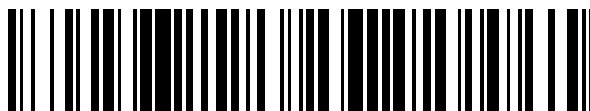


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 425**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2014** **PCT/US2014/058793**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015** **WO15051099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2014** **E 14789683 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020** **EP 3052516**

54 Título: **Variante de la proteína ORF2 del PCV2 y partículas similares a virus compuestas por esta**

30 Prioridad:

02.10.2013 US 201361885871 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.08.2020

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA
INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd
Duluth, GA 30096 , US**

72 Inventor/es:

**HERNANDEZ, LUIS ALEJANDRO;
MUEHLENTHALER, CHRISTINE MARGARET;
VAUGHN, ERIC MARTIN y
HAIWICK, GREGORY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 778 425 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variante de la proteína ORF2 del PCV2 y partículas similares a virus compuestas por esta

5 LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias de conformidad con la norma C.F.R. 37 1.821 - 1.825.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2, siglas del inglés *Porcine Circovirus type 2*) es un virus de ADN pequeño (17 - 22 nm de diámetro), icosaédrico, sin envoltura, que contiene un genoma circular monocatenario. El PCV2 comparte aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con el circovirus porcino tipo 1 (PCV-1). Sin embargo, a diferencia del PCV1, el cual generalmente no es virulento, los cerdos infectados con PCV2 exhiben un síndrome normalmente denominado Síndrome de Desgaste Multisistémico Posterior al Destete (*Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS)). Desde el punto de vista clínico, el PMWS se caracteriza por desgaste, palidez de la piel, caquexia, insuficiencia respiratoria, diarrea, ictericia y cianosis. En algunos cerdos afectados, una combinación de todos los signos será evidente mientras que otros cerdos solo tendrán uno o dos de estos signos clínicos. Durante la necropsia, también aparecen lesiones microscópicas y macroscópicas en múltiples tejidos y órganos, donde los órganos linfoides son los sitios más comunes que sufren lesiones. Se ha observado una fuerte correlación entre la cantidad de ácido nucleico de PCV2 o de antígeno y la gravedad de las lesiones linfoides microscópicas. Las tasas de mortalidad para los cerdos infectados con PCV2 puede acercarse al 80 %. Además del PMWS, el PCV2 se ha asociado con varias otras infecciones que incluyen pseudorrabia, síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS, *porcine reproductive and respiratory syndrome*), enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis posterior al destete, hepatitis dietética y bronconeumonía supurativa.

25

Actualmente, hay tres subtipos de PCV2 conocidos (PCV2a, PCV2b y PCV2c), los cuales se clasifican de acuerdo con una nomenclatura unificada para los genotipos de PCV2 (Segales, J. et al., 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, *Vet Rec* 162:867-8). Se han propuesto dos subtipos adicionales (PCV2d y PCV2e) (Wang et al. *Virus Res.* 2009 145(1):151-6) pero, sin embargo, se demostró posteriormente que pertenecen a las agrupaciones PCV2a y PCV2b (Cortey et al. *Vet Microbiol.* 2011 149(3-4):522-32011). De acuerdo con esta nomenclatura unificada para los genotipos de PCV2, el gen orf2 se usa para el genotipado de pcv-2, en donde el genotipado se basa en la proporción de sitios de nucleótidos en los cuales dos secuencias que se comparan son diferentes (distancia p). Este valor se obtiene dividiendo el número de diferencias de nucleótidos entre el número total de nucleótidos comparados (Kumar et al. 2001 *Bioinformatics* 17, 1244-1245) y posteriormente, la construcción de un histograma de distancia p/frecuencia permite determinar los posibles valores de corte para diferenciar diferentes genotipos (Rogers and Harpending 1992 *Molecular Biology and Evolution* 9, 552-569; Biagini et al. 1999 *Journal of General Virology* 80, 419-424). Usando esta metodología, las secuencias de orf2 de pcv-2 se asignan a diferentes genotipos cuando la distancia genética entre ellas es de 0,035.

40

En cada uno de los números de registro del ENA (European Nucleotide Archive, Archivo Europeo de Nucleótidos) ACA49867 y ACA49861 se desvela una secuencia de una proteína de la cápside de PCV2 codificada por un gen orf2. Nawagitgul et al. (*J Gen Virol.* 81:2281-7 (2000)) describen, entre otras cosas, la clonación de orf2 de PCV2 en un vector de expresión de baculovirus y la expresión del producto génico en células de insecto (frase 5 del resumen de Nawagitgul et al.). El documento WO2008076915 A2 se refiere al uso de una composición inmunogénica que comprende un antígeno del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en particular la proteína ORF2 de PCV2, para la prevención, la reducción de la gravedad de los signos clínicos, la reducción de la frecuencia de infección y/o de los signos clínicos, y tratamiento de varias manifestaciones clínicas (enfermedades) en animales que tienen anticuerpos específicos anti-PCV2 (página 1 líneas 19-23 y página 17 líneas 18-19 del documento WO2008076915 A2).

50

La patente US 2011/0305725 A1 describe un estudio planificado para analizar una nueva formulación de vacuna en cerdos para evaluar su eficacia contra el circovirus porcino y *M. hyopneumoniae*. Durante el transcurso de este estudio, se observó que varios de los cerdos en los grupos de control y vacunados exhibieron signos clínicos de PMWS. También se confirmó que estos cerdos se expusieron a PCV2 ambiental antes de la provocación. El análisis molecular sobre muestras de sangre y tejido de estos cerdos reveló que albergaban una cepa tipo 2B que era diferente de la cepa usada para la provocación (párrafo [0152] de la patente US 2011/0305725 A1).

55

El documento WO2011116094 A2 divulga un clon de ADN infeccioso de circovirus porcino quimérico y el virus quimérico vivo atenuado con el PCV2 de subtipo PCV2b, y un gen capsidial de subtipo PCV2b integrado en un genoma de virus de PCV1 no patógeno, en donde el virus quimérico atenuado puede usarse como vacuna viva, además de como vacuna inactivada (destruida).

60

El documento WO2013030320 A1 se refiere a proteínas capsidiales sintéticas tipo circovirus y a métodos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas a PCV1 en mamíferos usando dichas proteínas. Se diseñaron dos secuencias de acuerdo con el documento WO2013030320 A1, en donde adicionalmente se modificó, entre otras, una secuencia con las siguientes optimizaciones:

65

- Se eliminó un posible sitio de escisión en la posición de aminoácido 165.
- Se introdujo una mutación en la posición 200.
- Se realizó un reemplazo en la posición 161.
- 5 - Se realizó un reemplazo en la posición 170.
- El resto S en la posición 225 se reemplazó por un resto D.
- Se realizó un reemplazo en la posición 143.
- Se realizaron dos reemplazos en el extremo N de la secuencia (posiciones 13 y 20).

10 Sin embargo, como se descubrió que, en la práctica, la expresión de la proteína ORF2 de PCV2b de tipo silvestre es insuficiente y que requiere etapas de concentración adicionales para recibir partículas similares a virus (VLP, *virus like particles*) útiles para preparar una vacuna subunitaria, se necesita una modificación fácil de las secuencias de la proteína ORF2 de PCV2b para mejorar la eficacia de expresión y para aumentar la producción de las VLP, permitiendo de este modo una producción rápida y fácil de vacunas subunitarias eficaces contra el PCV2.

15 La solución al problema técnico anterior se logra mediante la descripción y las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por tanto, la invención en sus diferentes aspectos, se implementa de acuerdo con las reivindicaciones.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 - Cambios de aminoácidos principales entre secuencias de aminoácidos de ORF2 de PCV2a y PCV2b.

25 FIG. 2 - Evaluación de sobrenadantes recogidos de baculovirus para ORF2 de PCV2b. Carril 1 = Circoflex WSV (ORF2 de PCV2a), Carril 2 = ORF2 de PCV2b BDH SFCO, Carril 4 = ORF2 de PCV2b BDH R63T, Carril 5 = ORF2 de PCV2b BDH R63K.

30 FIG. 3 - Evaluación de 100.000 g de sobrenadante para ORF2 de PCV2b. Carril 1 = ORF2 de PCV2b BDH, Carril 2 = ORF2 de PCV2b BDH R63K, Carril 3 = ORF2 de PCV2b BDH R63T, Carril 4 = Circoflex WSV (ORF2 de PCV2a).

FIG. 4 - Separación por SDS-PAGE de fracciones de gradiente de sacarosa. F1 - F12 = Fracciones 1-12.

35 FIGS. 5A y FIG. 5B - Confirmación de la formación de VLP por ME

FIG. 6 - Resultados de la evaluación de la construcción de ORF2 de PCV2b mutante. SFCO = Codón optimizado para *Spodoptera frugiperda*. Las construcciones nativas ORF2 de PCV2b BDH y R63K no se comprobaron para VLP ni se cuantificaron ya que la construcción de la variante R63T se descubrió al mismo tiempo.

40 FIGS. 7A y 7B - Resultados de la evaluación de la construcción de ORF2 de PCV2b mutante. SFCO = Codón optimizado para *Spodoptera frugiperda*. La cuantificación de VLP de las construcciones mutantes de ORF2 se representa como µg/ml.

45 FIG. 8 - Alineación de secuencias de aminoácidos de ORF2 de PCV2b de tipo natural y mutante, en donde las secuencias denominadas SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 2 son secuencias de tipo silvestre de ORF2 de PCV2b y las secuencias denominadas SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 son secuencias mutantes, y en donde la SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia de una proteína ORF2 de PCV2b de tipo silvestre. En las secuencias denominadas SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9: "X" (en las posiciones 8, 53, 57, 68, 89, 90, 121, 134, 169, 190, 215, y 234) es cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, e Y; "X" (en la posición 63) es cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, e Y; y "x" (en la posición 210) es cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D y E.

55 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

La presente invención proporciona:

60 [1] Una proteína ORF2 de PCV2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 96 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 en toda la longitud de la SEQ ID NO :1, y en donde la proteína ORF2 de PCV2 tiene

- en la posición de aminoácido 59 un resto de arginina o un resto de lisina, y
- en la posición de aminoácido 88 un resto de prolina, y

- en la posición de aminoácido 151 un resto de treonina, y
 - en la posición de aminoácido 206 un resto de isoleucina, y
 - en la posición de aminoácido 232 un resto de asparagina,
 y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de aminoácido distinto de un resto de arginina o de un resto de lisina, en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre.

[2] La proteína ORF2 de PCV2 de [1], en donde

- la proteína ORF2 de PCV2 tiene en la posición de aminoácido 63 un resto de aminoácido de origen natural, preferentemente codificado genéticamente, y/o

- la proteína ORF2 de PCV2 tiene en la posición de aminoácido 63 un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en un resto de aminoácido con una cadena lateral polar pero sin carga, un resto de aminoácido con una cadena lateral hidrófoba y un resto de glicina, y en donde dicho resto de aminoácido con una cadena lateral polar pero sin carga, se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un resto de serina, un resto de treonina, un resto de tirosina, un resto de asparagina y un resto de glutamina, y/o en donde dicho resto de aminoácido con una cadena lateral hidrófoba se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un resto de alanina, un resto de valina, un resto de leucina, un resto de isoleucina, un resto de fenilalanina y un resto de triptófano,

y/o

- la proteína ORF2 de PCV2 tiene en la posición de aminoácido 63 un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en un resto de serina y de treonina.

[3] La proteína ORF2 de PCV2 de [1] o [2],

en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 es una proteína ORF2 de PCV2 recombinante, preferentemente una proteína ORF2 de PCV2 recombinante expresada en un baculovirus, y/o

en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 es una proteína ORF2 de PCV2 de subtipo b (PCV2b), y/o en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre es la proteína expuesta en la SEQ ID NO:2.

[4] Una composición inmunogénica que contiene la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3].

[5] Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3].

[6] Un plásmido, preferentemente un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3].

[7] Una célula que comprende un plásmido, preferentemente un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3].

[8] Una partícula similar a virus compuesta por una pluralidad de la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3].

[9] Un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3].

[10] Una célula, preferentemente una célula de insecto, que comprende un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3].

[11] El uso de:

- la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3],
- la composición inmunogénica de [4],
- el polinucleótido de [5],
- el baculovirus de [9],
- el plásmido de [6], y/o
- la célula de [7] o [10]

para la preparación de un medicamento, preferentemente de una vacuna.

[12] La proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3] o la composición inmunogénica de [4] para su uso

en un método de reducción, prevención o tratamiento de signos clínicos causados por una infección por PCV2, o de prevención o tratamiento de una enfermedad causada por una infección por PCV2.

[13] La proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3] o la composición inmunogénica de [4] para su uso de acuerdo con [12], en donde la infección por PCV2 es una infección por PCV2 de subtipo b (PCV2b).

[14] La proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3] o la composición inmunogénica de [4] para su uso de acuerdo con [12], en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 o dicha composición inmunogénica se administra una sola vez.

[15] Un método de producción de la proteína ORF2 de PCV2 de uno cualquiera de [1] a [3], en donde el método comprende

- transfectar una célula con un plásmido, preferentemente un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica dicha proteína ORF2 de PCV2,
- o
- infectar una célula, preferentemente una célula de insecto, con un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica dicha proteína ORF2 de PCV2.

La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que una sola mutación en la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 de PCV2 de subtipo b (PCV2b) es suficiente para aumentar drásticamente los niveles de producción de VLP, permitiendo así la rápida producción de una vacuna subunitaria eficaz contra el PCV2.

En el trabajo subyacente de la invención, las diferencias en las posiciones de los principales aminoácidos entre las secuencias de ORF2 de PCV2a y PCV2b, se identificaron como posibles posiciones para las mutaciones.

En este contexto, se identificaron seis posiciones de aminoácidos típicas para la proteína ORF2 de PCV2b, concretamente

- en la posición de aminoácido 59, un resto de arginina o de lisina,
- en la posición de aminoácido 63, un resto de arginina o de lisina,
- en la posición de aminoácido 88, un resto de prolina,
- en la posición de aminoácido 151, un resto de treonina,
- en la posición de aminoácido 206, un resto de isoleucina, y
- en la posición de aminoácido 232, un resto de asparagina.

Como se describe en el presente documento, la numeración de las posiciones de aminoácidos se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre de longitud completa (SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:5). Por consiguiente, la numeración de las posiciones de aminoácidos mencionadas en el presente documento es con referencia a una secuencia de la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre que tiene 234 o 233 restos de aminoácido, incluyendo un resto de metionina en la posición de aminoácido 1 (extremo N).

Por tanto, la frase "en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a la secuencia de una proteína ORF2 de PCV2 de origen natural, como se expone a modo de ejemplo en la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:5.

Inesperadamente, las mutaciones de las seis posiciones de aminoácidos típicas para la proteína ORF2 de PCV2b mostraron que una mutación de la posición dentro de la secuencia de aminoácidos del bucle BC de la proteína ORF2 de PCV2, concretamente una sustitución del resto de arginina o de lisina en la posición 63, fue suficiente para aumentar la expresión de una proteína ORF2 de PCV2 de manera significativa en comparación con una proteína ORF2 de PCV2 que no contenía dicha mutación.

Por tanto, en un aspecto, la divulgación se refiere a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes aspectos (a), (b) y (c): (a) una proteína ORF2 de PCV2 que tiene: en la posición de aminoácido 59 un resto de arginina o de lisina, y/o en la posición de aminoácido 88 un resto de prolina y/o en la posición de aminoácido 151 un resto de treonina, y/o en la posición de aminoácido 206 un resto de isoleucina, y/o en la posición de aminoácido 232 un resto de asparagina, y que en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de aminoácido distinto de un resto de arginina o de leucina, en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre; (b) una proteína ORF2 de PCV2 caracterizada por que (i) contiene al menos una mutación en el bucle BC y (ii) se expresa preferentemente en una cantidad significativamente más alta en comparación con una proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación; y (c) una combinación de (a) y (b).

Preferentemente, dicho polipéptido, que en lo sucesivo también se denomina "polipéptido de la presente divulgación", es un polipéptido aislado.

En particular, el polipéptido de la presente divulgación es un polipéptido de origen no natural.

Por tanto, de acuerdo con el primer aspecto (a), el polipéptido de la divulgación es una proteína ORF2 de PCV2 que
 5 tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco restos de aminoácidos (el código de una sola letra se indica entre paréntesis) seleccionados del grupo que consiste en un resto de arginina (R) o uno de lisina (K) en la posición de aminoácido 59, un resto de prolina (P) en la posición de aminoácido 88, un resto de treonina (T) en la posición de aminoácido 151, un resto de isoleucina (I) en la posición de aminoácido 206, y un resto de asparagina (N) en la posición de aminoácido 232, y que en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de aminoácido distinto de un resto de arginina
 10 o de lisina.

En particular, el resto de aminoácido distinto de un resto de arginina o de lisina en la posición 63, es un resto de aminoácido de origen natural, preferentemente codificado genéticamente, distinto de un resto de arginina o de lisina.

