com o adjuvante Carbopol teve títulos de PCV2 de IFAT mais elevados nos Dias 25, 32 e 50 do que o Grupo 1, o qual recebeu a vacina com o adjuvante IMS 1314. Globalmente, embora a vacina de PCV2 com o adjuvante IMS 1314 proporcionasse melhores resultados de IHC, não proporcionou protecção esmagadoramente melhor da infecção de PCV2 e induziu reacção de local de injeção. Embora a vacina de PCV2 com o adjuvante Carbopol tivesse um desempenho quase tão bom quanto a vacina com o adjuvante IMS 1314, mas não estava associada a quaisquer eventos adversos.

A exequibilidade de ORF2 de PCV2 como um produto de 1 dose de 1 mL foi determinada. Os Grupos 2 e 4 receberam ambos $16 \mu\text{g}$ de vacina de vORF2 com o adjuvante Carbopol no Dia 0, mas o

Grupo 2 recebeu uma segunda dose no Dia 14. O Grupo 4 teve um ADWG ligeiramente mais elevado e uma % média de lesões pulmonares mais baixa do que o Grupo 2, mas o Grupo 2 teve títulos de PCV2 de IFAT mais elevados no Dia 25, 32 e 50 e uma taxa de incidência ligeiramente mais baixa de tecidos positivos de IHC. Todos os outros resultados para estes dois grupos eram semelhantes. Globalmente, uma dose de vORF2 com o adjuvante Carbopol teve um desempenho semelhante a duas doses da mesma vacina.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Roof, Mike

Eichmeyer, Mark

Nitzel, Greg

Schaeffer, Merrill

Hayes, Phillip

<120> COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DE PCV2 E MÉTODOS DE
PRODUÇÃO DESSAS COMPOSIÇÕES

<130> 34816-CIP1

<140> DESCONHECIDO

<141> 2005-01-10

<150> Desconhecido

<151> 2004-12-30

<160> 11

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta é uma sequência de Kozak modificada.

<400> 1

ccgccatg

8

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta é uma sequência de EcoR1 recombinante.

<400> 2

gaattc

6

<210> 3

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovírus porcino

<400> 3

cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc	60
ttggccagat cctccgccgc cgcacctggc tegtccaccc ccgccaccgc taccgttgga	120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctccgcac cttcggatat actgtggaga	180
aggaaaaatg gcattctcaa caccgcctc tccgcacct tcggatatac tgtgacgact	240
ttgttcccc gggagggggg accaacaata tctctatacc ctttgaatac tacagaataa	300
gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg	360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg	420
acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc	480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca	540
aaaggtaatc gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg	600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg	660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaaatg aat	713

<210> 4

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 4

```
ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc      60
ttggccagat cctccgccgc cgcacctggc tegtccaccc ccgccaccgc taccgttgga      120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctccgcac ctcggatat actgtcaagg      180
ctaccacagt cacaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact      240
ttgttcccc  gggagggggg accaacaaaa tctctatacc cttgaatac tacagaataa      300
gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg      360
gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg      420
acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatcccca acccttctcc taccactccc      480
gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca      540
aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg      600
gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg      660
tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc          713
```

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 5

```
Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1          5          10          15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
          20          25          30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
          35          40          45
```

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 6

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
180 185 190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225 230

<210> 7

<211> 756

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta sequência é de fase de leitura aberta 2 de circovírus porcino tipo 2, juntamente com uma porção do vector pGEM T-easy.

<400> 7

gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcgttaccg cagaagaaga	60
caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgccgcc gccctggct cgtccacccc	120
cgccaccgct accgttggag aaggaaaaat ggcatttca acaccgcct ctccgcacc	180
ttcgatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgccct cctgggcggt ggacatgatg	240
agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc	300
tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggccctgctc ccccatcacc	360
cagggtgata ggggagtggg ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag	420
gccacagccc taacctatga cccatatgta aactactcct cccgccatac aatcccccaa	480
cccttctcct accactcccg ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat	540
tacttccaac caaataacaa aaggaaatcag ctttggtgta ggctacaaac ctctagaaat	600
gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat	660
atccgtgtaa ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagacct cccacttgaa	720
ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggccgc	756

<210> 8

<211> 10387

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta é a construção de ORF2 de circovírus porcino tipo 2, a qual inclui as sequências codificantes de baculovírus e pGEM T-easy.