15 En adelante, también se usan las siguientes abreviaturas:

"R59" como abreviatura de "un resto de arginina en la posición de aminoácido 59",
 "K59" como abreviatura de "un resto de lisina en la posición de aminoácido 59",
 "P88" como abreviatura de "un resto de prolina en la posición de aminoácido 88",
 20 "T151" como abreviatura para "un resto de treonina en la posición de aminoácido 151",
 "I206" como abreviatura de "un resto de isoleucina en la posición de aminoácido 206",
 "N232" como abreviatura de "un resto de asparagina en la posición de aminoácido 232",

Por tanto, preferentemente, el polipéptido de acuerdo con el aspecto (a), es una proteína ORF2 de PCV2 que tiene
 25 P88,

o que tiene T151,
 o que tiene I206,
 o que tiene N232,
 o que tiene R59 o K59,
 30 o que tiene P88 y T151,
 o que tiene P88 e I206,
 o que tiene P88 y N232,
 o que tiene P88 y R59 o K59,
 o que tiene T151 e I206,
 35 o que tiene T151 y N232,
 o que tiene T151 y R59 o K59,
 o que tiene I206 y N232,
 o que tiene I206 y R59 o K59,
 o que tiene N232 y R59 o K59,
 40 o que tiene P88 y T151 e I206,
 o que tiene P88 y T151 y N232,
 o que tiene P88 y T151 y R59 o K59,
 o que tiene P88 e I206 y N232,
 o que tiene P88 e I206 y R59 o K59,
 45 o que tiene P88 y N232 y R59 o K59,
 o que tiene T151 e I206 y N232,
 o que tiene T151 e I206 y R59 o K59,
 o que tiene T151 y N232 y R59 o K59,
 o que tiene I206 y N232 y R59 o K59,
 50 o que tiene P88 y T151 e I206 y N232,
 o que tiene P88 y T151 e I206 y R59 o K59,
 o que tiene P88 y T151 y N232 y R59 o K59,
 o que tiene P88 e I206 y N232 y R59 o K59,
 o que tiene T151 e I206 y N232 y R59 o K59,
 55 o que tiene P88 y T151 e I206 y N232 y R59 o K59.

Por consiguiente, más preferentemente, el polipéptido de acuerdo con el aspecto (a), se selecciona del grupo que
 consiste en

la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88,
 60 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene I206,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene N232,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene K59,
 65 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 e I206,

la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y N232,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 e I206,
 5 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 y N232,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene I206 y N232,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene I206 y R59,
 10 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene I206 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene N232 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene N232 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 e I206,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 y N232,
 15 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 e I206 y N232,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 e I206 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 e I206 y K59,
 20 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y N232 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y N232 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 e I206 y N232,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 e I206 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 e I206 y K59,
 25 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 y N232 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 y N232 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene I206 y N232 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene I206 y N232 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 e I206 y N232,
 30 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 e I206 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 e I206 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 y N232 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 y N232 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 e I206 y N232 y R59,
 35 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 e I206 y N232 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 e I206 y N232 y R59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene T151 e I206 y N232 y K59,
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 e I206 y N232 y R59, y
 la proteína ORF2 de PCV2 que tiene P88 y T151 e I206 y N232 y K59.

De acuerdo con el segundo aspecto (b), el polipéptido de la divulgación es, en particular, una proteína ORF2 de PCV2 caracterizada por que (i) contiene al menos una mutación en el bucle BC y (ii) se expresa, en particular, en un sistema de expresión de baculovirus, en una cantidad significativamente mayor, preferentemente en una cantidad mayor de al menos un factor de 2, más preferentemente en una cantidad mayor de al menos un factor de 3, incluso más preferentemente en una cantidad mayor de al menos un factor de 5, aún más preferentemente en una cantidad mayor de al menos un factor de 8, en comparación con una proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación, en donde la proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación tiene, preferentemente, una secuencia de aminoácidos idéntica a la del polipéptido de la divulgación excepto la al menos una mutación en el bucle BC.

Se entiende así, en particular, que las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas ORF2 de PCV2 cuya expresión se compara de acuerdo con este aspecto de la divulgación, son idénticas excepto por dicha al menos una mutación en el bucle BC.

La expresión "bucle BC", en el contexto de la divulgación, se refiere, en particular, a la parte de la secuencia de aminoácidos de la ORF2 de PCV2 ubicada entre los dos primeros tramos de aminoácidos del extremo N que se pliegan en estructuras secundarias de lámina β , como puede observarse en la estructura cristalina de la proteína ORF2 de PCV2 publicada en Khayat et al. J Virol 85:7856-62 (2011). En particular, Khayat et al. describen bucles que conectan cadenas β , BC, DE, FG y HI, de una longitud de cuatro a nueve restos de aminoácido, y los bucles BC y HI se definen como protuberancias similares a nudos que se extienden más allá de la superficie de la cápside de PCV y que adornan los ejes en 5 pliegues.

Para determinar si la proteína ORF2 de PCV2 que contiene al menos una mutación en el bucle BC se expresa en una cantidad más alta en comparación con la proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación, se usa preferentemente un método como se describe más adelante en el Ejemplo 1 del presente documento.

Por tanto, en un ejemplo, para determinar si la proteína ORF2 de PCV2, que contiene al menos una mutación en el bucle BC, se expresa en una cantidad más alta en comparación con la proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación, se usa el sistema de expresión de baculovirus en un método que comprende las siguientes etapas: infectar células Sf+ con baculovirus a una MOI (multiplicidad de infección) específica de 0,1, permitir que la infección
 5 avance durante 5 - 7 días, recoger por centrifugación a 20 000 g durante 20 min para eliminar los residuos celulares y las proteínas insolubles, filtrar con un filtro de 0,2 µm el sobrenadante recogido y evaluar directamente la expresión de la proteína ORF2 de PCV2 por transferencia Western usando anticuerpos α-PCV2.

Preferentemente, dicho método comprende además la preparación de baculovirus que se usará en la etapa de
 10 infección de células Sf+ a una MOI específica de 0,1, y en particular comprende además, una o más de las siguientes etapas: clonar una secuencia codificante, que codifica la proteína ORF2 de PCV2 que contiene al menos una mutación en el bucle BC, en un vector de transferencia de baculovirus, clonar una secuencia codificante, que codifica la proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación, en un vector de transferencia de baculovirus, co-transfectar dicho vector de transferencia de baculovirus, que incluye la secuencia codificante que codifica la
 15 proteína ORF2 de PCV2 que contiene al menos una mutación en el bucle BC, con ADN de baculovirus en células Sf9, co-transfectar dicho vector de transferencia de baculovirus, que incluye la secuencia codificante que codifica la proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación, con ADN en células Sf9.

Más preferentemente, dicho método comprende además una o más de las siguientes etapas: comprobar con IFA el
 20 baculovirus recombinante resultante para determinar la expresión de la proteína ORF2 de PCV2, preparando una reserva amplificada de cada baculovirus recombinante en las células Sf+, titular dicha reserva amplificada a través del método de TCID₅₀ (dosis infectiva del 50 % en cultivo celular) para determinar el título baculovírico.

En particular, el polipéptido de la invención, que es una proteína ORF2 de PCV2 que contiene al menos una
 25 mutación en el bucle BC, se expresa en una cantidad más alta en comparación con la proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación en las mismas condiciones ambientales y/o en condiciones comparables, preferentemente en un sistema de expresión de baculovirus.

Más particularmente, dicha proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación, es una proteína ORF2 de
 30 PCV2 de tipo silvestre.

Preferentemente, la al menos una mutación en el bucle BC de acuerdo con la invención, es al menos una mutación
 35 en la región de las posiciones de aminoácidos 58 a 66 y en particular comprende o consiste en una delección, sustitución y/o adición de uno a 7 restos de aminoácidos en la región de las posiciones de aminoácidos 60 a 66.

Más preferentemente, la al menos una mutación en el bucle BC es una delección, sustitución y/o una adición de un
 40 resto de aminoácido en la posición de aminoácido 63, en donde una sustitución del resto de aminoácido en la posición de aminoácido 63 por un resto de aminoácido diferente de un resto de arginina o de lisina es la más preferida.

Aún más preferentemente, la sustitución del resto de aminoácido en la posición de aminoácido 63 por un resto de
 aminoácido distinto de un resto de arginina o de lisina es una sustitución con un resto de aminoácido de origen
 45 natural, preferentemente codificado genéticamente, distinto de un resto de arginina o de leucina.

Las secuencias preferidas del bucle BC de acuerdo con la divulgación, que incluye una sustitución del resto de
 50 aminoácido en la posición de aminoácido 63 por un resto de aminoácido distinto de un resto de arginina o de lisina, se exponen en las SEQ ID NO: 10-45.

Por tanto, en particular, la al menos una mutación en el bucle BC de acuerdo con la divulgación, comprende o es
 una sustitución de un resto de arginina o de lisina en la posición de aminoácido 63 por un resto de aminoácido
 55 distinto de un resto de arginina o de lisina.

Por tanto, la proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación, como se describe en el presente documento,
 60 tiene, preferentemente, un resto de arginina o de lisina en la posición de aminoácido 63, que después se sustituye de acuerdo con este aspecto preferido de la invención, dando como resultando por tanto un polipéptido de acuerdo con la divulgación.

Más preferentemente, el polipéptido de la presente divulgación comprende una secuencia seleccionada del grupo
 que consiste en las SEQ ID NO: 10-45, en donde dicha secuencia está ubicada en particular en las posiciones de
 65 aminoácido 58 a 66 de la secuencia del polipéptido de la presente divulgación.

De acuerdo con el tercer aspecto (c), el polipéptido de la divulgación es cualquier combinación de la proteína ORF2
 de PCV2 de acuerdo con los aspectos (a) y (b), como se describió en el presente documento, y es por tanto
 cualquier proteína ORF2 de PCV2 que tiene:

- en la posición de aminoácido 59 un resto de arginina o de lisina,

- en la posición de aminoácido 88 un resto de prolina, y/o
- en la posición de aminoácido 151 un resto de treonina, y/o
- en la posición de aminoácido 206 un resto de isoleucina, y/o
- en la posición de aminoácido 232 un resto de asparagina,

y que en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de aminoácido distinto de un resto de arginina o de lisina, en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre; y que se caracteriza por que (i) contiene al menos una mutación en el bucle BC y (ii) se expresa preferentemente en una cantidad significativamente más alta en comparación con la proteína ORF2 de PCV2 que no contiene dicha mutación.

La expresión "resto de aminoácido codificado genéticamente distinto de un resto de arginina o de lisina", como se describe en el contexto de la presente invención, se refiere, en particular, a un resto de aminoácido (el código de una letra se indica entre paréntesis) seleccionado del grupo que consiste en un resto de alanina (A), un resto de aspartato (D), un resto de asparagina (N), un resto de cisteína (C), un resto de glutamina (Q), un resto de glutamato (E), un resto de fenilalanina (F), un resto de glicina (G), un resto de histidina (H), un resto de isoleucina (I), un resto de leucina (L), un resto de metionina (M), un resto de prolina (P), un resto de serina (S), un resto de treonina (T), un resto de valina (V), un resto de triptófano (W) y un resto de tirosina (Y).

Más particularmente, dicho resto de aminoácido distinto de un resto de arginina o de lisina, se selecciona del grupo que consiste en un resto de aminoácido con una cadena lateral polar pero sin carga, un resto de aminoácido con una cadena lateral hidrófoba y un resto de glicina, en donde, preferentemente, el resto de aminoácido con una cadena lateral polar pero sin carga, se selecciona del grupo que consiste en un resto de serina, un resto de treonina, un resto de tirosina, un resto de asparagina y un resto de glutamina, y/o en donde dicho resto de aminoácido con una cadena lateral hidrófoba se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en un resto de alanina, un resto de valina, un resto de leucina, un resto de isoleucina, un resto de fenilalanina y un resto de triptófano.

Mucho más preferentemente, el resto de aminoácido distinto de un resto de arginina o de lisina, como se menciona en el contexto de la presente invención, se selecciona del grupo que consiste en un resto de serina y un resto de treonina.

En un aspecto adicional preferido, el polipéptido de la presente invención es una proteína ORF2 de PCV2 recombinante, tal como una proteína ORF2 de PCV2 recombinante expresada en un baculovirus.

La expresión "proteína ORF2 de PCV2 recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere, en particular, a una molécula de proteína que se expresa a partir de una molécula de ADN recombinante, tal como un polipéptido que se produce mediante técnicas de ADN recombinantes. Un ejemplo de dichas técnicas incluye el caso en donde el ADN que codifica la proteína expresada, se inserta en un vector de expresión apropiado, preferentemente un vector de expresión de baculovirus, que a su vez se usa para transfectar, o en el caso de un vector de expresión de baculovirus, para infectar, una célula hospedadora para producir la proteína o el polipéptido codificado por el ADN. La expresión "proteína ORF2 de PCV2 recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere, en particular, a una molécula de proteína que se expresa a partir de una molécula de ADN recombinante.

De acuerdo con un ejemplo particular, la proteína ORF2 de PCV2 recombinante se produce mediante un método con las siguientes etapas: El gen que codifica la proteína ORF2 de PCV2 se clona en un vector de transferencia de baculovirus; el vector de transferencia se usa para preparar el baculovirus recombinante que contiene dicho gen por recombinación homóloga en células de insecto; y después, la proteína ORF2 de PCV2 se expresa en células de insecto durante la infección con el baculovirus recombinante.

De acuerdo con un ejemplo alternativo, la proteína ORF2 de PCV2 recombinante se expresa en células de insecto a partir de un plásmido de expresión recombinante. En el caso de este ejemplo alternativo, no es necesario el baculovirus.

Además, se entiende que la expresión "proteína ORF2 de PCV2 recombinante que consiste en una secuencia", también se refiere, en particular, a cualquier modificación cotraducciona y/o postraducciona o a modificaciones de la secuencia efectuadas en la célula en la que se expresa el polipéptido. Por tanto, la expresión "proteína ORF2 de PCV2 recombinante que consiste en una secuencia", como se describe en el presente documento, también se refiere a la secuencia que tiene una o más modificaciones efectuadas en la célula en la que se expresa el polipéptido, en particular, modificaciones de restos de aminoácidos efectuadas en la biosíntesis de la proteína y/o en el procesamiento de la proteína, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en glicosilaciones, fosforilaciones y acetilaciones.

Preferentemente, la proteína ORF2 de PCV2 recombinante de acuerdo con la invención, se produce o puede obtenerse mediante un sistema de expresión de baculovirus, en particular en células de insecto cultivadas.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la presente invención es una proteína ORF2 de PCV2 de subtipo b (PCV2b).

Incluso en un aspecto adicional preferido, el polipéptido de la presente invención es una proteína ORF2 de PCV2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente de al menos 92 %, más preferentemente de al menos 94 %, incluso más preferentemente de al menos 96 %, aún más preferentemente de al menos 98 %, o en particular de 100 %, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Más preferentemente, el polipéptido de la presente divulgación se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de las SEQ ID NO: 6-9, que también se muestran en la Fig. 8. Por tanto, el polipéptido de la presente divulgación se selecciona preferentemente de las siguientes secuencias (i)-(iv):

(i)

MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSTXGYT
XKRTTVXTPSWXVDMRFNINDFLPPGGGSPXXVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYFTPKPVLD
XTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQ~~X~~YNIRXTMYVQFREF
NLKDPPLNP (SEQ ID NO:6),

(ii)

MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSTXGYT
XKKTTVXTPSWXVDMRFNINDFLPPGGGSPXXVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYFTPKPVLD
XTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQ~~X~~YNIRXTMYVQFREF
NLKDPPLNP (SEQ ID NO:7),

(iii)

MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSTXGYT
XKRTTVXTPSWXVDMRFNINDFLPPGGGSPXXVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYFTPKPVLD
XTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQ~~X~~YNIRXTMYVQFREF
NLKDPPLNPX (SEQ ID NO:8),

(iv)

MTYPRRRXRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSTXGYT
XKKTTVXTPSWXVDMRFNINDFLPPGGGSPXXVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSXAVILDDNFVTKAXALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYFTPKPVLD
XTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTXGNVDHVGLGTAFENSIYDQ~~X~~YNIRXTMYVQFREF
NLKDPPLNPX (SEQ ID NO:9),

en donde en dichas secuencias (i)-(iv):

"X" es cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N,

P, Q, R, S, T, V, W e Y;

"X" es cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W e Y; y

"x" es cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D y E.

Para fines explicativos y en un ejemplo no limitativo, el polipéptido de acuerdo con la divulgación es un polipéptido que consiste en la secuencia:

```
MTYPRRRFRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLHPRHRYRWRKNGIFNTRLSTIGYTVKKT
TVXTPSWNVDMMRFNINDFLPPGGGSNPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVG
STAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNN
KRNQLWLRLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLNPK
(SEQ ID NO:46),
```

en donde "X" es cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W e Y.

Incluso en otro aspecto preferido de la presente invención, la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre, como se describe en el presente documento, es la proteína expuesta en la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otro aspecto, la divulgación proporciona además una composición inmunogénica que contiene el polipéptido de la presente divulgación.

De acuerdo con otro aspecto preferido, la divulgación proporciona además una composición inmunogénica que contiene el polipéptido de la presente divulgación y un polipéptido ORF-2 de PCV2a, en donde dicho polipéptido ORF-2 de PCV2a es, preferentemente, un polipéptido que es al menos 94 % o preferentemente al menos 95 % idéntico a la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención también proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación, en donde dicho polinucleótido de acuerdo con la divulgación es, preferentemente, un polinucleótido aislado.

Para fines explicativos y en un ejemplo no limitativo, el polinucleótido de acuerdo con la divulgación es un polinucleótido que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

La producción de los polinucleótidos descritos en el presente documento es parte de la experiencia de la técnica y puede llevarse a cabo de acuerdo con técnicas recombinantes descritas, entre otras referencias, en Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Amusable, et al., 2003, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis et al. (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; and Erlich (ed), 1994, PCR Technology, Oxford University Press, Nueva York.

Además, la divulgación proporciona, en particular, un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación, en donde dicho baculovirus de acuerdo con la divulgación es, preferentemente, un baculovirus aislado.

Adicionalmente, la divulgación también proporciona un plásmido, preferentemente un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación, en donde dicho plásmido de acuerdo con la divulgación es, en particular, un plásmido aislado.

La divulgación también proporciona una célula que comprende un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación, o un plásmido, preferentemente, un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación, en donde dicha célula de acuerdo con la divulgación es, preferentemente, una célula aislada.

Incluso en otro aspecto, la divulgación también se refiere al uso del polipéptido de la presente divulgación; al baculovirus de acuerdo con la divulgación; a la composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación; al polinucleótido de acuerdo con la divulgación; al plásmido de acuerdo con la divulgación; y/o a la célula de acuerdo con la divulgación, para la preparación de un medicamento, preferentemente de una vacuna.

En este contexto, la divulgación también proporciona un método para producir el polinucleótido de la presente

divulgación, en donde dicho método comprende la etapa de infectar una célula, preferentemente una célula de insecto, con el baculovirus de la divulgación.

Además, la divulgación también proporciona un método para producir el polinucleótido de la presente divulgación, en donde dicho método comprende la etapa de transfectar una célula con el plásmido de acuerdo con la divulgación.

El polipéptido de la presente divulgación se expresa preferentemente en altas cantidades que son suficientes para el autoensamblaje estable de partículas similares a virus, que después pueden usarse para una vacunación de una sola inyección, en particular si se incluyen en una composición inmunogénica, permitiendo de este modo la reducción y la prevención de signos clínicos causados por una infección por PCV2, tal como una infección por PCV2b y/o PCV2a.

Por tanto, la divulgación se basa, además y en particular, en el polipéptido de la presente divulgación o en la composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación, respectivamente, en donde dicho polipéptido de la presente divulgación o dicha composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación pueden usarse para fines particulares.

Por tanto, en un aspecto, la divulgación se refiere al polipéptido de la presente divulgación o a una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2, la reducción, la prevención o el tratamiento de signos clínicos causados por una infección por PCV2, o la prevención o el tratamiento de una enfermedad causada por una infección por PCV2.

La divulgación también proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2, la reducción, la prevención o el tratamiento de signos clínicos causados por una infección por PCV2, o la prevención o el tratamiento de una enfermedad causada por una infección por PCV2, que comprende administrar a un animal, en particular a un animal que lo necesite, el polipéptido de la presente divulgación o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación.

Además, la divulgación proporciona el uso del polipéptido de la presente divulgación o de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2, la reducción, la prevención o el tratamiento de signos clínicos causados por una infección por PCV2, o el tratamiento o la prevención de una enfermedad causada por una infección por PCV2.

En un aspecto preferido, la infección por PCV2, como se describe en el presente documento, es una infección por PCV2 de subtipo b (PCV2b) y/o una infección por PCV2 de un subtipo distinto del subtipo 2b.

Como se usa en el presente documento, la expresión "infección por PCV2" es equivalente a la expresión "infección por PCV2".

En particular, la infección por PCV2 de un subtipo distinto del subtipo 2b, como se mencionó en el presente documento, es una infección por PCV2 de subtipo a (PCV2a) y/o por PCV2 de subtipo c (PCV2c), y es, preferentemente, una infección por PCV2a.

La expresión "proteína ORF2 de PCV2 de subtipo b (PCV2b)", como se describe en el presente documento, se refiere a la proteína codificada por el gen de ORF2 de un PCV-2b como se define mediante la nomenclatura estandarizada para la definición del genotipo PCV2 (Segales, J. et al., 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162:867-8) la cual se incorpora a la presente a modo de referencia).

De acuerdo con otro aspecto preferido, la infección por PCV2 de un subtipo distinto del subtipo 2b, como se describe en el presente documento, es una infección simultánea con (i) PCV2 de un subtipo distinto del subtipo 2b y (ii) PCV2b, en particular, una infección simultánea con PCV2a y PCV2b.

Los términos "PCV2a", "PCV2b" y "PCV2c", respectivamente, como se describe en el presente documento, se refieren a PCV-2a, PCV-2b y PCV-2c, respectivamente, de acuerdo con la nomenclatura estandarizada para la definición del genotipo PCV2 (Segales, J. et al., 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature, Vet Rec 162:867-8).

En particular, la infección por PCV2b, como se menciona en el presente documento, es una infección por (i) un PCV2 que comprende un polipéptido que es al menos 94 %, preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 96 %, aún más preferentemente al menos 97 %, incluso más preferentemente al menos 98 %, y mucho más preferentemente al menos 99 % idéntico a la secuencia de la SEQ ID NO: 2, o (ii) un PCV2 que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que es al menos 94 %, preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 96 %, aún más preferentemente al menos 97 %, incluso más preferentemente al menos 98 %, y mucho más preferentemente al menos 99 % idéntico a la secuencia de la SEQ ID

NO: 2.

Como se usa en el presente documento, se entiende, en particular, que la expresión "idéntico a la secuencia de la SEQ ID NO: X" es equivalente a la expresión "idéntico a la secuencia de la SEQ ID NO: X sobre la longitud de la SEQ ID NO: X" o a la expresión "idéntico a la secuencia de la SEQ ID NO: X sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: X", respectivamente. En este contexto, "X" es cualquier número entero seleccionado de 1 a 3 de tal manera que la "SEQ ID NO: X" representa cualquiera de las SEQ ID NO mencionadas en el presente documento.

Preferentemente, la infección por PCV2a, como se describe en el presente documento, es una infección por (i) un PCV2 que comprende un polipéptido que es al menos 94 %, preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 96 %, aún más preferentemente al menos 97 %, incluso más preferentemente al menos 98 %, y mucho más preferentemente al menos 99 % idéntico a la secuencia de la SEQ ID NO: 3, o (ii) un PCV2 que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que es al menos 94 %, preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 96 %, aún más preferentemente al menos 97 %, incluso más preferentemente al menos 98 %, y mucho más preferentemente al menos 99 % idéntico a la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

Preferentemente, en el contexto de la presente divulgación, el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 se basa en, o comprende, o consiste en, la inducción de una respuesta inmunitaria contra dicho PCV2, seleccionándose los signos clínicos, como se mencionó anteriormente, del grupo que consiste en empobrecimiento linfóide, inflamación linfóide, IHC positiva para el antígeno PCV2 del tejido linfóide, viremia, secreción nasal, pirexia, aumento de peso diario promedio reducido, inflamación pulmonar, IHC positiva para el antígeno de PCV2 del tejido pulmonar, y/o la enfermedad, como se mencionó con anterioridad, es el PMWS.

En particular, en el contexto de la presente divulgación, el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 de un subtipo distinto de 2b, se basa en, o comprende, o consiste en, la inducción de una respuesta inmunitaria contra dicho PCV2 de un subtipo distinto de 2b o la inducción simultánea de una respuesta inmunitaria contra dicho PCV2 de un subtipo distinto de 2b y PCV2b.

Los términos "prevención" o "reducción" o "prevenir" o "reducir", respectivamente, tal como se utilizan en el presente documento, significan, pero sin limitación, un proceso que incluye la administración a un animal de un antígeno de PCV2, concretamente del polipéptido de la presente divulgación, que se incluye en la composición de la divulgación, en donde cuando dicho antígeno de PCV2 se administra a dicho animal, suscita o es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en dicho animal contra PCV2. En general, dicho tratamiento produce la reducción de los signos clínicos de una enfermedad causada por PCV2 o de los signos clínicos asociados a la infección por PCV2, respectivamente. Más específicamente, los términos "prevención" o "prevenir", como se usan en el presente documento, significan generalmente un proceso de profilaxis en el que antes de la inducción o la aparición del proceso de la enfermedad causada por el PCV2, un animal se expone a la composición inmunogénica de la presente divulgación.

En el presente documento, una "reducción de los signos clínicos asociados a la infección por PCV2", significa, pero sin limitación, reducir en un grupo la cantidad de sujetos infectados, reducir o eliminar la cantidad de sujetos que muestran signos clínicos de infección, o reducir la gravedad de cualquiera de los signos clínicos que estén presentes en los sujetos, en comparación con la infección de tipo silvestre. Por ejemplo, debe referirse a cualquier reducción de la carga de patógenos, eliminación de patógenos, reducción en la transmisión de patógenos o reducción de cualquier signo clínico sintomático de una infección causada por PCV2. Preferentemente, en los sujetos que reciben la composición de la presente divulgación, estos signos clínicos se reducen en un porcentaje de al menos 10 % en comparación con los sujetos que no la reciben y que pueden infectarse. Más preferentemente, en los sujetos que reciben la composición de la presente divulgación estos signos clínicos se reducen en un porcentaje de al menos 20 %, preferentemente de al menos 30 %, más preferentemente de al menos 40 % e incluso más preferentemente de al menos 50 %.

La expresión "reducción de viremia" significa, pero sin limitación, la reducción del virus PCV2 que entra en la corriente sanguínea de un animal, en donde el nivel de viremia, es decir, la cantidad de copias de ARN de PCV2 por ml de suero sanguíneo o el número de colonias formadoras de placas por decilitro de suero sanguíneo, se reduce en el suero sanguíneo de los sujetos que reciben la composición de la presente divulgación al menos un 50 % en comparación con los sujetos que no la reciben y que pueden infectarse. Más preferentemente, el nivel de viremia se reduce en sujetos que reciben la composición de la presente divulgación al menos un 90 %, preferentemente al menos un 99,9 %, más preferentemente al menos un 99,99 %, e incluso más preferentemente al menos un 99,999 %.

Como se usa en el presente documento, el término "viremia" se entiende, en particular, como una afección en donde las partículas de PCV2 se reproducen y circulan en la corriente sanguínea de un animal.

El término "animal", como se usa en el presente documento, se refiere, en particular, a un mamífero, preferentemente un porcino, más preferentemente un cerdo, mucho más preferentemente un lechón.

De acuerdo con un aspecto preferido particular de la divulgación, el polipéptido de la presente divulgación o la composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación, se administra una sola vez.

5 Preferentemente, en el contexto de la presente divulgación, el polipéptido de la presente divulgación o la composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación, se administrará o se administra, respectivamente, en particular, una sola vez, a un animal, preferentemente a un porcino, más preferentemente, a un cerdo, en particular preferentemente a un lechón.

10 La presente invención resuelve los problemas intrínsecos de la técnica anterior y proporciona un avance claro en el estado de la técnica. Según otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales, preferentemente animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, que comprende la etapa de administrar, al animal que necesite dicho tratamiento, una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación o la composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación.

15 El término "vacuna" o la expresión "composición inmunogénica" (los dos términos se utilizan como sinónimos) tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a cualquier composición farmacéutica que contiene el polipéptido de la presente divulgación, cuya composición puede utilizarse para prevenir o tratar en un sujeto una enfermedad o afección asociada a una infección por PCV2. Una composición inmunogénica preferida puede inducir, estimular o reforzar la respuesta inmunitaria contra el PCV2. Por tanto, el término abarca tanto las composiciones inmunogénicas subunitarias, como las que se describen más adelante, así como las composiciones que contienen un mutante de PCV2b completo, muerto o atenuado y/o inactivado.

25 Se entiende, en particular, que la expresión "mutante de PCV2b", como se describe en el presente documento, se refiere a un mutante de PCV2b que comprende el polipéptido de la presente divulgación y/o el polinucleótido de acuerdo con la divulgación.

30 Según otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento o LA prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales, preferentemente animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar, a un animal que necesite dicho tratamiento, una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación, en el que la composición inmunogénica es una composición inmunogénica subunitaria, una composición que contiene PCV2b completo, muerto o atenuado y/o inactivado.

35 La expresión "composición inmunogénica subunitaria", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una composición que contiene al menos un polipéptido o antígeno inmunogénico, pero no todos los antígenos, procedente de, u homólogo a, un antígeno de un mutante de PCV2b. Dicha composición está sustancialmente exenta de mutante de PCV2b intacto. Por tanto, una "composición inmunogénica subunitaria" se prepara a partir de polipéptidos inmunogénicos procedentes de un mutante de PCV2b al menos parcialmente purificados o fraccionados (preferentemente sustancialmente purificados), o análogos recombinantes de éstos. Una composición inmunogénica subunitaria puede comprender el antígeno o los antígenos subunitarios de interés sustancialmente exentos de otros antígenos o polipéptidos procedentes de un mutante de PCV2b, o en forma fraccionada. Una composición
45 inmunogénica subunitaria preferida comprende el polipéptido de la presente divulgación como se describe en el presente documento.

Una "respuesta inmunitaria" significa, pero sin limitación, el desarrollo en un hospedador de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos contra la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una
50 "respuesta inmunitaria" incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente contra uno o más antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el hospedador presentará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora (memoria), de modo que la resistencia a una nueva infección resultará reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad quedará reducida. Dicha
55 protección se demostrará por una reducción del número de, o de la gravedad de, o por la ausencia de uno o más de los signos asociados a infecciones por PCV2, en particular, una infección por PCV2 de subtipo b (PCV2b) y/o una infección por PCV2 de un subtipo distinto del subtipo 2b, en el retraso de la aparición de viremia, en una persistencia vírica reducida, en una reducción de la carga vírica global y/o una reducción de la excreción vírica.

60 El término "antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que suscita una respuesta inmunológica como se describió con anterioridad.

Según un aspecto adicional, la composición inmunogénica como se utiliza en el presente documento, comprende más preferentemente el polipéptido de la presente divulgación, o un fragmento del mismo, expresado por el
65 polipéptido de acuerdo con la divulgación. Un polipéptido preferido de la presente divulgación es de la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, los expertos en la técnica saben que esta secuencia podría variar tanto como 1-5 % en cuanto a la

homología de la secuencia y aún así conservar las características antigénicas que hacen que sea útil en las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la divulgación.

La expresión "identidad de secuencia", como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, concretamente una secuencia de referencia y una secuencia dada a comparar con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de haber alineado óptimamente las secuencias para producir el grado de similitud de secuencia más alto, según se determina por el emparejamiento entre las hebras de dichas secuencias. Después de dicho alineamiento, la identidad de secuencia se constata en función de posición-por-posición, por ejemplo, en una posición particular, las secuencias son "idénticas" si en esa posición, los nucleótidos o los restos de aminoácidos son idénticos. El número total de dichas identidades de posición se divide después entre el número total de nucleótidos o restos en la secuencia de referencia para proporcionar el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia se puede calcular fácilmente por métodos conocidos, incluidos, pero sin limitación, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A.M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Se diseñan métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia para proporcionar el mayor emparejamiento entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia se codifican en programas informáticos disponibles al público que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Los ejemplos de dichos programas incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible al público en el NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). Estos programas alinean de forma óptima las secuencias utilizando pesos de huecos por defecto para producir el nivel más alto de identidad de secuencia entre las secuencias dada y de referencia. Como ilustración, la expresión un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una "identidad de secuencia" de al menos, por ejemplo, 85 %, preferentemente de 90 %, aún más preferentemente de 95 %, con una secuencia de nucleótidos de referencia, pretende dar a entender que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia, con la excepción de que la secuencia de polinucleótidos dada puede incluir hasta 15, preferentemente hasta 10, aún más preferentemente hasta 5, mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos que tenga una identidad de al menos 85 %, preferentemente de 90 %, incluso más preferentemente de 95 % con respecto a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 15 %, preferentemente el 10 %, incluso más preferentemente el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede delecionarse o sustituirse por otro nucleótido o por diversos nucleótidos hasta el 15 %, preferentemente el 10 %, incluso más preferentemente el 5 % del total de nucleótidos en la secuencia de referencia, puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones 5' o 3' terminal de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, la expresión un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos, por ejemplo, 85 %, preferentemente 90 %, aún más preferentemente 95%, con una secuencia de aminoácidos de referencia, pretende dar a entender que la secuencia de aminoácidos dada del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, con la excepción de que la secuencia de polipéptidos dada puede incluir hasta 15, preferentemente hasta 10, aún más preferentemente hasta 5 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptidos dada que tenga una identidad de secuencia de al menos 85%, preferentemente 90%, aún más preferentemente 95 %, con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 15%, preferentemente hasta el 10 %, aún más preferentemente hasta el 5 % de los restos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar delecionado o sustituido por otro aminoácido, o diversos aminoácidos de hasta 15%, preferentemente hasta 10 %, incluso más preferentemente hasta 5 % del número total de restos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar insertado en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos. Sin embargo, las sustituciones conservativas no están incluidas como un emparejamiento cuando se determina la identidad de secuencia.