<400> 8

```
aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgtttatg agataagatt      60
gaaagcacgt gtaaaatgtt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt      120
ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacctttgc ggcccagatt gtttgcgtac      180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt      240
ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca ttttttgcgg      300
gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata      360
gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa tttacagaaa agtgtcccgg catgtttggtg      420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgcag atatttaatg      480
cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac      540
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc      600
tttaacaaat actttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaacta      660
tgcttcgctt gctccgttta gcttgtagcc gatcagtggc gttgttccaa tcgacggtag      720
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttacgt ttatgctttt      780
ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgcgg tcgcgcgtca      840
cgcacaacac cggatgtttg cgcttgctcg cgggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat      900
ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttcgtctt      960
tcttttgcat ggtttcctgg aagccggtgt acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg     1020
tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgtccttgat ggcaacgatg cgttcaataa     1080
actcttgttt tttaacaagt tcctcggttt tttgcgccac caccgcttgc agcgcgtttg     1140
tgtgctcggt gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctcccgtt     1200
gtttgatcgc gggatcgtag ttgccggtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa     1260
gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc     1320
cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaaatacag cgggtcgcgc cttttcacga     1380
cgctgttaga ggtagggccc ccattttgga tggctctgctc aaataacgat ttgtatttat     1440
tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaaactg ttagcgacgt     1500
ccttgccac gaaccggacc tgttggtcgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat     1560
```

cttctccaaa	tttaaattct	ccaattttaa	cgcgagccat	tttgatacac	gtgtgtcgat	1620
tttgcaacaa	ctattgtttt	ttaacgcaaa	ctaaacttat	tgtggttaagc	aataattaaa	1680
tatgggggaa	catgcgccgc	tacaacactc	gtcgttatga	acgcagacgg	cgccggtctc	1740
ggcgcaagcg	gctaaaacgt	gttgccggtt	caacgcggca	aacatcgcaa	aagccaatag	1800
tacagttttg	atttgcatat	taacggcgat	tttttaaatt	atcttattta	ataaatagtt	1860
atgacgccta	caactccccg	cccgcgttga	ctcgtgcac	ctcgagcagt	tcgttgacgc	1920
cttcctccgt	gtggccgaac	acgtcgagcg	ggtggtcgat	gaccagcggc	gtgccgcacg	1980
cgacgcacaa	gtatctgtac	accgaatgat	cgtcgggcca	aggcacgtcg	gcctccaagt	2040
ggcaatatgt	gcaaattcga	aaatatatac	agttgggttg	tttgcgcata	tctatcgtgg	2100
cgttgggcat	gtacgtccga	acgttgattt	gcatgcaagc	cgaaattaaa	tcattgcgat	2160
tagtgcgatt	aaaacgttgt	acatcctcgc	ttttaatcat	gccgtcgatt	aaatcgcgca	2220
atcgagtcaa	gtgatcaaag	tgtggaataa	tgttttcttt	gtattcccga	gtcaagcgca	2280
gcgcgtattt	taacaaacta	gccatcttgt	aagttagttt	catttaatgc	aacttttatcc	2340
aataatatat	tatgtatcgc	acgtcaagaa	ttaacaatgc	gcccgttgtc	gcattctaac	2400
acgactatga	tagagatcaa	ataaagcgcg	aattaaatag	cttgcgacgc	aacgtgcacg	2460
atctgtgcac	gcgttccggc	acgagctttg	attgtaataa	gtttttacga	agcgatgaca	2520
tgacccccgt	agtgacaacg	atcacgcccc	aaagaactgc	cgactacaaa	attaccgagt	2580
atgtcggatga	cgttaaaact	attaagccat	ccaatcgacc	gttagtcgaa	tcaggaccgc	2640
tgggtgcgaga	agccgcgaag	tatggcgaat	gcatcgtata	acgtgtggag	tccgctcatt	2700
agagcgtcat	gtttagacaa	gaaagctaca	tatttaattg	atcccgatga	ttttattgat	2760
aaattgaccc	taactccata	cacggtatct	tacaatggcg	gggttttggg	caaaatttcc	2820
ggactgcgat	tgtacatgct	gttaacggct	ccgcccacta	ttaatgaaat	taaaaattcc	2880
aattttaaaa	aacgcagcaa	gagaaacatt	tgtatgaaag	aatgcgtaga	aggaaagaaa	2940
aatgtcgtcg	acatgctgaa	caacaagatt	aatatgcctc	cgtgtataaa	aaaaatattg	3000
aacgatttga	aagaaaacaa	tgtaccgcgc	ggcggtatgt	acaggaagag	gtttatacta	3060
aactgttaca	ttgcaaacgt	ggtttcgtgt	gccaaagtgt	aaaaccgatg	tttaatcaag	3120
gctctgacgc	atttctacaa	ccacgactcc	aagtgtgtgg	gtgaagtcac	gcattcttta	3180
atcaaattccc	aagatgtgta	taaaccacca	aactgccaaa	aaatgaaaac	tgtcgacaag	3240
ctctgtccgt	ttgctggcaa	ctgcaagggg	ctcaatccta	tttgtaatta	ttgaataata	3300
aaacaattat	aaatgctaaa	tttgtttttt	attaacgata	caaaccaaac	gcaacaagaa	3360
catttgtagt	attatctata	attgaaaacg	cgtagttata	atcgctgagg	taatatttaa	3420
aatcattttc	aaatgattca	cagttaattt	gcgacaatat	aattttattt	tcacataaac	3480
tagacgcctt	gtcgtcttct	tcttcgtatt	ccttctcttt	ttcatttttc	tcctcataaa	3540
aattaacata	gttattatcg	tatccatata	tgtatctatc	gtatagagta	aattttttgt	3600