"Homología de secuencia", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un método para determinar el grado de relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, dos o más secuencias se alinean óptimamente y, si es preciso, se introducen huecos. Sin embargo, a diferencia de la "identidad de secuencia", las sustituciones conservativas de aminoácidos se cuentan como un emparejamiento cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido que tenga una homología de secuencia de 95 % con una secuencia de referencia, el 85 %, preferentemente el 90 %, aún más preferentemente el

95 % de los restos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de referencia, debe emparejarse o comprender una sustitución conservativa por otro aminoácido o nucleótido, o diversos aminoácidos o nucleótidos hasta el 15 %, preferentemente hasta el 10 %, aún más preferentemente hasta el 5 % del total de restos de aminoácidos o nucleótidos, que no incluyen sustituciones conservativas, en la secuencia de referencia, puede insertarse en la

5 secuencia de referencia. Preferentemente, la secuencia homóloga comprende al menos un tramo de 50, aún más preferentemente de al menos 100, aún más preferentemente de al menos 250, y aún más preferentemente de al menos 500 nucleótidos.

10 Una "sustitución conservativa" se refiere a la sustitución de un resto de aminoácido o nucleótido por otro resto de aminoácido o nucleótido con características o propiedades similares, incluido el tamaño, la hidrofobicidad, etc., de modo que la funcionalidad global no cambia significativamente.

15 "Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" respecto a su estado natural, es decir si se produce en la naturaleza, ha sido cambiado o retirado de su entorno original, o ambas cosas. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que está presente de manera natural en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes en su estado natural está "aislado", según se emplea el término en el presente documento.

20 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos causados por o asociados a una infección por PCV2 en animales, preferentemente animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación a ese animal que necesita dicho tratamiento, en donde dicho polipéptido de la presente

25 divulgación es uno cualquiera de los descritos en el presente documento Preferentemente, el polipéptido de la presente invención es: (i) un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1; o (ii) cualquier polipéptido que sea al menos 95 % homólogo al polipéptido de (i).

30 Según un aspecto adicional, el polipéptido de la presente divulgación se proporciona en la composición inmunogénica a un nivel de inclusión de proteína eficaz para inducir la respuesta inmunitaria deseada, concretamente para reducir la frecuencia de, disminuir la gravedad de, o prevenir o reducir uno o más signos clínicos resultantes de o asociados a una infección por PCV2. Preferentemente, el nivel de inclusión de el polipéptido de la presente divulgación es de al menos 0,2 µg de proteína/ml de la composición inmunogénica final (µg/ml), más preferentemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/ml, todavía más preferentemente de

35 aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/ml, aún más preferentemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/ml, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/ml, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/ml, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 18 µg/ml, aún más preferentemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 µg/ml, aún más preferentemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/ml, aún

40 más preferentemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/ml, todavía más preferentemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/ml, aún más preferentemente de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 µg/ml, aún más preferentemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 µg/ml, y lo más preferentemente de aproximadamente 1,6 µg/ml.

45 Según un aspecto adicional, el nivel de inclusión de la proteína es de al menos 0,2 µg/proteína ORF-2 de PCV2b según se ha descrito anteriormente, por dosis de la composición inmunogénica final (µg/dosis), más preferentemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/dosis, todavía más

50 preferentemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 18 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 1,4 a

55 aproximadamente 2,5 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 µg/dosis, y lo más preferentemente, de aproximadamente 1,6 µg/dosis. Asimismo, un nivel de inclusión del polipéptido de la presente divulgación (contenido en antígeno) de menos de 20 µg/dosis, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 18 µg/dosis, es adecuado para conferir inmunidad a animales jóvenes y/o a animales que son positivos para los anticuerpos de PCV2, en particular que son positivos para anticuerpos anti-PCV2 procedentes

60 de la madre. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales, preferentemente en animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar al animal que necesite dicho tratamiento, menos de 20 µg/dosis, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 18 µg/dosis del

65 polipéptido de la presente divulgación o de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación. Dicho polipéptido de la presente divulgación es uno cualquiera de los descritos en esta

solicitud de patente.

El polipéptido de la presente divulgación usado en la composición inmunogénica de acuerdo con la presente divulgación, puede obtenerse de cualquier manera incluyendo el aislamiento y la purificación del polipéptido de la presente divulgación, la síntesis de proteínas estándar, y la metodología recombinante. En el documento WO06/072065, se proporcionan métodos preferidos para obtener el polipéptido de la presente divulgación, ya que, sorprendentemente, se ha descubierto que los métodos descritos en dicho documento para obtener el polipéptido ORF-2 de PCV2a, pueden usarse en consecuencia para obtener el polipéptido de la presente divulgación. Resumiendo, las células susceptibles se infectan con un vector vírico recombinante que contiene secuencias de ADN codificante que codifica del polipéptido de la presente divulgación, la proteína del polipéptido de la presente divulgación se expresa mediante el virus recombinante, y el polipéptido de la presente divulgación expresado se recupera del sobrenadante por filtración y se inactiva mediante cualquier método convencional, preferentemente usando etilénimina binaria, que después se neutraliza para detener el proceso de inactivación.

La composición inmunogénica, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación descritos anteriormente, preferentemente en las concentraciones descritas anteriormente, y ii) al menos una parte del vector vírico que expresa dicho polipéptido de la presente divulgación, preferentemente de un baculovirus recombinante. Además, la composición inmunogénica puede comprender i) cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación descritos anteriormente, preferentemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una parte del vector vírico que expresa dicho polipéptido de la presente divulgación, preferentemente de un baculovirus recombinante, y iii) una parte del sobrenadante del cultivo celular.

Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales, preferentemente animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre, que comprende la etapa de administrar al animal que necesite dicho tratamiento, una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación, en el que el polipéptido de la presente divulgación es un polipéptido recombinante, preferentemente un polipéptido de la presente invención expresado en baculovirus. Preferentemente, los polipéptidos de la presente divulgación recombinantes o expresados en baculovirus tienen la secuencia descrita anteriormente.

La composición inmunogénica, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación descritos anteriormente, preferentemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una parte del vector vírico que expresa dicho polipéptido de la presente divulgación, preferentemente de un baculovirus recombinante, y iii) una parte del cultivo celular; en donde aproximadamente el 90 % de los componentes tiene un tamaño inferior a 1 µm.

La composición inmunogénica, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de los polipéptidos de la presente invención descritos anteriormente, preferentemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una parte del vector vírico que expresa dicho polipéptido de la presente divulgación, iii) una parte del cultivo celular, iv) y un agente inactivante para inactivar el vector vírico recombinante, preferentemente BEI (etilamina binaria), en donde aproximadamente el 90 % de los componentes i) a iii) tiene un tamaño inferior a 1 µm. Preferentemente, la BEI está presente en concentraciones eficaces para inactivar el baculovirus, preferentemente en una cantidad de BEI de 2 a aproximadamente 8 mM, preferentemente una cantidad de BEI de aproximadamente 5 mM.

La composición inmunogénica, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a una composición que comprende i) cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación descritos anteriormente, preferentemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una parte del vector vírico que expresa dicho polipéptido de la presente divulgación, iii) una parte del cultivo celular, iv) un agente inactivante para inactivar el vector vírico recombinante, preferentemente BEI, y v) un agente neutralizante para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, en donde aproximadamente el 90 % de los componentes i) a iii) tiene un tamaño inferior a 1 µm. Preferentemente, si el agente inactivante es BEI, dicha composición comprende tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a las de BEI.

La proteína se incorpora en una composición que puede administrarse a un animal susceptible a infección por PCV2. En las formas preferidas, la composición también puede incluir componentes adicionales conocidos por los expertos en la técnica (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18a ed. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más vehículos aceptables desde un punto de vista veterinario. Como se utiliza en el presente documento, "un vehículo aceptable desde un punto de vista veterinario" incluye uno y todos los disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasan la adsorción y similares. En un aspecto preferido, la composición inmunogénica comprende el polipéptido de la presente divulgación proporcionado en el presente documento, preferentemente en las concentraciones descritas

anteriormente, que se mezcla con un adyuvante, preferentemente Carbopol, y solución salina fisiológica.

Los expertos en la técnica comprenderán que la composición utilizada en el presente documento puede incorporar soluciones estériles inyectables conocidas, fisiológicamente aceptables. Para preparar una solución lista para utilizar para inyección parenteral o infusión, se dispone fácilmente de soluciones isotónicas acuosas, tales como, por ejemplo, solución salina o soluciones de proteínas plasmáticas correspondientes. Además, las composiciones inmunogénicas y de vacuna de la presente divulgación pueden incluir diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen, entre otros, albúmina y sales alcalinas del ácido etilendiaminotetracético.

Como "adyuvantes", tal y como se utiliza en el presente documento, pueden incluirse hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede basarse, en particular, en aceite de parafina líquido ligero (tipo de la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide, tal como aceite escualano o escualeno resultante de la teoligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o alcoholes ramificados, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son, preferentemente, tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isosteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que están etoxilados opcionalmente, y bloques de copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, en especial L121. Véase Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). JohnWiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997).

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

Otro ejemplo de adyuvante es un compuesto elegido entre los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialqueno éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, nº 2, junio 1996). Los expertos en la técnica también pueden aludir a la patente de Estados Unidos No. 2.909.462 que describe dichos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos reemplazados por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener por sí mismos otros sustituyentes tal como metilo. Los productos comercializados con el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EEUU) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alil sacarosa o con alil pentaeritritol. Entre ellos, se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Carbopol, en particular el uso de Carbopol 971P, preferentemente en cantidades de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, aún más preferido en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis y, lo más preferido, en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

Otros adyuvantes adecuados incluyen, pero no sin limitación, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), el copolímero en bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lípido A, adyuvante de lípido amina Avridina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o de otra forma), toxina del cólera, IMS 1314, o dipéptido muramilo, entre muchos otros.

Preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis. Lo más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

Adicionalmente, la composición puede incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Como se utiliza en el presente documento, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasan la adsorción y similares. Lo más preferentemente, la composición proporcionada en el presente documento, contiene el polipéptido de la presente divulgación recuperado del sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, en el que dichas células estaban infectadas con un vector vírico

recombinante que contiene ADN que codifica el polipéptido de la presente divulgación y que expresan el polipéptido de la presente divulgación, y en el que dicho cultivo celular se trató con BEI a una concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, preferentemente de aproximadamente 5 mM, para inactivar el vector vírico, y con una concentración equivalente de un agente neutralizante, preferentemente una solución de tiosulfato de sodio, a una concentración final de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, preferentemente de aproximadamente 5 mM.

La presente divulgación también se refiere a una composición inmunogénica, que comprende i) cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación descritos anteriormente, preferentemente en las concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una parte del vector vírico que expresa dicho polipéptido de la presente divulgación, iii) una parte del cultivo celular, iv) un agente inactivante para inactivar el vector vírico recombinante, preferentemente BEI, y v) un agente neutralizante para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, preferentemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a la de BEI; y vi) un adyuvante adecuado, preferentemente Carbopol 971 en las cantidades descritas anteriormente; en donde aproximadamente el 90 % de los componentes i) a iii) tienen un tamaño inferior a 1 µm. Según un aspecto adicional, esta composición inmunogénica comprende, además, una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente una sal fosfato en concentraciones fisiológicamente aceptables. Preferentemente, el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a un pH fisiológico, lo que significa entre aproximadamente 6,5 y 7,5.

La composición inmunogénica, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a una composición que comprende, por un ml (i) al menos 1,6 µg del polipéptido de la presente divulgación descrito anteriormente, preferentemente menos de 20 µg (ii) al menos una parte de baculovirus que expresa dicho polipéptido de la presente divulgación, (iii) una parte del cultivo celular, (iv) BEI de aproximadamente 2 a 8 mM, v) tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a las de BEI; y (vi) aproximadamente 1 mg de Carbopol 971, y (vii) sal fosfato en una concentración fisiológicamente aceptable; en donde aproximadamente el 90 % de los componentes (i) a (iii) tienen un tamaño inferior a 1 µm y el pH de dicha composición inmunogénica se ajusta a de aproximadamente 6,5 a 7,5.

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir además uno o más agentes inmunomoduladores distintos tales como, por ejemplo, interleucinas, interferones u otras citocinas. Las composiciones inmunogénicas también pueden incluir Gentamicina y Mertiolo. Aunque el experto en la técnica puede determinar fácilmente las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente divulgación, dicha divulgación contempla composiciones que comprenden de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 2 000 µg de adyuvante y preferentemente aproximadamente 250 µg/ml de dosis de la composición de vacuna. Por tanto, la composición inmunogénica, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a una composición que comprende una cantidad de antibióticos de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml y, más preferentemente, una cantidad inferior a aproximadamente 30 µg/ml.

La composición inmunogénica, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a una composición que comprende (i) cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación descritos anteriormente, preferentemente en las concentraciones descritas anteriormente, (ii) al menos una parte del vector vírico que expresa dicho polipéptido de la presente divulgación, (iii) una parte del cultivo celular, (iv) un agente inactivante para inactivar el vector vírico recombinante, preferentemente BEI, y (v) un agente neutralizante para detener la inactivación mediada por el agente inactivante, preferentemente tiosulfato de sodio en cantidades equivalentes a las de BEI; (vi) un adyuvante adecuado, preferentemente Carbopol 971, en las cantidades descritas anteriormente; (vii) una concentración farmacéuticamente aceptable de un tampón salino, preferentemente de una sal fosfato, y (viii) un agente antimicrobiano activo; en donde aproximadamente el 90% de los componentes (i) a (iii) tienen un tamaño inferior a 1 µm.

Para la investigación de una posible interferencia del polipéptido de la presente divulgación con el anticuerpo materno se realizó un estudio en el que se determinaron los títulos de los anticuerpos de los animales en estudio en el momento de la vacunación que se agrupan en una clase de anticuerpos baja, moderada y alta: Los títulos medios geométricos de < 1:100 se consideraron como títulos bajos de anticuerpo, los títulos de 1:100 a 1:1.000 se consideraron como títulos moderados de anticuerpo y los títulos de >1:1.000 se consideraron como títulos altos de anticuerpo. Este patrón de agrupamiento es comparable con el realizado en un estudio de campo canadiense en el que los títulos de anticuerpo de 1:80 se consideraron como títulos bajos de anticuerpos, los títulos de anticuerpo de 1:640 se consideraron moderados y los títulos de anticuerpo de > 1:1.280 se consideraron altos (Laroche et al., 2003, Can. J. Vet. Res.; 67: 114-120). Con el fin de analizar el impacto de los títulos bajos, moderados y altos de los anticuerpos en el momento de la vacunación en la viremia, se compararon los animales vacunados y los tratados con placebo con respecto a la aparición, finalización, duración de la viremia, el número de días de muestreo positivo y la carga viral. La presencia de anticuerpos anti-PCV2, en particular de anticuerpos procedentes de la madre, preferentemente no tenía un impacto significativo en ninguno de estos parámetros. En otras palabras, la eficacia del polipéptido de la presente divulgación en la prevención y tratamiento de una infección por PCV2 o en la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales, no se ve, preferentemente, afectada el día de la vacunación, por la presencia de anticuerpos anti-PCV2, preferentemente por títulos de anticuerpos anti-PCV2 de hasta 1:100, preferentemente de más de 1:100, aún más preferentemente de más de 1:250, aún más preferentemente de más de 1:500, aún más preferentemente de 1:640; aún más preferentemente de

más de 1:750, lo más preferentemente de más de 1:1.000. Este efecto puede mostrarse en un experimento de vacunación inyectable, que significa que el polipéptido de la presente divulgación se administra solo una vez y sin ninguna administración posterior del polipéptido de la presente divulgación.

- 5 En la técnica se conocen bien métodos de detección y cuantificación de anticuerpos anti-PCV2. Por ejemplo, la detección y cuantificación de anticuerpos anti-PCV2 pueden realizarse por inmunofluorescencia directa como se describe en Magar et al., 2000, Can. J. Vet Res.; 64: 184-186 o en Magar et al., 2000, J. Comp. Pathol.; 123: 258-269). Otros ensayos de cuantificación de anticuerpos anti-PCV2 se describen en Opriessnig et al., 2006, 37th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. Más aún, un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, que puede utilizar un experto en la técnica, comprende las siguientes etapas: sembrar aproximadamente de 20.000 a 60.000 células PK15 o VIDO R1 por pocillo en una placa de 96 pocillos; infectar las células con aislado de PCV2, cuando las monocapas alcanzan una confluencia de aproximadamente 65 a 85%, incubar las células infectadas durante 48 horas; eliminar el medio y lavar las células 2 veces con PBS; desechar el tampón de lavado y tratar las células con fijador de metanol/acetona a 50/50 frío (~100 µl/pocillo) durante aproximadamente de 15 min a aproximadamente -20° C; desechar el fijante y secar al aire las placas; preparar diluciones en serie de muestras de suero porcino en PBS y diluciones en serie de una muestra positiva de anti-PCV2 y de control negativo (Muestras de Control Positivo y Control Negativo); añadir las diluciones en serie a las placas e incubar durante aproximadamente 1 hora a 36,5±1° C, para permitir que los anticuerpos se unan si están presentes en las muestras de suero; lavar las placas tres veces con PBS y desechar el PBS; tñir las placas con un conjugado comercial de anticuerpo de cabra contra cerdo conjugado con FITC diluido 1:100 en PBS e incubar durante aproximadamente 1 hora a 36,5±1° C; retirar las microplacas de la incubadora, desechar el conjugado y lavar las placas 2 veces con PBS; leer las placas usando un microscopio UV y registrar los pocillos individuales como positivos o negativos, en donde las muestras de Control Positivo y Control Negativo se usan para controlar el sistema de ensayo; y calcular los títulos de anticuerpo en suero usando la dilución más alta que muestra reactividad específica de inmunofluorescencia y el número de pocillos positivos por dilución, o se calcula un criterio de valoración del 50 % se calcula usando la fórmula de Reed-Muench apropiada.

Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 2008/076915 A2.

- 30 En los casos de resultados controvertidos y en cualquier cuestión dudosa, los títulos de anti-PCV2, tal y como se mencionan en el presente documento, se refieren a los que se estiman/pueden estimarse con este ensayo.

- Por tanto, según un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales, preferentemente animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, en particular anticuerpo maternos, que comprende la etapa de administrar, al animal que necesite dicho tratamiento, una cantidad eficaz de un polipéptido de la presente divulgación, preferentemente una cantidad menor de 20 µg/dosis, en donde dicho animal tiene un título detectable de anticuerpo anti-PCV2 de hasta 1:100, preferentemente de más de 1:100, aún más preferentemente de más de 1:250, aún más preferentemente de más de 1:500, aún más preferentemente de 1:640, aún más preferentemente de más de 1:750, lo más preferentemente de más de 1:1.000. Preferentemente, este título de anticuerpos anti-PCV2 es detectable y cuantificable en un inmunoensayo específico anti-PCV2, preferentemente en el ensayo como se ha descrito anteriormente, según se describe de manera ilustrativa en el Ejemplo 2 del documento WO 2008/076915 A2. Más preferentemente, estos anticuerpos anti-PCV-2 son anticuerpos procedentes de la madre. Lo más preferentemente, el polipéptido de la presente divulgación solo se administra una vez, preferentemente a una dosis inferior a 20 µg/dosis.

- Los lechones que tienen solo títulos bajos (< 1:100) o moderados (< 1:1.000) de anticuerpos anti-PCV2 procedentes de la madre no están suficientemente protegidos contra las infecciones por PCV2 que se producen antes de las 3 semanas de vida. Por lo tanto, es deseable la vacunación en una etapa muy temprana de su vida. En el contexto de la divulgación, se prefiere la vacunación/tratamiento de los animales a las 3 semanas de vida o antes. Además, preferentemente, los títulos de anticuerpo anti-PCV2 de más de 1:1.000 no influyen sobre la eficacia de la vacuna contra PCV2 independientemente del nivel del título inicial existente del anticuerpo. Por ejemplo, la vacunación de animales con título alto (título del anticuerpo anti-PCV2 > 1:1.000) dio como resultado, preferentemente, una duración más corta de la viremia, una finalización más temprana de la viremia, menos días de muestreo virémico y una reducción de la suma de equivalentes genómicos/ml en comparación con los animales de control no vacunados. Después de la comparación de "animales con título alto" "moderado" y "bajo" no se observaron diferencias significativas preferentemente con respecto a los diferentes parámetros de la viremia de PCV2. Asimismo, en presencia de título altos de anticuerpo anti-PCV2, el polipéptido de la presente divulgación utilizado para la vacunación reduce, preferentemente, de manera significativa, la viremia en la sangre (finalización de la viremia, duración de la viremia, carga vírica). Preferentemente, no se encuentran diferencias con respecto al peso corporal vivo cuando se compararon animales con título bajo y alto del grupo vacunado. Además, los animales vacunados con un título alto de anticuerpo anti-PCV2 en el momento de la vacunación/tratamiento (> 1:1.000) también mostraron, preferentemente, un peso corporal significativamente más alto después de la aparición de la viremia en comparación con los animales tratados con placebo con títulos altos de anticuerpo iniciales. Consecuentemente, de acuerdo con un aspecto preferido, es posible la vacunación/tratamiento de los animales de 1 día de vida o mayores con el polipéptido de la presente divulgación. Sin embargo, la vacunación debe realizarse en las 8 primeras

semanas de vida, preferentemente en las 7 primeras semanas de vida. Por tanto, según un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales, que comprende la etapa de administrar, el primer día de vida o posteriormente, aunque preferentemente no después de las 8 semanas de vida, al animal que necesite dicho tratamiento, una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación. Según un aspecto preferido, para conferir inmunidad a dicho animal, se necesitan menos de 20 µg/dosis del polipéptido de la presente divulgación. Según un aspecto más preferido, el polipéptido de la presente divulgación, se administra solo una vez al animal que necesita dicho tratamiento, preferentemente a una cantidad menor de 20 µg/dosis.

Según un aspecto adicional, más general, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un polipéptido de la presente divulgación al animal que necesite dicho tratamiento.

La expresión "animal joven" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un animal de 1 a 22 días de vida. Preferentemente, la expresión animal joven se refiere a un animal de 1 a 20 días de vida. Más preferentemente, la expresión animal joven se refiere a un animal de 1 a 15 días de vida, aún más preferentemente de 1 día de vida a 14 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 12 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 10 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 8 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 7 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 6 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 5 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 4 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 3 días de vida, aún más preferentemente de 1 o 2 días de vida, lo más preferentemente a un animal de 1 día de vida. Por tanto, según un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar, una cantidad eficaz de un polipéptido de la presente divulgación a un animal de 1 a 22 días de vida, preferentemente de 1 a 20 días de vida, más preferentemente de 1 a 15 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 14 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 12 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 10 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 8 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 7 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 6 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 5 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 4 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 3 días de vida, aún más preferentemente de 1 o 2 días de vida, lo más preferentemente el día 1 de vida, que necesite dicho tratamiento. Por ejemplo, la vacunación/tratamiento los días 19 a 22 de vida muestra, preferentemente, una alta eficacia de vacunación. Además, la vacunación/tratamiento los días 12 a 18, preferentemente, los días 12 a 14 de vida es, preferentemente, muy eficaz en la reducción de los signos clínicos asociados a infecciones por PCV2, reducción de la carga vírica total, reducción de la duración de la viremia, retraso en la aparición de la viremia, aumento de peso. Además, la vacunación en la semana 1 de vida es preferentemente muy eficaz en la reducción de los signos clínicos asociados a infecciones por PCV2, reducción de la carga vírica total, reducción de la duración de la viremia, retraso en la aparición de la viremia, aumento de peso. Preferentemente, se necesitan menos de 20 µg/dosis del polipéptido de la presente divulgación para conferir inmunidad a estos animales jóvenes. Según un aspecto más preferido, el polipéptido de la presente divulgación, se administra una sola vez al animal joven que necesita dicho tratamiento, preferentemente a una dosis menor de 20 µg.

Debido a la ubicuidad del PCV2 en el campo, la mayoría de los lechones jóvenes son seropositivos respecto al PCV2. Por tanto, según un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes, preferentemente animales que tienen anticuerpos anti-PCV2 el día de la vacunación, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un polipéptido de la presente divulgación a un animal de 1 a 22 días de vida, preferentemente de 1 a 20 días de vida, más preferentemente de 1 a 15 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 14 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 12 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 10 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 8 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 7 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 6 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 5 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 4 días de vida, aún más preferentemente de 1 a 3 días de vida, aún más preferentemente el 1 o 2 de vida, lo más preferentemente el día 1 de vida, que necesite dicho tratamiento. Preferentemente dichos animales jóvenes, el día de la vacunación/tratamiento, tienen un título detectable de anticuerpo anti-PCV2 de hasta 1:100, preferentemente de más de 1:100, aún más preferentemente de más de 1:250, aún más preferentemente de más de 1:500, aún más preferentemente de 1:640, aún más preferentemente de más de 1:750, lo más preferentemente de más de 1:1.000 el día de la vacunación/tratamiento. Preferentemente, para conferir una inmunidad suficiente a estos animales jóvenes, se requieren menos de 20 µg/dosis del polipéptido de la presente divulgación. Según una realización más preferida, el polipéptido de la presente divulgación, se administra una sola vez al animal joven que necesita dicho tratamiento, preferentemente a una dosis menor de 20 µg.

Como se ha descrito anteriormente, la vacunación/tratamiento de animales jóvenes con el polipéptido de la presente divulgación produce, preferentemente, una disminución de la fase virémica en comparación con la de los animales de control no vacunados. El tiempo promedio de disminución puede ser, por ejemplo, preferentemente de 9,5 días

en comparación con el de los animales de control no vacunados de la misma especie. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación al animal que necesite dicho tratamiento, en donde el tratamiento o la prevención produce una disminución de la fase virémica de 5 días o más, preferentemente de 6 días o más, aún más preferentemente de 7 días o más, aún más preferentemente de 8 días o más, aún más preferentemente de 9, aún más preferentemente de 10, aún más preferentemente de 12, aún más preferentemente de 14, lo más preferentemente de más de 16 días en comparación con los animales de un grupo de control no tratado de la misma especie. En algunos casos, la fase virémica se reduce, preferentemente, durante más de 20 días. En general, la vacunación de lechones jóvenes produce, preferentemente, una reducción de la pérdida de aumento de peso, una menor duración de la viremia, una finalización más temprana de la viremia y una carga vírica más baja. Por lo tanto, según un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos producidos por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación al animal que necesite dicho tratamiento, en donde dicho tratamiento o prevención de infección por PCV2 produce una mejora, si se compara con animales de un grupo de control no tratado de la misma especie, de un parámetro de eficacia de vacunación seleccionado del grupo que consiste en una reducción de la pérdida de aumento de peso, una duración más corta de la viremia, una finalización más temprana de la viremia, una carga vírica más baja, o combinaciones de éstos. Preferentemente, se requieren menos de 20 µg/dosis del polipéptido de la presente divulgación para producir una mejora de cualquiera de los parámetros de eficacia de la vacuna mencionados anteriormente. Además, dichos parámetros mejorados de eficacia de la vacuna se consiguen mediante una única administración de solo una dosis.

La expresión “una cantidad eficaz”, como se utiliza en el presente documento, significa, pero sin limitación, una cantidad del polipéptido de la presente divulgación que suscita o que es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un animal al que se administra dicha dosis eficaz del polipéptido de la presente divulgación. Preferentemente, una cantidad eficaz se define como una cantidad del polipéptido de la presente divulgación que confiere al menos una duración de la inmunidad (DOI, *duration of immunity*) de 10 semanas, preferentemente al menos una (DOI) de 12 semanas, más preferentemente al menos una (DOI) de 15 semanas, lo más preferentemente al menos una (DOI) de 20 semanas.

La cantidad que es eficaz depende de los ingredientes de la vacuna y del esquema de administración. Típicamente, cuando en la vacuna de combinación se utiliza un virus inactivado o una preparación con un virus vivo modificado, se utilizará una cantidad de vacuna que contenga una TCID₅₀ de aproximadamente 10^{2,0} a aproximadamente 10^{9,0} por dosis, preferentemente una TCID₅₀ de aproximadamente 10^{3,0} a aproximadamente 10^{8,0} por dosis, más preferentemente, una TCID₅₀ de aproximadamente 10^{4,0} a aproximadamente 10^{8,0} por dosis. En particular, cuando en las vacunas se utiliza PCV2 vivo modificado, la dosis recomendada a administrar al animal susceptible es, preferentemente, una TCID₅₀ (dosis infectiva del 50 % en cultivo celular/dosis) de aproximadamente 10^{3,0} a aproximadamente 10^{6,0} y más preferentemente una TCID₅₀/dosis de aproximadamente 10^{4,0} a aproximadamente 10^{5,0}. En general, cuando se utiliza antígeno purificado, la cantidad de antígeno estará comprendida entre 0,2 y 5 000 microgramos, y una TCID₅₀ de entre 10^{2,0} y 10^{9,0}, preferentemente una TCID₅₀ de entre 10^{3,0} y 10^{6,0}, más preferentemente una TCID₅₀ de entre 10^{4,0} y 10^{5,0}.

Las vacunas subunitarias se administran normalmente con un nivel de inclusión de una proteína de al menos 0,2 µg de proteína por dosis, preferentemente con un nivel de inclusión de una proteína de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 18 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 16 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 µg/dosis, aún más preferentemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 µg/dosis, todavía más preferentemente de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 µg/dosis.

Preferentemente, el uso profiláctico de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente, es eficaz para la reducción de los signos clínicos causados por o asociados a infecciones por PCV2, preferentemente en animales jóvenes y/o en animales que tienen inmunidad pasiva contra PCV2 el día del tratamiento. En particular, el uso profiláctico de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento, y específicamente de las composiciones que comprenden el polipéptido de la presente divulgación, es preferentemente eficaz para reducir la linfadenopatía, el empobrecimiento linfóide y/o de histiocitos multinucleados/gigantes en animales infectados por PCV2 y que tiene anticuerpos anti-PCV-2 maternos el día del tratamiento/vacunación. Por ejemplo, se descubrió que el uso profiláctico de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento, es eficaz para reducir el empobrecimiento linfóide, la inflamación linfóide, la IHC positiva para el antígeno PCV2 del tejido linfóide, viremia, excreción nasal, pirexia, aumento de peso diario promedio reducido, inflamación pulmonar, la IHC positiva para el antígeno PCV2 del tejido pulmonar.

Por otro lado, el uso profiláctico de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento, es preferentemente eficaz para reducir (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez o ictericia cutánea, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductivos, por ej., aborto, muertes intrauterinas, momificaciones, etc., (7) lesiones similares a pia, normalmente conocidas por estar asociadas a infecciones por la bacteria *Lawsonia intracellularis* (Ileítis), (8) linfadenopatía, (9) empobrecimiento linfoide y/o (10) de histiocitos multinucleados/gigantes (11) síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PDNS, siglas del inglés *porcine dermatitis and nephropathy syndrome*), (12) mortalidad asociada a PCVAD (siglas del inglés *porcine circovirus associated disease*, enfermedad asociada con circovirus porcino), (13) pérdida de peso asociada a PCVAD, (14), variabilidad de crecimiento reducido (15), frecuencia reducida de 'camadas' (16), infecciones concomitantes reducidas con Complejo por Enfermedad Respiratoria y Reproductora Porcina (Porcine Reproductive and Respiratory Disease Complex (PRRSV)). Dicha composición inmunogénica también es eficaz en la mejora de los parámetros de crecimiento importantes desde el punto de vista económico, tales como el tiempo hasta la matanza, el peso del esqueleto y la proporción de carne magra. Por tanto, la expresión "signos clínicos" como se usa en el presente documento, significa, pero sin limitación (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez o ictericia cutánea, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductivos, por ej., aborto, muertes intrauterinas, momificaciones, etc., (7) lesiones similares a pia, normalmente conocidas por estar asociadas a las infecciones por *Lawsonia intracellularis* (Ileítis), (8) linfadenopatía, (9) empobrecimiento linfoide y/o (10) de histiocitos multinucleados/gigantes (11) síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PDNS), (12) mortalidad asociada a PCVAD, (13) pérdida de peso asociada a PCVAD, (14), variabilidad de crecimiento reducido (15), frecuencia reducida de 'camadas' (16), infecciones concomitantes reducidas con Complejo por Enfermedad Respiratoria y Reproductora Porcina (PRRSV), (17) inflamación linfoide, (18) IHC positiva para antígeno PCV2 de tejido linfoide, (19) viremia, (20) excreción nasal, (21) pirexia, (22) aumento de peso promedio diario reducido, (23) inflamación pulmonar, (24) IHC positiva para el antígeno PCV2 de tejido pulmonar. Asimismo, la composición inmunogénica descrita en el presente documento reduce la carga general de circovirus incluyendo la aparición tardía, una menor duración, un final temprano de viremia y una carga vírica reducida y su impacto inmunosupresor en animales jóvenes, en particular en los que tienen anticuerpos anti-PCV2 el día de la vacunación, generando de este modo un nivel más alto de resistencia general a la enfermedad y una reducida frecuencia de enfermedades y signos clínicos asociados a PCV2.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de signos clínicos causados por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes y/o en animales, preferentemente animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación a ese animal que necesita dicho tratamiento, en donde esos signos clínicos se seleccionan del grupo que consiste en: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez o ictericia cutánea, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductivos, por ej., aborto, muertes intrauterinas, momificaciones, etc., (7) lesiones similares a pia, normalmente conocidas por estar asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis* (Ileítis), (8) linfadenopatía, (9) empobrecimiento linfoide y/o (10) de histiocitos multinucleados/gigantes (11) síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PDNS), (12) mortalidad asociada a PCVAD, (13) pérdida de peso asociada a PCVAD, (14), variabilidad de crecimiento reducido (15), frecuencia reducida de 'camadas' (16), infecciones concomitantes reducidas con Complejo por Enfermedad Respiratoria y Reproductora Porcina (PRRSV), (17) inflamación linfoide, (18) IHC positiva para antígeno PCV2 de tejido linfoide, (19) viremia, (20) excreción nasal, (21) pirexia, (22) aumento de peso promedio diario reducido, (23) inflamación pulmonar, (24) IHC positiva para el antígeno PCV2 de tejido pulmonar.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos causados por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación a ese animal que necesita dicho tratamiento, en donde esos signos clínicos se seleccionan del grupo que consiste en: (1) neumonía intersticial con edema interlobular, (2) palidez o ictericia cutánea, (3) hígados atroficos moteados, (4) úlceras gástricas, (5) nefritis y (6) trastornos reproductivos, por ej., aborto, muertes intrauterinas, momificaciones, etc., (7) lesiones similares a pia, normalmente conocidas por estar asociadas a infecciones por *Lawsonia intracellularis* (Ileítis), (8) linfadenopatía, (9) empobrecimiento linfoide y/o (10) de histiocitos multinucleados/gigantes (11) síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PDNS), (12) mortalidad asociada a PCVAD, (13) pérdida de peso asociada a PCVAD, (14), variabilidad de crecimiento reducido (15), frecuencia reducida de 'camadas' (16), infecciones concomitantes reducidas con Complejo por Enfermedad Respiratoria y Reproductora Porcina (PRRSV), (17) inflamación linfoide, (18) IHC positiva para antígeno PCV2 de tejido linfoide, (19) viremia, (20) excreción nasal, (21) pirexia, (22) aumento de peso promedio diario reducido, (23) inflamación pulmonar, (24) IHC positiva para el antígeno PCV2 de tejido pulmonar.