tgtcataaat	atatatgtct	tttttaatgg	ggtgtatagt	accgctgcgc	atagtttttc	3660
tgtaatttac	aacagtgcct	ttttctggta	gttcttcgga	gtgtgttgct	ttaattatta	3720
aatttatata	atcaatgaat	ttgggatcgt	cggttttgta	caatatgttg	ccggcatagt	3780
acgcagcttc	ttctagtcca	attacacccat	tttttagcag	caccggatta	acataacttt	3840
ccaaaatggt	gtacgaaccg	ttaaacaaaa	acagttcacc	tcccttttct	atactattgt	3900
ctgcgagcag	ttgtttgttg	ttaaaaataa	cagccattgt	aatgagacgc	acaaactaat	3960
atcacaaact	ggaaatgtct	atcaatatat	agttgctgat	atcatggaga	taattaaaaat	4020
gataaccatc	tcgcaataa	ataagtattt	tactgttttc	gtaacagttt	tgtaataaaa	4080
aaacctataa	atattccgga	ttattcatac	cgtcccacca	tcgggcgcgc	atcagatctg	4140
cagcggccgc	gggaattcga	tccgccatga	cgtatccaag	gaggcggttac	cgcagaagaa	4200
gacaccgccc	ccgcagccat	cttggccaga	tcctccgcgc	ccgcccctgg	ctcgtccacc	4260
cccgccaccg	ctaccgttgg	agaaggaaaa	atggcatctt	caacaccgcg	ctctcccgca	4320
ccttcggata	tactgtcaag	gctaccacag	tcacaacgcc	ctcctgggcg	gtggacatga	4380
tgagatttaa	tattgacgac	tttgttcccc	cgggaggggg	gaccaacaaa	atctctatac	4440
cctttgaata	ctacagaata	agaaagggtta	aggttgaatt	ctggccctgc	tccccatca	4500
cccagggatg	taggggagtg	ggctccactg	ctgttattct	agatgataac	tttgtaacaa	4560
aggccacagc	cctaacctat	gacccatatg	taaactactc	ctcccgccat	acaatcccc	4620
aacccttctc	ctaccactcc	cgttacttca	cacccaaacc	tgttcttgac	tccactattg	4680
attacttcca	accaaataac	aaaaggaatc	agctttggct	gaggctacaa	acctctagaa	4740
atgtggacca	cgtaggcctc	ggcactgcgt	tcgaaaacag	taaatacgac	caggactaca	4800
atatccgtgt	aaccatgtat	gtacaattca	gagaatttaa	tcttaaagac	ccccacttg	4860
aaccctaaga	attctatcac	tagtgaattc	gcggccgccc	gccgctccag	aattctagaa	4920
ggtacccggg	atcctttcct	gggacccggc	aagaacaaaa	aactcactct	cttcaaggaa	4980
atccgtaatg	ttaaacccga	cacgatgaag	cttgtcggtg	gatggaaagg	aaaagagttc	5040
tacagggaaa	cttggaaccg	cttcatggaa	gacagcttcc	ccattgttaa	cgaccaagaa	5100
gtgatggatg	ttttccttgt	tgtcaacatg	cgtcccacta	gacccaaccg	ttgttacaaa	5160
ttcctggccc	aacacgctct	gcgttgcgac	cccgaactatg	tacctcatga	cgtgattagg	5220
atcgtcgagc	cttcatgggt	gggcagcaac	aacgagtacc	gcacagcct	ggctaagaag	5280

ggcggcggt	gccaataat	gaaccttcac	tctgagtaca	ccaactcgtt	cgaacagttc	5340
atcgatcgtg	tcatctggga	gaacttctac	aagcccatcg	tttacatcgg	taccgactct	5400
gctgaagagg	aggaaattct	ccttgaagtt	tccctggtgt	tcaaagtaaa	ggagtttgca	5460
ccagacgcac	ctctgttcac	tggtccggcg	tattaaaaca	cgatacattg	ttattagtag	5520
atttattaag	cgctagattc	tgtgcgttgt	tgatttacag	acaattggtg	tacgtatttt	5580
aataattcat	taaatttata	atcttttaggg	tggtatgtta	gagcgaaaat	caaagtattt	5640
tcagcgtctt	tatatctgaa	tttaaatatt	aaatcctcaa	tagatttgta	aaataggttt	5700
cgattagttt	caaacaaggg	ttgtttttcc	gaaccgatgg	ctggactatc	taatggattt	5760
tcgctcaacg	ccacaaaact	tgccaaatct	tgtagcagca	atctagcttt	gtcgatatct	5820
gtttgtgttt	tgttttgtaa	taaagggttcg	acgtcgttca	aaatattatg	cgcttttgta	5880
tttctttcat	cactgtcgtt	agtgtacaat	tgactcgacg	taaacacggt	aaataaagct	5940
tgacatatt	taacatcggg	cgtgttagct	ttattaggcc	gattatcgtc	gtcgtcccaa	6000
ccctcgtcgt	tagaagttgc	ttccgaagac	gattttgcca	tagccacacg	acgcctatta	6060
attgtgtcgg	ctaacacgtc	cgcgatcaaa	tttgtagttg	agctttttgg	aattatttct	6120
gattgcgggc	gtttttgggc	gggtttcaat	ctaactgtgc	ccgattttta	ttcagacaac	6180
acgttagaaa	gcgatggtgc	aggcgggtgt	aacatttcag	acggcaaata	tactaatggc	6240
ggcgggtgtg	gagctgatga	taaatctacc	atcgggtggag	gcgcaggcgg	ggctggcggc	6300
ggaggcggag	gcggagggtg	tggcgggtgat	gcagacggcg	gtttaggctc	aaatgtctct	6360
ttaggcaaca	cagtcggcac	ctcaactatt	gtactgggtt	cgggcgccgt	ttttggtttg	6420
accggtctga	gacgagtgcg	atTTTTTctg	tttctaatag	cttccaacaa	ttgttgctctg	6480
tcgtctaaag	gtgcagcggg	ttgaggttcc	gtcggcattg	gtggagcggg	cggcaattca	6540
gacatcgatg	gtggtggtgg	tggtggaggc	gctggaatgt	taggcacggg	agaagggtgt	6600
ggcggcgggt	ccgccggtat	aatttgttct	ggtttagttt	gttcgcgcac	gattgtgggc	6660
accggcgcag	gcgccgctgg	ctgcacaacg	gaaggctcgt	tgcttcgagg	cagcgccttg	6720
gggtggtggca	attcaatatt	ataattggaa	tacaaatcgt	aaaaatctgc	tataagcatt	6780
gtaatttcgc	tatcgtttac	cgtgccgata	tttaacaacc	gctcaatgta	agcaattgta	6840
ttgtaaagag	attgtctcaa	gctcgccgca	cgccgataac	aagccttttc	atttttacta	6900
cagcattgta	gtggcgagac	acttcgctgt	cgctgcacgta	catgtatgct	ttgttgctca	6960
aaacgtcgtt	ggcaagcttt	aaaatattta	aaagaacatc	tctgttcagc	accactgtgt	7020
tgctgtaaat	gttgtttttg	ataatttgcg	cttcgcgagt	atcgacacgt	tcaaaaaatt	7080
gatgcgcata	aattttgttg	ttctatttat	tgaataaata	agattgtaca	gattcatatc	7140
tacgattcgt	catggccacc	acaaatgcta	cgctgcaaac	gctggtacaa	ttttacgaaa	7200
actgcaaaaa	cgtcaaaaact	cggtataaaa	taatcaacgg	gcgctttggc	aaaatatcta	7260