La composición según la invención puede aplicarse por vía oral, intradérmica, intratraqueal o intravaginal. Preferentemente, la composición puede aplicarse por vía intramuscular o intranasal, lo más preferentemente por vía intramuscular. En un cuerpo animal, puede resultar ventajoso aplicar las composiciones farmacéuticas, según se ha descrito anteriormente, en tejidos diana a través de una inyección intravenosa o por inyección directa. Para la aplicación sistémica, se prefieren las vías intravenosa, intravascular, intramuscular, intranasal, intraarterial, intraperitoneal, oral o intratecal. Se puede efectuar una aplicación más local por vía subcutánea, intradérmica,

intracutánea, intracardiaca, intralobular, intramedular, intrapulmonar, o directamente en o cerca del tejido a tratar (tejido conjuntivo, óseo, muscular, nervioso, epitelial). Dependiendo de la duración y de la eficacia de tratamiento deseadas, las composiciones según la invención pueden administrarse una o varias veces, también de forma intermitente, por ejemplo, diariamente durante varios días, semanas o meses y en diferentes dosificaciones.

Preferentemente, una dosis de la composición inmunogénica como se describió con anterioridad se administra por vía intramuscular a un sujeto que lo necesita. De acuerdo con un aspecto adicional, el polipéptido de la presente divulgación o la composición inmunogénica que comprende cualquiera de dicho polipéptido de la presente divulgación como se describe en el presente documento, se envasa en frascos y se administra a razón de un (1) ml por dosis. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona una composición inmunogénica de 1 ml, que comprende el polipéptido de la presente divulgación como se describe en el presente documento, para el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos causados por o asociados a una infección por PCV2 en animales jóvenes que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación a ese animal que necesita dicho tratamiento. De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona una composición inmunogénica de 1 ml, que comprende el polipéptido de la presente divulgación como se describe en el presente documento, para el tratamiento o la profilaxis de una infección por PCV2 o para la reducción de los signos clínicos causados por o asociados a una infección por PCV2 en animales, preferentemente animales que tienen anticuerpos anti-PCV2, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del polipéptido de la presente divulgación o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de la presente divulgación a ese animal que necesita dicho tratamiento.

Según un aspecto adicional, a un sujeto que lo necesita, se le proporciona al menos una administración adicional de al menos una dosis de la composición inmunogénica descrita anteriormente, en el que la segunda o cualquier administración adicional se proporciona al menos 14 días después de la administración inicial o de cualquier administración anterior. Preferentemente, la composición inmunogénica se administra con un inmunoestimulador. Preferentemente, dicho inmunoestimulador se proporciona al menos dos veces. Preferentemente, entre la primera y segunda administración y entre la segunda o cualquier administración adicional del inmunoestimulador, hay un intervalo de tiempo de al menos 3 días, más preferentemente de al menos 5 días, aún más preferentemente de al menos 7 días. Preferentemente, el inmunoestimulador se proporciona al menos 10 días, preferentemente 15 días, aún más preferentemente 20 días, aún más preferentemente 22 días después de la administración inicial de la composición inmunogénica proporcionada en el presente documento. Un inmunoestimulador preferido es, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH, *keyhole limpet hemocyanin*), preferentemente emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA). Sin embargo, con el presente documento se entiende, que también puede utilizarse otro inmunoestimulador conocido por un experto en la técnica. El término "inmunoestimulador", tal y como se utiliza en el presente documento, significa cualquier agente o composición que pueda desencadenar la respuesta inmunitaria, preferentemente sin iniciar ni aumentar una respuesta inmunitaria específica, por ejemplo, la respuesta inmunitaria contra un agente patógeno específico. Se enseña además a administrar el inmunoestimulador a una dosis adecuada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Los ejemplos siguientes muestran los materiales y procedimientos preferidos según la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, los métodos, equipos y materiales preferidos se describen a continuación. Sin embargo, ha de entenderse, que estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente, y nada en ellos debe considerarse como una limitación del alcance global de la invención.

EJEMPLO 1

Materiales y procedimiento/diseño de mutantes

La secuencia de aminoácidos de la ORF2 de PCV2a de la proteína ORF2 de PCV2 incluida en el producto CIRCOFLEX®, se alineó con la secuencia de aminoácidos de la ORF2 de PCV2b BDH y con diversas otras secuencias de aminoácidos de la ORF2 de PCV2a y PCV2b publicadas, procedentes del Genbank, usando el método de Clustal W. Las diferencias de las posiciones de los aminoácidos principales entre las secuencias de la ORF2 de PCV2a y PCV2b, se identificaron como posibles posiciones para la mutación (véase la FIG. 1). Usando los cambios identificados de los aminoácidos principales, se prepararon siete secuencias codificantes de la ORF2 de PCV2b intercambiando el aminoácido de la ORF2 de PCV2b BDH por el correspondiente aminoácido de la ORF de PCV2a. Para codificar los aminoácidos mutantes, se usaron codones de la ORF2 de PCV2a (CIRCOFLEX®). A continuación, se detallan las siete construcciones de ORF2 de PCV2b mutantes:

1. ORF2 de PCV2b BDH K59A
2. ORF2 de PCV2b BDH R63T
3. ORF2 de PCV2b BDH R63K
4. ORF2 de PCV2b BDH SFCO P88K T151P**

5. ORF2 de PCV2b BDH G191R
6. ORF2b de PCV2b BDH I206K
7. ORF2 de PCV2b BDH N232E

5 Todas las secuencias codificantes se sintetizaron en Integrated DNA Technologies, excepto la n.º 4 que se creó mediante mutagénesis dirigida de una secuencia codificante de la ORF2b de PCV2b BDH SFCO sintetizada.

** SFCO = codón optimizado para *Spodoptera frugiperda*. Esta construcción se creó antes de la alineación descrita anteriormente, a través de una evaluación de secuencias preliminar. Las dos mutaciones también se identificaron en esta evaluación de secuencias.

Preparación de Baculovirus de ORF2 de PCV2b mutante

15 Cada una de las siete secuencias codificantes de ORF2 de PCV2b mutantes, así como la secuencia codificante de la ORF2 de PCV2b BDH no mutada, se clonaron en el vector de transferencia de baculovirus pVL1393 y se co-transfectaron con ADN de baculovirus en células Sf9. Cada baculovirus recombinante resultante se comprobó para determinar la expresión de ORF2 de PCV2b mediante IFA. Se prepararon reservas amplificadas de cada baculovirus recombinante en células Sf+ y se titularon a través del método de TCID₅₀ para determinar el título baculovírico.

20 Evaluación de la expresión de Baculovirus de ORF2 de PCV2b mutante

Cada baculovirus recombinante se evaluó para determinar la expresión de su secuencia codificante de ORF2 de PCV2b infectando células Sf+ a un MOI específica de 0,1. Se dejó que las infecciones continuasen durante 5 - 7 días y después se recogieron por centrifugado a 20 000 g durante 20 min para eliminar los residuos celulares y las proteínas insolubles. Los sobrenadantes recogidos se filtraron con un filtro de 0,2 µm y se evaluaron directamente para determinar la expresión de la ORF2 de PCV2b por transferencia Western usando anticuerpos α-PCV2 (véase, por ej., la FIG. 2). Los sobrenadantes recogidos también se evaluaron para determinar la presencia de estructuras macromoleculares. En resumen, una muestra de cada sobrenadante recogido se centrifugó a 100 000 g durante dos horas. Los sedimentos resultantes se suspendieron nuevamente en un pequeño volumen de TBS y se separaron mediante SDS-PAGE. Las bandas de ORF2 de PCV2b se detectaron en geles teñidos por comparación de tamaño con la ORF2 de PCV2a (véase, por ej., la FIG. 3). Los sedimentos nuevamente suspendidos se separaron también durante dos horas en un gradiente de sacarosa discontinuo al 10 % - 60 % por centrifugado a 100 000 g para purificar parcialmente las proteínas ORF2 de PCV2b para determinar la cuantificación y confirmación de VLP mediante microscopia electrónica (ME) (por ej., la FIG. 4).

Después de la separación mediante gradiente de sacarosa, las fracciones que contenían la ORF2 de PCV2b se agruparon y la concentración de ORF2 de PCV2b se determinó mediante densitometría en gel SDS-PAGE en comparación con una curva patrón de BSA. Además, también se concentró una muestra del material purificado con gradiente de sacarosa y se sometió a confirmación de VLP por ME usando ácido fosfotúngstico como tinción negativa (véase, por ej., la FIG. 5).

En la FIG. 6 se muestran una tabla de los resultados de la evaluación de las construcciones mutantes de ORF2 de PCV2b BDH. Los resultados demostraron que una mutación sencilla de un aminoácido de arginina a treonina en la posición 63 aumentó casi diez veces la expresión de la ORF2 de PCV2b BDH en células Sf+. La mutación sencilla de R63T aumentó la expresión de la ORF2 de PCV2b BDH en células de Sf+ a niveles similares a los de la ORF2 de PCV2b. Un análisis de la secuencia de aminoácidos de la ORF2 de PCV2b BDH sugiere que el bucle BC puede ser susceptible a escisión por proteasas similares a tripsina. Los datos estructurales publicados por Khayat et al. en 2011 sugieren que la arginina 63 está en el bucle BC que se proyecta más allá de la cápside vírica de PCV2 formada por la proteína ORF2, dejándola susceptible a las proteasas liberadas después de la lisis de las células de Sf+ durante la replicación del baculovirus.

Además de la sustitución de la treonina en la posición 63, en otra realización de la invención, la arginina se sustituye con otros aminoácidos polares no cargados incluyendo serina, tirosina, asparagina y glutamina para obtener el mismo efecto estabilizante. Además, los aminoácidos no polares que incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y triptófano pueden lograr también el mismo efecto.

EJEMPLO 2

Con este estudio se demuestra la eficacia de una realización de la vacuna de ORF2b de tipo 2 del circovirus porcino frente a una provocación con PCV2a y/o PCV2b. En este estudio se utilizaron lechones desprovistos de calostro nacidos por cesárea (CDCD) y se separaron en 2 grupos; 1) cerdos vacunados con la vacuna contra el circovirus porcino experimental, que incluía la variante R63T de la ORF2 de PCV2b del Ejemplo 1 (Vector de baculovirus destruido), que se provocaron con PCV2b virulento y, 2) cerdos de control provocados no vacunados que se provocaron con PCV2b virulento. El Día 0, al Grupo 1 se le administró 1 ml de vacuna por vía intramuscular (IM) mientras que el Grupo 2, cerdos de control provocados no vacunados, no recibió ningún tratamiento. El Día 28, todos los cerdos de los grupos 1 y 2 se provocaron con 1 ml de PCV2b virulento por vía intranasal (IN) y con 1 ml IM

con una dosificación aproximada de 3,0 Log₁₀TCID₅₀/ml del virus vivo. Todos los cerdos recibieron 2,0 ml de hemocianina de lapa americana emulsionada en adyuvante Incompleto de Freund (KLH/ICFA) IM los Días 25 y 31. Se realizó un control diario de los cerdos se controlaron para determinar los signos clínicos, y periódicamente se extrajo sangre para la evaluación serológica. El Día 56 se realizó la necropsia de todos los cerdos, se extrajeron los tejidos seleccionados y se realizaron observaciones de patología macroscópica.

En general, los animales vacunados mostraron una reducción en todos los parámetros analizados cuando se compararon con su grupo de control con provocación respectivo.

EJEMPLO 3

Se produjeron diversas sustituciones distintas en el sitio de aminoácido 63 para comparar con la cepa nativa de la OFR de PCV2b BDH. En las FIGS. 7A y 7B se muestran los resultados de la evaluación de las construcciones mutantes de la ORF2 de PCV2b BDH. Los resultados demuestran que además de la mutación de aminoácido de arginina (R) a treonina (T) en la posición 63, la arginina (R) 63 a glicina (G), arginina (R) 63 a glutamina (Q) y la arginina (R) 63 a aspartato (D) aumentó al menos cuatro veces la expresión de la ORF2 de PCV2b BDH en células de Sf+ en comparación con la del tipo silvestre. En particular, las mutaciones sencillas R63G y R63Q aumentaron la expresión de la ORF2 de PCV2b BDH en células de Sf+ a niveles similares a los de la ORF2 de PCV2b.

Generación de baculovirus recombinante que codifica mutantes de la ORF2 de PCV2b R63

Mediante mutagénesis dirigida, se generaron mutaciones puntuales en la secuencia codificante de la ORF2 de PCV2b en la posición de aminoácido 63. Resumiendo, el plásmido de transferencia de baculovirus pVL1393 de la ORF2 de PCV2b se sometió a mutagénesis dirigida usando los cebadores de la Tabla 1. Los vectores de transferencia de baculovirus resultantes se secuenciaron para confirmar la mutación apropiada de la secuencia codificante y después se co-transfectaron con ADN de baculovirus linealizado en células de Sf9. Las co-transfecciones se recogieron 5 días después y se evaluaron con IFA (inmunofluorescencia) para determinar la expresión de la ORF2 de PCV2b usando anticuerpos específicos contra PCV2. Se generaron reservas amplificadas de cada baculovirus en células de Sf9 y se titularon a través de un método de TCID₅₀ basado en IFA usando un anticuerpo monoclonal de α -baculovirus gp64.

TABLA 1. Cebadores para la mutagénesis dirigida

Cebador	Sequence		
Directo	5'-CTGTCAAGAAAACACAGTCX1X2X3ACGCCCTCCTGGAATGTG-3'		
Inverso	Complemento inverso de directo		
Mutación	X ¹	X ²	X ³
R63D	G	A	C
R63Q	C	A	G
R63G	G	G	A
R63L	T	T	G
R63T	A	C	A

Expresión y cuantificación de VLP de ORF2 de PCV2b

En matraces giratorios se infectaron células de Sf+ con baculovirus recombinante a una MOI de 0,1 y se incubaron a 27° C con agitación constante a aproximadamente 100 rpm. Los cultivos infectados se recogieron una vez que la viabilidad de las células de Sf+ disminuyó por debajo del 30 % o a los 7 días después de la infección. Los baculovirus sin procesar recogidos se centrifugaron a 20 000 g durante 20 minutos a 4° C para sedimentar las células y los residuos insolubles y después se filtraron con un filtro de 0,2 μ . Los fluidos recogidos de baculovirus clarificado (35 ml) se centrifugaron a 100 000 g RCF durante 2 horas a 4° C para sedimentar las VLP de ORF2 de PCV2b. Los sedimentos resultantes se suspendieron en TBS y se separaron además en un gradiente de sacarosa discontinuo al 10% - 60% a 100.000 g RCF durante 2 horas a 4° C. Las fracciones que contenían la mayoría de ORF2 de PCV2b, determinadas mediante SDS-PAGE y Transferencia Western utilizando anticuerpos α -PCV2, se agruparon y se evaluaron por densitometría. Resumiendo, los factores que contenían ORF2 de PCV2b agrupados se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con tinción SIMPLYBLUE™ Safe. Las imágenes del gel se capturaron y se analizaron usando un programa informático y una cámara Alpha View. La masa de las bandas de ORF2 de PCV2b se calcularon usando una curva patrón de BSA incluida en cada gel. La concentración de ORF2 de PCV2b de la agrupación se calculó dividiendo la masa de la(s) banda(s) de ORF2 de PCV2b entre el volumen total de la muestra cargada en el gel. Las concentraciones de ORF2 de PCV2b en el material recogido se calcularon multiplicando la concentración de ORF2 de PCV2b en el grupo por el volumen del grupo y después dividiendo el resultado entre el volumen inicial de los fluidos recogidos usados para la centrifugación.

EJEMPLO 4

Con este estudio se evalúa la eficacia de la vacuna prototipo de ORF2b de Circovirus Porcino de tipo 2 (incluyendo

la proteína ORF2 de PCV2b expresada en baculovirus recombinante de la SEQ ID NO: 1) contra una provocación de PCV2b cuando se administra a las tres semanas de vida.