ttttatcgca	caagcccact	agcaaattgt	atltgcagaa	aacaatttcg	gcgcacaatt	7320
ttaacgctga	cgaaataaaa	gttcaccagt	taatgagcga	ccacccaaat	tttataaaaa	7380
tctattttaa	tcacggttcc	atcaacaacc	aagtgatcgt	gatggactac	attgactgtc	7440
ccgatttatt	tgaaacacta	caaattaaag	gcgagctttc	gtaccaactt	gtagcaata	7500
ttattagaca	gctgtgtgaa	gcgctcaacg	atltgcacaa	gcacaatttc	atacacaacg	7560
acataaaaact	cgaaaatgtc	ttatatattc	aagcacttga	tcgctgttat	gtttgcgatt	7620
acggattgtg	caaacacgaa	aactcactta	gcgtgcacga	cggcacgttg	gagtatttta	7680
gtccggaaaa	aattcgacac	acaactatgc	acgtttcgtt	tgactggtac	gcggcgtgtt	7740
aacatacaag	ttgctaacgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	7800
gctcacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	gggggtgccta	7860
atgagtgagc	taactcacat	taattgcgtt	gcgctcactg	cccgtttcc	agtcgggaaa	7920
cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	7980
tgggcgctct	tccgcttctt	cgctcactga	ctcgtcgcgc	tcggtcgttc	ggctgcggcg	8040
agcggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	8100
aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	8160
gctggcgttt	ttccataggc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	8220
tcagaggtgg	cgaaacccga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	8280
cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	8340
ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	8400
cgttcgtctc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggtt	cagcccgacc	gctgcgcctt	8460
atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	8520
agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	8580
gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	gacagtatct	ggtatctgcg	ctctgctgaa	8640
gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	8700
tagcgggtgt	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	8760
agatcctttg	atctttttcta	cggggtctga	cgctcagtgg	aacgaaaact	cacgttaagg	8820
gattttggtc	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	8880
aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	8940
aatcagttag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	9000
ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	9060
gataaccgca	gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	9120

aagggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	9180
ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	9240
tgctacaggc	atcgtggtgt	cacgctcgtc	gtttggtatg	gcttcattca	gctccggttc	9300
ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgtttgtgc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	9360
cggtcctccg	atcgtttgtca	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	9420
agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgcttttctg	tgactggtga	9480
gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	9540
gtcaatacgg	gataataccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgctca	tcattggaaa	9600
acgttcttcg	gggcgaaaac	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	9660
accactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	9720
agcaaaaaca	ggaaggcaaa	atgccgcaa	aaagggaata	agggcgacac	ggaaatgttg	9780
aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcaggggt	attgtctcat	9840
gagcggatac	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaaca	ataggggttc	cgcgcacatt	9900
tccccgaaaa	gtgccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	9960
aaataggcgt	atcacgaggc	cctttcgtct	cgcgcgtttc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	10020
ctgacacatg	cagctcccg	agacggtcac	agcttgtctg	taagcggatg	ccgggagcag	10080
acaagcccg	cagggcgcg	cagcgggtgt	tggcgggtgt	cggggctggc	ttaactatgc	10140
ggcatcagag	cagattgtac	tgagagtgca	ccatatgcgg	tgtgaaatac	cgcacagatg	10200
cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggcgcca	ttcgccattc	aggctgcgca	actgttgggg	10260
agggcgatcg	gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	gatgtgctgc	10320
aaggcgatta	agttgggtaa	cgccaggggt	ttcccagtc	cgacgttgta	aaacgacggc	10380
cagtgcc						10387

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 9

Ser Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His His Pro Pro Ser
1 5 10 15

His Leu Gly Gln
20

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> Circovírus porcino

<400> 10

Pro Arg His His Tyr Arg Pro Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr
1 5 10 15

Thr Leu Ser

<210> 11

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Esta é uma sequência de aminoácidos para a fase de
leitura aberta 2 de circovírus porcino tipo 2.

<400> 11

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90
 Arg Ile Lys Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

Lisboa, 11 de Maio de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Método de recuperação de proteína recombinante expressa por fase de leitura aberta 2 de PCV2 em sobrenadante, em que o referido método inclui as etapas de:

- i) infecção das células em meios de crescimento com um vector de baculovírus contendo a referida fase de leitura aberta 2;
- ii) fazer com que o referido vector de baculovírus expresse a referida proteína de fase de leitura aberta 2; e
- iii) recuperação da referida proteína de fase de leitura aberta 2 expressa no sobrenadante,

em que a referida recuperação ocorre, pelo menos, 5 dias após a infecção das células com o referido vector de baculovírus.