Cuarenta y dos cerdos CDCD sanos (X cerdos de cada una de X camadas y X cerdos de cada una de X camadas) se encerraron y se instalaron entre seis rediles. Los cerdos de cada redil se aleatorizaron equitativamente a 1 de 5 grupos de tratamiento: El Grupo 1 (Controles negativos estrictos) consistió en X cerdos y no recibió tratamiento, el Grupo 2 (controles con provocación, n=X) no recibió tratamiento, el Grupo 3 (PCV2b experimental que comprendía la SEQ ID NO: 1 + la vacuna de carbopol, n=X), Grupo 4 (PCV2b experimental que comprendía la SEQ ID NO: 1 + la vacuna ISA207VG, n=X). En la Tabla 2 se proporciona un resumen de los grupos de tratamiento.

Tabla 2:

Grupo	Nº de cerdos	Tratamiento	Día 0	Día 11 y Día 17	Día 14	Día 42
1	>5	Cont Neg Estricto	n/a	n/a	Necropsia	n/a
2	>20	Control de provocación	n/a	Tratamiento con KLH/ICFA	Provocación con PCV2a	Necropsia
3	>20	Proteína ORF2 de PCV2b + Carbopol	Vacunar	Tratamiento con KLH/ICFA	Provocación con PCV2a	Necropsia
4	>20	Proteína ORF2 de PCV2b + ISA207VG	Vacunar	Tratamiento con KLH/ICFA	Provocación con PCV2a	Necropsia
5	>20	proteína PCV2a/ORF2 de PCV2b + Carbopol	Vacunar	Tratamiento con KLH/ICFA	Provocación con PCV2a	Necropsia

El D0 los cerdos tenían 24 días de vida y a los cerdos del Grupo 3 se les administró una dosis de 1 ml de vacuna por vía intramuscular (IM). El D11 y el D17, todos los cerdos recibieron una dosis de 2,0 ml de KLH/ICFA, por vía intramuscular (IM). El D14 todos los cerdos reciben provocación con aproximadamente 5,0 log₁₀TCID₅₀/ml de PCV2b virulento vivo, 1,0 ml IM en la parte derecha del cuello y 1,0 ml por vía intranasal. Se examinó diariamente a los cerdos para determinar su salud general. Se extrajeron muestras de sangre los D-4, D14, D21, D28, D33 y D42, y los sueros se analizaron para determinar la viremia por PCV2 por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa todos los días con excepción del Día -4. Los animales vacunados mostraron viremia significativamente más baja y síntomas reducidos a ningún síntoma clínico en comparación con los animales no vacunados después de la provocación con PCV2b.

En el contexto de la invención realizada y de los datos proporcionados en ella en particular, se consideró lo siguiente:

- con respecto al empobrecimiento linfoide: para justificar la evidencia de "ayuda en la prevención del empobrecimiento linfoide", se consideró que un cerdo era positivo si una o más de las 4 muestras de tejidos linfoides (amígdalas, TBLN, MLN o ILN) era histológicamente positiva para el empobrecimiento linfoide;
- con respecto a la inflamación linfoide: para justificar la evidencia de "ayuda en la prevención de inflamación linfoide", se consideró que un cerdo era positivo si una o más de las 4 muestras de tejidos linfoides (amígdalas, TBLN, MLN o ILN) era histológicamente positiva para la inflamación linfoide;
- con respecto a la colonización linfoide: para justificar la evidencia de que los cerdos eliminaron la infección 4 semanas después de la exposición al virus, se consideró que un cerdo era positivo si una o más de las 4 muestras de tejidos linfoides (amígdalas, TBLN, MLN o ILN) era positiva para la colonización linfoide de PCV2 mediante ICH;
- con respecto a la viremia: para justificar la evidencia de "ayuda en la prevención de la viremia", se consideró que un cerdo era positivo el día de la toma de la muestra si el análisis por rt-PCR en suero era de $\geq 1,0 \times 10^4$ equivalentes genómicos de PCV2 (el nivel inferior lineal); y
- con respecto a la mortalidad: para justificar la evidencia de "ayuda en la prevención de la mortalidad", se consideró que un cerdo era positivo para mortalidad si sucumbía a la provocación (moría o requería eutanasia por motivos humanos con signos clínicos atribuibles, lesiones macroscópicas y/o lesiones histológicas coherentes con PCV2).

EN EL LISTADO DE SECUENCIAS:

- La SEQ ID NO: 1 corresponde a la SEQ ID NO: 2 que incluye la sustitución R63T
- 5 La SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia de una proteína ORF2 de PCV2b de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia de una proteína ORF2 de PCV2a de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 4 corresponde a una secuencia de polinucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 1.
- 10 La SEQ ID NO: 5 corresponde a la secuencia de una proteína ORF2 de PCV2b de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 6 corresponde a la secuencia de un polipéptido de la presente divulgación que tiene una longitud de 233 restos de aminoácidos y que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina.
- 15 La SEQ ID NO: 7 corresponde a la secuencia de un polipéptido de la presente divulgación que tiene una longitud de 233 restos de aminoácidos y que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina.
- La SEQ ID NO: 8 corresponde a la secuencia de un polipéptido de la presente divulgación que tiene una longitud de 234 restos de aminoácidos y que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina.
- 20 La SEQ ID NO: 9 corresponde a la secuencia de un polipéptido de la presente divulgación que tiene una longitud de 234 restos de aminoácidos y que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina.
- La SEQ ID NO:10 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de alanina.
- 25 La SEQ ID NO:11 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de cisteína.
- 30 La SEQ ID NO:12 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de aspartato.
- 35 La SEQ ID NO:13 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de glutamato.
- 40 La SEQ ID NO:14 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de fenilalanina.
- La SEQ ID NO:15 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de glicina.
- 45 La SEQ ID NO:16 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de histidina.
- 50 La SEQ ID NO:17 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de isoleucina.
- 55 La SEQ ID NO:18 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de leucina.
- 60 La SEQ ID NO:19 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de metionina.
- 65 La SEQ ID NO:20 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada "bucle BC" en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de arginina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de asparagina.

“bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de metionina.

La SEQ ID NO:38 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada “bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de asparagina.

La SEQ ID NO:39 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada “bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de prolina.

La SEQ ID NO:40 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada “bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de glutamina.

La SEQ ID NO:41 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada “bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de serina.

La SEQ ID NO:42 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada “bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de treonina.

La SEQ ID NO:43 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada “bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de valina.

La SEQ ID NO:44 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada “bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de triptofano.

La SEQ ID NO:45 corresponde a la secuencia de las posiciones de aminoácidos 58-66 (también denominada “bucle BC” en el presente documento) de un polipéptido de la presente divulgación que en la posición de aminoácido 59 tiene un resto de lisina y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de tirosina.

La SEQ ID NO: 46 corresponde a la secuencia de un polipéptido de la presente divulgación que tiene una longitud de 234 restos de aminoácido y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de treonina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA INC

<120> Variante de la proteína ORF2 del PCV2 y partículas similares a virus compuestas por esta

<130> P10-0163

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> corresponde a la SEQ ID NO: 2 con la sustitución R63T

<400> 1

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe 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 Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val 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 Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly 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 Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
 225 230

<210> 2
 <211> 234
 <212> PRT

ES 2 778 425 T3

<213> Circovirus porcino

<400> 2

```

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe 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 Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Arg Thr
 50          55          60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val 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 Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130          135          140

```

ES 2 778 425 T3

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

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

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly 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 Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225 230

<210> 3
<211> 233
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

<400> 3

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	Glu	Pro	225	230									

<210> 4

<211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> codifica la SEQ ID NO: 1

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (187)..(189)

 <400> 4

atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc	60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg	120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc	180
acagtcacaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt	240
ccccaggag ggggctcaaa cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag	300
gttaagggtg agttctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc	360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc	420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtac	480
tttaccocga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga	540
aatcaactct ggctgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact	600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa	660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga	705

15

20 <210> 5
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

 <400> 5

ES 2 778 425 T3

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 Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser 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 Thr 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 Ala Gly Asn
180 185 190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

<210> 6
<211> 233

	<212> PRT
	<213> Circovirus porcino
5	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
10	<220> <221> misc_feature <222> (53)..(53) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
15	<220> <221> misc_feature <222> (57)..(57) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
20	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (63)..(63) <223> Xaa en la posición 63 se selecciona del grupo que consiste en Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gin, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.
25	<220> <221> misc_feature <222> (68)..(68) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
30	<220> <221> misc_feature <222> (89)..(90) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
35	<220> <221> misc_feature <222> (121)..(121) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
40	<220> <221> misc_feature <222> (134)..(134) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
45	<220> <221> misc_feature <222> (169)..(169) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
50	<220> <221> misc_feature <222> (190)..(190) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
55	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (210)..(210) <223> Xaa en la posición 210 se selecciona del grupo que consiste en Asp y Glu.
60	<220> <221> misc_feature <222> (215)..(215) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
65	<400> 6

ES 2 778 425 T3

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

<210> 7
<211> 233

	<212> PRT
	<213> Circovirus porcino
5	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
10	<220> <221> misc_feature <222> (53)..(53) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
15	<220> <221> misc_feature <222> (57)..(57) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
20	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (63)..(63) <223> Xaa en la posición 63 se selecciona del grupo que consiste en Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gin, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.
25	<220> <221> misc_feature <222> (68)..(68) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
30	<220> <221> misc_feature <222> (89)..(90) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
35	<220> <221> misc_feature <222> (121)..(121) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
40	<220> <221> misc_feature <222> (134)..(134) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
45	<220> <221> misc_feature <222> (169)..(169) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
50	<220> <221> misc_feature <222> (190)..(190) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
55	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (210)..(210) <223> Xaa en la posición 210 se selecciona del grupo que consiste en Asp y Glu.
60	<220> <221> misc_feature <222> (215)..(215) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
65	<400> 7

ES 2 778 425 T3

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

	<211> 234
	<212> PRT
	<213> Circovirus porcino
5	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
10	<220> <221> misc_feature <222> (53)..(53) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
15	<220> <221> misc_feature <222> (57)..(57) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
20	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (63)..(63) <223> Xaa en la posición 63 se selecciona del grupo que consiste en Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gin, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.
25	<220> <221> misc_feature <222> (68)..(68) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
30	<220> <221> misc_feature <222> (89)..(90) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
35	<220> <221> misc_feature <222> (121)..(121) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
40	<220> <221> misc_feature <222> (134)..(134) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
45	<220> <221> misc_feature <222> (169)..(169) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
50	<220> <221> misc_feature <222> (190)..(190) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
55	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (210)..(210) <223> Xaa en la posición 210 se selecciona del grupo que consiste en Asp y Glu.
60	<220> <221> misc_feature <222> (215)..(215) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
65	<220>

<221> misc_feature
 <222> (234)..(234)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <400> 8

```

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa 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 Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Arg Thr Thr Val Xaa Thr
          50          55          60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val 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 Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
          115         120         125
    
```

ES 2 778 425 T3

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

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

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

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
180 185 190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Xaa
225 230

<210> 9
<211> 234
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(57)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)
<223> Xaa en la posición 63 se selecciona del grupo que consiste en Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gin, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(68)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (89)..(90)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (121)..(121)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (134)..(134)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (169)..(169)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (190)..(190)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (210)..(210)
 <223> Xaa en la posición 210 se selecciona del grupo que consiste en Asp y Glu.
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (215)..(215)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (234)..(234)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 35
 <400> 9

 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Xaa 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 Xaa Gly Tyr Thr Xaa Lys Lys Thr Thr Val Xaa Thr
 50 55 60

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

 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Xaa Xaa Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

ES 2 778 425 T3

```

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 Xaa Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
      115                      120                      125

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

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

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

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Xaa Gly Asn
      180                      185                      190

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

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

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Xaa
      225                      230

```

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 <400> 10

10


```

      Lys Arg Thr Thr Val Ala Thr Pro Ser
      1                      5
    
```

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 <400> 11

20


```

      Lys Arg Thr Thr Val Cys Thr Pro Ser
      1                      5
    
```

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

25

<400> 12

Lys Arg Thr Thr Val Asp Thr Pro Ser
1 5

5 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

10 <400> 13

Lys Arg Thr Thr Val Glu Thr Pro Ser
1 5

15 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

20 <400> 14

Lys Arg Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser
1 5

25 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

<400> 15

Lys Arg Thr Thr Val Gly Thr Pro Ser
1 5

30 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Circovirus porcino

<400> 16

Lys Arg Thr Thr Val His Thr Pro Ser
1 5

40 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
45 <213> Circovirus porcino

<400> 17

Lys Arg Thr Thr Val Ile Thr Pro Ser
1 5

50 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

ES 2 778 425 T3

<400> 18

Lys Arg Thr Thr Val Leu Thr Pro Ser
1 5

5 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

10 <400> 19

Lys Arg Thr Thr Val Met Thr Pro Ser
1 5

15 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

20 <400> 20

Lys Arg Thr Thr Val Asn Thr Pro Ser
1 5

25 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

<400> 21

Lys Arg Thr Thr Val Pro Thr Pro Ser
1 5

30 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Circovirus porcino

<400> 22

Lys Arg Thr Thr Val Gln Thr Pro Ser
1 5

40 <210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Circovirus porcino

45 <400> 23

Lys Arg Thr Thr Val Ser Thr Pro Ser

50 1 5

<210> 24
<211> 9

ES 2 778 425 T3

	<212> PRT								
	<213> Circovirus porcino								
5	<400> 24								
		Lys	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Pro Ser
		1				5			
	<210> 25								
	<211> 9								
10	<212> PRT								
	<213> Circovirus porcino								
	<400> 25								
		Lys	Arg	Thr	Thr	Val	Val	Thr	Pro Ser
15		1				5			
	<210> 26								
	<211> 9								
	<212> PRT								
20	<213> Circovirus porcino								
	<400> 26								
		Lys	Arg	Thr	Thr	Val	Trp	Thr	Pro Ser
25		1				5			
	<210> 27								
	<211> 9								
	<212> PRT								
30	<213> Circovirus porcino								
	<400> 27								
		Lys	Arg	Thr	Thr	Val	Tyr	Thr	Pro Ser
		1				5			
35	<210> 28								
	<211> 9								
	<212> PRT								
	<213> Circovirus porcino								
40	<400> 28								
		Lys	Lys	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Pro Ser
		1				5			
45	<210> 29								
	<211> 9								
	<212> PRT								
	<213> Circovirus porcino								
	<400> 29								
50		Lys	Lys	Thr	Thr	Val	Cys	Thr	Pro Ser
		1				5			
	<210> 30								
	<211> 9								

<212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 <400> 30
 5
 Lys Lys Thr Thr Val Asp Thr Pro Ser
 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 <400> 31
 Lys Lys Thr Thr Val Glu Thr Pro Ser
 1 5
 15
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Circovirus porcino
 <400> 32
 Lys Lys Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser
 1 5
 25
 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 30 <400> 33
 Lys Lys Thr Thr Val Gly Thr Pro Ser
 1 5
 35
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 40 <400> 34
 Lys Lys Thr Thr Val His Thr Pro Ser
 1 5
 45
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 <400> 35
 50
 Lys Lys Thr Thr Val Ile Thr Pro Ser
 1 5
 <210> 36
 <211> 9

ES 2 778 425 T3

<212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 <400> 36
 5
 Lys Lys Thr Thr Val Leu Thr Pro Ser
 1 5
 <210> 37
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 <400> 37
 Lys Lys Thr Thr Val Met Thr Pro Ser
 1 5
 15
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Circovirus porcino
 <400> 38
 Lys Lys Thr Thr Val Asn Thr Pro Ser
 1 5
 25
 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 30 <400> 39
 Lys Lys Thr Thr Val Pro Thr Pro Ser
 1 5
 35
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 40 <400> 40
 Lys Lys Thr Thr Val Gln Thr Pro Ser
 1 5
 45
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino
 <400> 41
 50
 Lys Lys Thr Thr Val Ser Thr Pro Ser
 1 5
 <210> 42

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

5 <400> 42

Lys Lys Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser
 1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

10

15 <400> 43

Lys Lys Thr Thr Val Val Thr Pro Ser
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

20

25 <400> 44

Lys Lys Thr Thr Val Trp Thr Pro Ser
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

30

35 <400> 45

Lys Lys Thr Thr Val Tyr Thr Pro Ser
 1 5

<210> 46
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (63).. (63)
 <223> Xaa en la posición 63 se selecciona del grupo que consiste en Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gin, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.

45

<400> 46

Met	Thr	Tyr	Pro	Arg	Arg	Arg	Phe	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	Ile	Gly	Tyr	Thr	Val	Lys	Lys	Thr	Thr	Val	Xaa	Thr	50	55	60	
Pro	Ser	Trp	Asn	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Leu	65	70	75	80
Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Val	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	Asn	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val	Asn	Tyr	130	135	140	
Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Thr	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser	Arg	Tyr	145	150	155	160
Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Arg	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	Pro	165	170	175	
Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Thr	Gly	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	Ile	Thr	Met	Tyr	Val	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	210	215	220	
Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Asn	Pro	Lys	225	230								

REIVINDICACIONES

1. Una proteína ORF2 de PCV2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 96 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 en toda la longitud de la SEQ ID NO:1,
y en donde la proteína ORF2 de PCV2 tiene
 - en la posición de aminoácido 59 un resto de arginina o un resto de lisina, y
 - en la posición de aminoácido 88 un resto de prolina, y
 - en la posición de aminoácido 151 un resto de treonina, y
 - en la posición de aminoácido 206 un resto de isoleucina, y
 - en la posición de aminoácido 232 un resto de asparagina,
 y en la posición de aminoácido 63 tiene un resto de aminoácido distinto de un resto de arginina o de un resto de lisina, en donde la numeración de las posiciones de aminoácidos se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre.
2. La proteína ORF2 de PCV2 según la reivindicación 1, en donde
 - la proteína ORF2 de PCV2 tiene en la posición de aminoácido 63 un resto de aminoácido de origen natural, preferentemente codificado genéticamente, y/o
 - la proteína ORF2 de PCV2 tiene en la posición de aminoácido 63 un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en un resto de aminoácido con una cadena lateral polar pero sin carga, un resto de aminoácido con una cadena lateral hidrófoba y un resto de glicina,
 - y en donde dicho resto de aminoácido con una cadena lateral polar pero sin carga, se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un resto de serina, un resto de treonina, un resto de tirosina, un resto de asparagina y un resto de glutamina, y/o en donde dicho resto de aminoácido con una cadena lateral hidrófoba se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un resto de alanina, un resto de valina, un resto de leucina, un resto de isoleucina, un resto de fenilalanina y un resto de triptófano,
 - y/o
 - la proteína ORF2 de PCV2 tiene en la posición de aminoácido 63 un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en un resto de serina y un resto de treonina.
3. La proteína ORF2 de PCV2 según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína ORF2 de PCV2, es una proteína ORF2 de PCV2 recombinante, preferentemente una proteína ORF2 de PCV2 recombinante expresada en un baculovirus, y/o en donde dicha proteína ORF2 de PCV2, es una proteína ORF2 de PCV2 de subtipo b (PCV2b), y/o en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre, es la proteína expuesta en la SEQ ID NO:2.
4. Una composición inmunogénica que contiene la proteína ORF2 de PCV2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Un plásmido, preferentemente un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Una célula que comprende un plásmido, preferentemente un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. Una partícula similar a virus compuesta por una pluralidad de la proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
10. Una célula, preferentemente una célula de insecto, que comprende un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
11. El uso de:
 - la proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
 - la composición inmunogénica según la reivindicación 4,

- el polinucleótido según la reivindicación 5,
- el baculovirus según la reivindicación 9,
- el plásmido según la reivindicación 6, y/o
- la célula según la reivindicación 7 o 10

- 5 para la preparación de un medicamento, preferentemente de una vacuna.
- 10 12. La proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición inmunogénica según la reivindicación 4 para su uso en un método de reducción, prevención o tratamiento de signos clínicos causados por una infección por PCV2, o de prevención o tratamiento de una enfermedad causada por una infección por PCV2.
- 15 13. La proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición inmunogénica según la reivindicación 4 para su uso según la reivindicación 12, en donde la infección por PCV2 es una infección por PCV2 de subtipo b (PCV2b).
- 20 14. La proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición inmunogénica según la reivindicación 4 para su uso según la reivindicación 12, en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 o dicha composición inmunogénica se administra una sola vez.
- 25 15. Un método de producción de la proteína ORF2 de PCV2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método comprende
- transfectar una célula con un plásmido, preferentemente un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica dicha proteína ORF2 de PCV2,
 - o
 - infectar una célula, preferentemente una célula de insecto, con un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica dicha proteína ORF2 de PCV2.

FIG. 1

Posición	2a	2b
59	A	R/K
63	T	R/K
88	K	P
151	P	T
191	R	G
206	K	I
232	E	N

FIG. 2

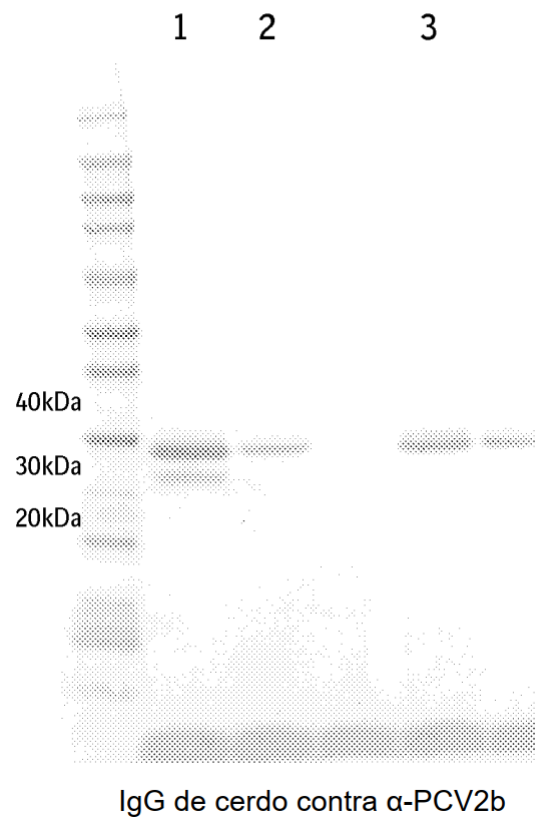


FIG. 3

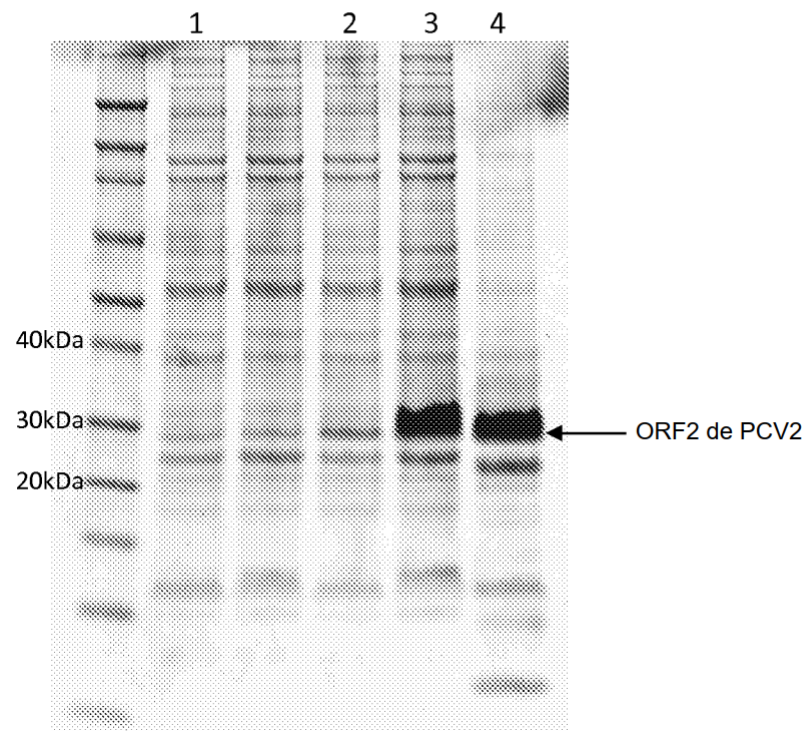
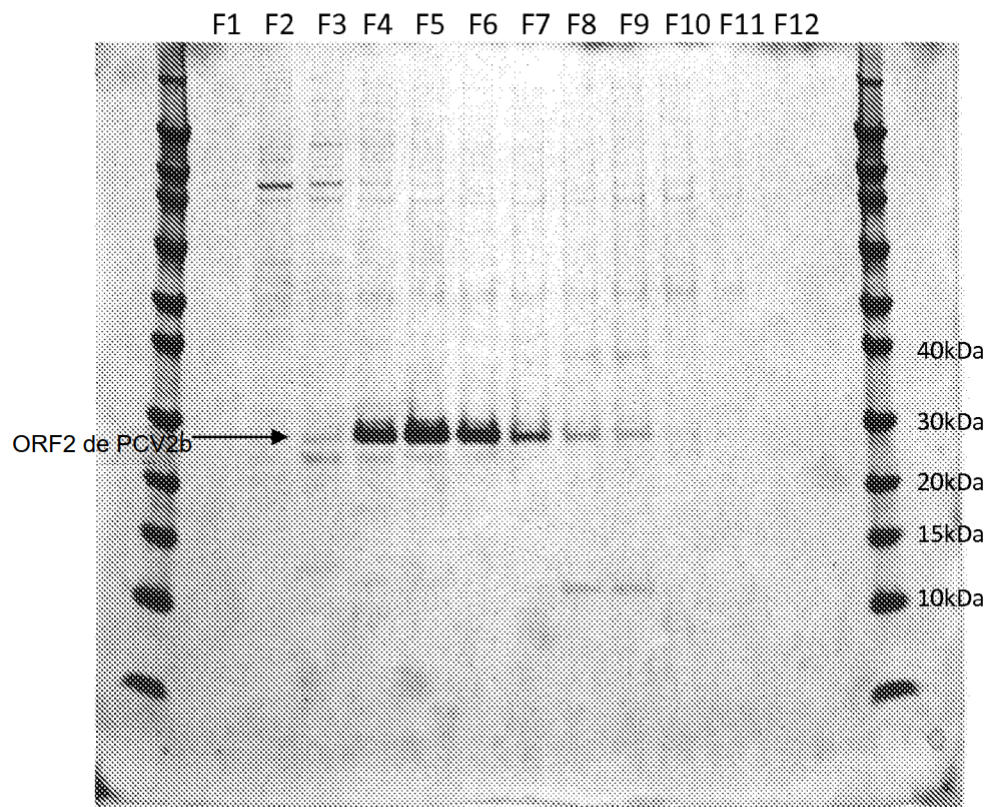
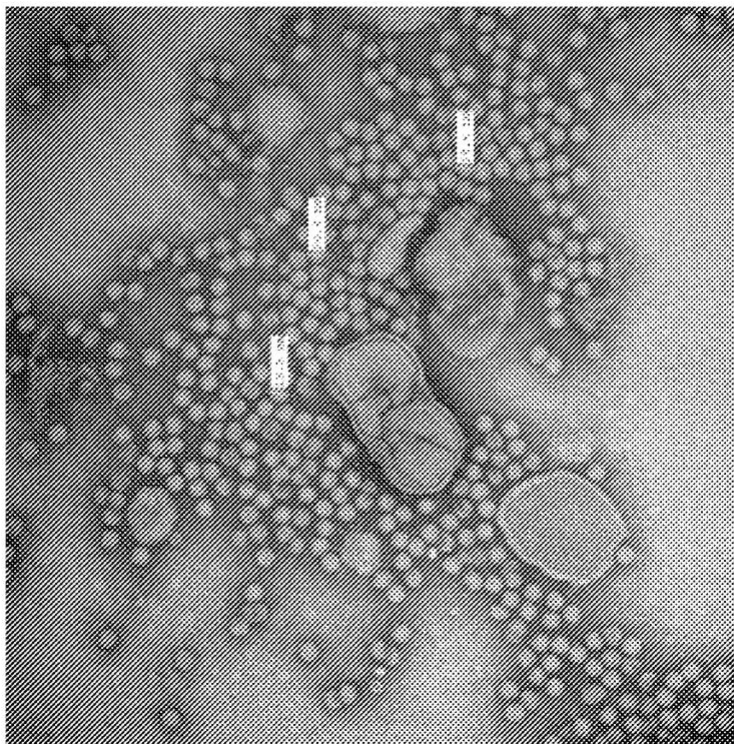


FIG. 4



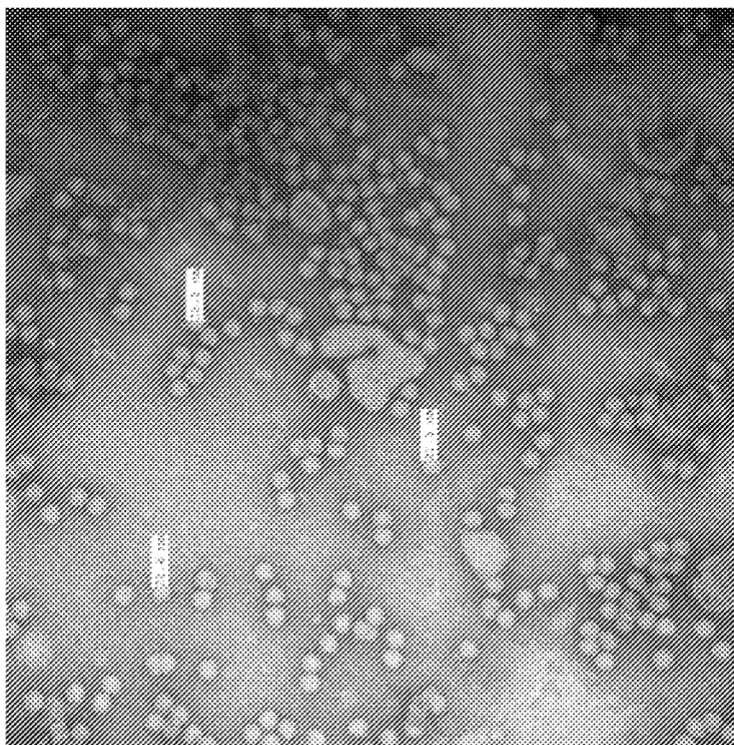
SDS-PAGE

FIG. 5A



VLP de ORF2 de PCV2a

FIG. 5B



VLP de ORF2 de PCV2b

FIG. 6

Construcción	Confirmación de VLP por ME	Rendimiento de VLP a escala de 1 l
ORF2a	Y	5,5 mg/l
ORF2b BDH		
ORF2b BDH SFCO	Y	0,4mg/l
ORF2b BDH K59A	Y	0,34mg/l
ORF BDH R63K		
ORF2b BDH R63T	Y	3,2mg/l
ORF2b BDH SFCO P88K T151P	**	**
ORF2b BDH G191R	N	N/A
ORF2b BDH N232E	Y	0,57mg/l
ORF2b BDH I206K	N	N/A

FIG. 7A

Construcciones	Concentración (µg/ml)
BaculoG/ORF2a	5,5
BaculoG/ORF2b BDH	0,39
BaculoG/ORF2b BDH R63L	3,57
BaculoG/ORF2b BDH R63G	4,14
BaculoG/ORF2b BDH R63Q	5,31
BaculoG/ORF2b BDH R63T	7,06
BaculoG/ORF2b BDH R63D	1,71

FIG. 7B

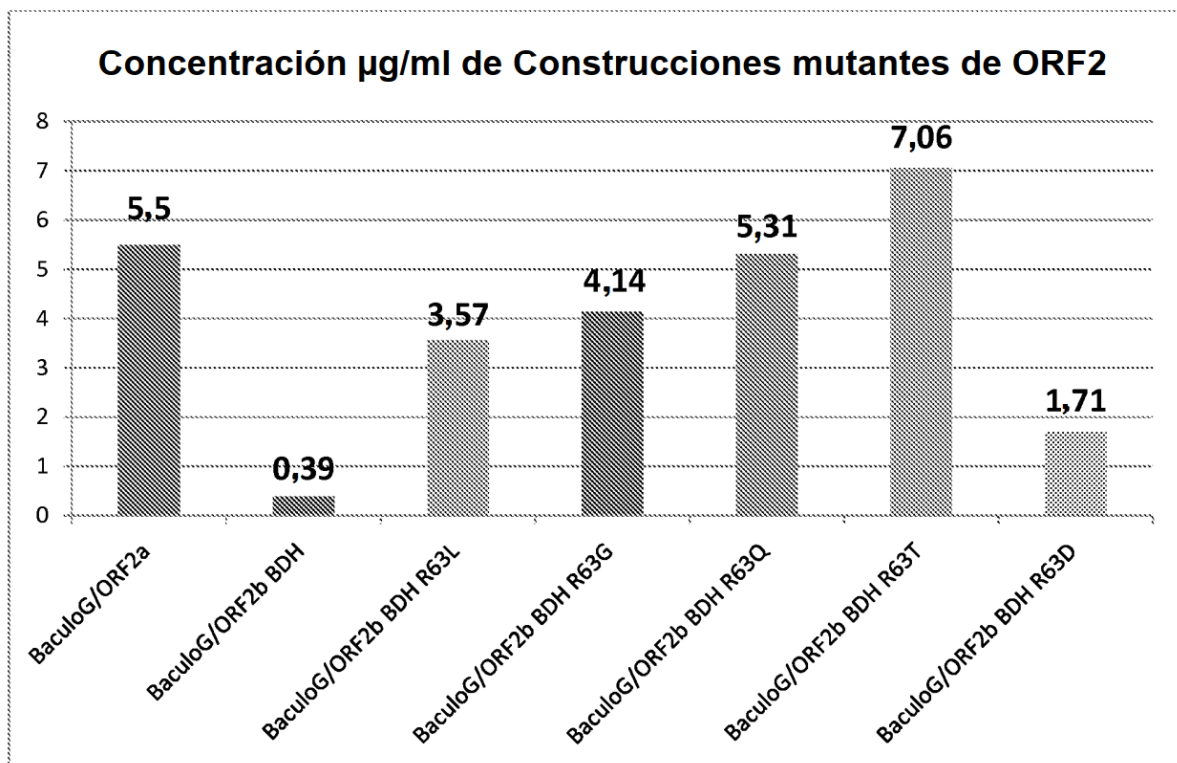


FIG. 8

	10	20	30	40	50	60	70	80
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+						