2. Método da reivindicação 1, compreendendo as etapas de:

- A) clonagem da referida fase de leitura aberta 2 recombinante de PCV2 num vector de transferência;
- B) introdução da porção do referido vector de transferência contendo a referida fase de leitura aberta 2 recombinante num baculovírus;

- C) infecção das células em meios com o referido baculovírus;
 - D) fazer com que o referido baculovírus expresse a proteína de fase de leitura aberta 2 da referida fase de leitura aberta 2;
 - E) separação das células contendo o referido vector de baculovírus do sobrenadante; e
 - F) recuperação da referida proteína de fase de leitura aberta 2 expressa no referido sobrenadante, pelo menos, cinco dias após a infecção das células com o referido baculovírus.
3. Método da reivindicação 1 ou 2, em que a proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 expressa é segregada pelas células para os meios de crescimento circundantes e em que a proteína de fase de leitura aberta 2 é recuperada no sobrenadante, em vez de ser a partir do interior das células.
4. Método de qualquer uma das reivindicações 1-3, em que o referido método inclui ainda a etapa de amplificar a referida fase de leitura aberta 2 a partir de uma estirpe de PCV2 antes de clonar a referida fase de leitura aberta no referido vector de transferência.
5. Método de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que a referida fase de leitura aberta 2 recombinante compreende ainda uma sequência seleccionada do grupo consistindo de

uma sequência de Kozak em 5', um sítio EcoR1 em 3' e as suas combinações.

6. Método da reivindicação 5, em que a referida sequência de Kozak em 5' compreende a SEQ ID N°: 1.
7. Método da reivindicação 5, em que o referido sítio EcoR1 em 3' compreende a SEQ ID N°: 2.
8. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a referida fase de leitura aberta de PCV2 compreende a SEQ ID N°: 4.
9. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a referida proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 compreende a SEQ ID N°: 6.
10. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que os referidos meios compreendem meios celulares de insecto isentos de soro.
11. Método de qualquer uma das reivindicações 2 a 10, compreendendo ainda as etapas de:
 - i) antes da etapa A, clonagem da referida fase de leitura aberta 2 amplificada num primeiro vector;
 - ii) excisão da referida fase de leitura aberta 2 do referido primeiro vector; e
 - iii) utilização da referida fase de leitura aberta 2 excisada na etapa A.

12. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que as referidas células compreendem células SF+.
13. Método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a etapa de recuperação compreende a separação do detritos celulares da proteína de fase de leitura aberta 2 expressa em meios por meio de uma etapa de separação, em que a etapa de separação inclui, de um modo preferido, filtração.
14. Método de preparação de uma composição para provocar uma resposta imunitária contra PCV2, o referido método compreendendo as etapas de:
 - i) introdução de uma construção num baculovírus, a referida construção compreendendo ADN recombinante de fase de leitura aberta 2 de PCV2;
 - ii) infecção das células com o referido baculovírus, as referidas células estando em meios de crescimento;
 - iii) fazer com que o referido vírus expresse a proteína recombinante da referida fase de leitura aberta 2 a partir da referida fase de leitura aberta 2;
 - iv) recuperação da referida proteína de fase de leitura aberta 2 expressa no sobrenadante, em que a referida proteína de fase de leitura aberta 2 é recuperada, pelo menos, 5 dias após a infecção das referidas células com o referido baculovírus; e

- v) combinação da referida proteína de fase de leitura aberta 2 recuperada no sobrenadante com um adjuvante adequado ou outro veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.
15. Método da reivindicação 14, em que a proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 expressa é segregada pelas células para os meios de crescimento circundantes e em que a proteína de fase de leitura aberta 2 é recuperada no sobrenadante, em vez de ser a partir do interior das células.
16. Método da reivindicação 14 ou 15, em que o referido método inclui ainda a etapa de obtenção da referida construção a partir de um vector de transferência.
17. Método de qualquer uma das reivindicações 14-16, em que o referido método inclui ainda a etapa de amplificação da referida fase de leitura aberta 2 a partir de uma estirpe de PCV2 antes da clonagem da referida fase de leitura aberta 2 no referido vector de transferência.
18. Método de qualquer uma das reivindicações 14 a 17, em que a referida fase de leitura aberta 2 recombinante compreende ainda uma sequência seleccionada do grupo consistindo de uma sequência de Kozak em 5', um sítio EcoR1 em 3' e as suas combinações.
19. Método da reivindicação 18, a referida sequência de Kozak em 5' compreendendo a SEQ ID N°: 1.

20. Método da reivindicação 18, o referido sítio EcoR1 em 3' compreendendo a SEQ ID N°: 2.
21. Método de qualquer uma das reivindicações 14 a 20, a referida fase de leitura aberta 2 de PCV2 compreendendo a SEQ ID N°: 4.
22. Método de qualquer uma das reivindicações 14 a 21, a referida proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 compreendendo a SEQ ID N°: 6.
23. Método de qualquer uma das reivindicações 14 a 22, os referidos meios compreendendo meios celulares de insecto isentos de soro.
24. Método de qualquer uma das reivindicações 17 a 23, compreendendo ainda as etapas de:
- i) clonagem da referida fase de leitura aberta 2 amplificada num primeiro vector;
 - ii) excisão da referida fase de leitura aberta 2 do referido primeiro vector; e
 - iii) utilização da referida fase de leitura aberta 2 excisada para clonagem no referido vector de transferência.
25. Método de qualquer uma das reivindicações 14 a 24, em que as referidas células compreendem células SF+.

26. Método de qualquer uma das reivindicações 14 a 25, em que a referida etapa de recuperação compreende ainda a etapa de separação dos referidos meios das referidas células e detritos celulares.
27. Método da reivindicação 26, em que a referida etapa de separação inclui a etapa de filtração das referidas células, detritos celulares e meios de crescimento através de um filtro possuindo poros variando em tamanho desde cerca de 0,45 μM a cerca de 1,0 μM .
28. Método de qualquer uma das reivindicações 14 a 27, em que o referido método inclui ainda a etapa de inativação do referido baculovírus por adição de etilenimina binária (BEI) ciclizada e, depois de completada a inativação, é adicionada uma solução de tiosulfato de sódio, antes da combinação com a referida proteína de fase de leitura aberta 2 recuperada com um adjuvante adequado.
29. Composição de matéria obtenível pelo método de qualquer uma das reivindicações 1-28.
30. Utilização da composição da reivindicação 29 para a preparação de um medicamento para a prevenção de uma infecção de PCV2.
31. Composição da reivindicação 29 para utilização como um medicamento.
32. Composição da reivindicação 29 para utilização como uma vacina para a prevenção de infecção de PCV2.

33. Composição da reivindicação 29 para utilização num método de prevenção de uma infecção de PCV2.
34. Método para produção de um kit de diagnóstico para a detecção de uma infecção de PCV2 numa amostra, o qual compreende
- i) produção de uma proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 como exposto em qualquer uma das reivindicações 1-28;
 - ii) e embalagem da referida proteína recombinante de fase de leitura aberta 2 num recipiente adequado.
35. Método da reivindicação 34, compreendendo ainda a etapa de inclusão de um manual de instruções com o recipiente que embala a proteína recombinante de fase de leitura aberta 2.
36. Kit incluindo, pelo menos, um recipiente compreendendo, pelo menos, uma dose da composição da reivindicação 29, em que a referida composição é imunogénica e uma dose compreende, pelo menos, 2 µg de proteína de fase de leitura aberta 2 de PCV2.
37. Kit compreendendo i) um recipiente contendo, pelo menos, uma dose da composição da reivindicação 29 e ii) um recipiente contendo uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PRRS.

38. Kit de da reivindicação 37, em que o antigénio de PRRS é IngelVac PRRS MLV.

Lisboa, 11 de Maio de 2015

Fig. 1

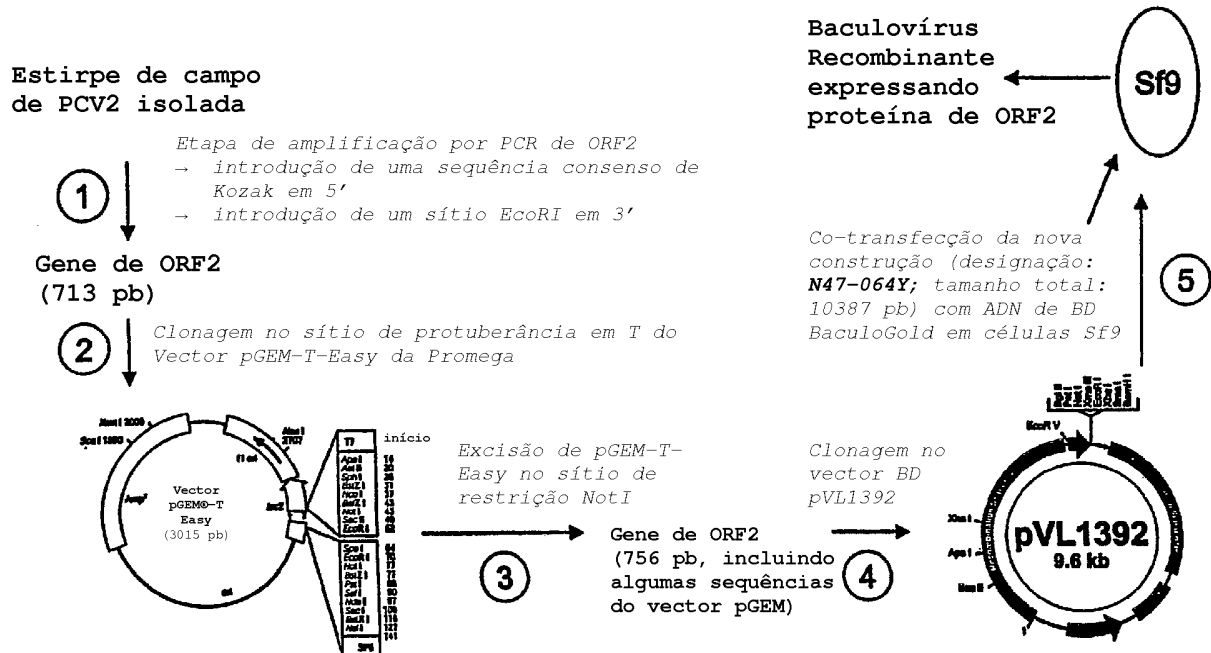


Fig 2(a)

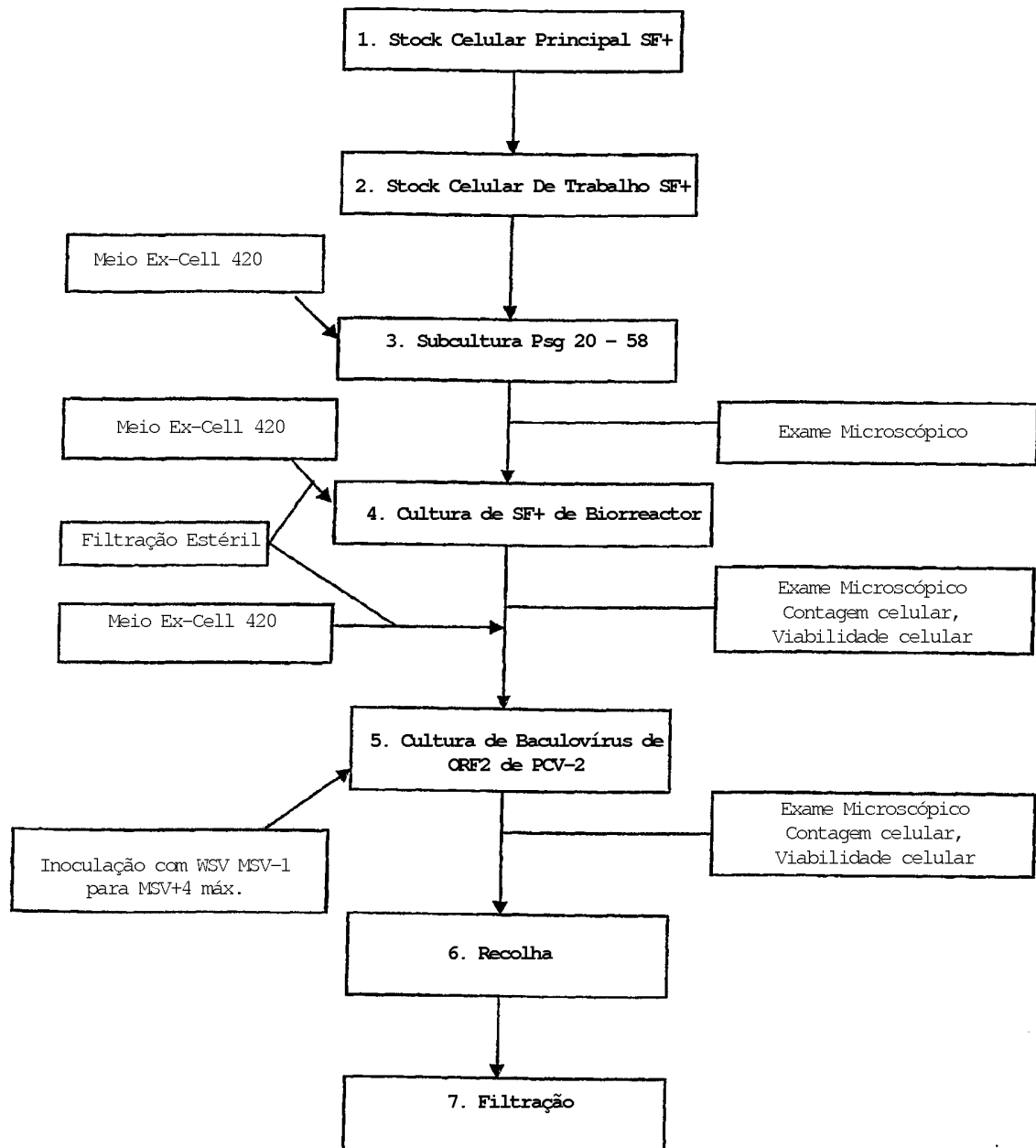


Fig 2(b)

