

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2008.09.02**

(30) Prioridade(s): **2007.09.04 EP 07115609**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.06.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.06.06**
155/2012

(73) Titular(es):

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
2621 NORTH BELT HIGHWAY ST. JOSEPH, MO
64502 US

(72) Inventor(es):

VICKY FACHINGER DE
KNUT ELBERS DE
MARION KIXMOELLER DE

(74) Mandatário:

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

(54) Epígrafe: **REDUÇÃO DE INFECÇÕES CONCOMITANTES EM PORCOS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE ANTIGÉNIO DE PCV2**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA A REDUÇÃO DA PERCENTAGEM DE INFECÇÕES CONCOMITANTES EM PORCOS OU UMA VARA DE PORCOS, CAUSADAS POR PATOGÉNIOS DIFERENTES DE PCV2, COMPREENDENDO A ETAPA DE ADMINISTRAR AO(S) REFERIDO(S) PORCO(S) UMA QUANTIDADE EFICAZ DE ANTIGÉNIO DE PCV2 OU UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÉNICA COMPREENDENDO ANTIGÉNIO DE PCV2. TAMBÉM SE REFERE A UM MÉTODO PARA O MELHORAMENTO DA RESISTÊNCIA DE PORCOS CONTRA INFECÇÕES CONCOMITANTES COM PATOGÉNIOS DIFERENTES DE PCV2, COMPREENDENDO A ETAPA DE ADMINISTRAR AO(S) REFERIDO(S) PORCO(S) UMA QUANTIDADE EFICAZ DE ANTIGÉNIO DE PCV2 OU UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÉNICA COMPREENDENDO ANTIGÉNIO DE PCV2.

RESUMO

"REDUÇÃO DE INFECÇÕES CONCOMITANTES EM PORCOS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE ANTIGÉNIO DE PCV2"

A presente invenção refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2. Também se refere a um método para o melhoramento da resistência de porcos contra infecções concomitantes com patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2.

DESCRIÇÃO

"REDUÇÃO DE INFECÇÕES CONCOMITANTES EM PORCOS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE ANTIGÊNIO DE PCV2"

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Este pedido contém uma listagem de sequências em formato de papel e em formato informático. A listagem de sequências das sequências é idêntica à incorporada no documento W006/072065.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção:

A presente invenção refere-se ao campo da medicina veterinária, em particular a doenças infecciosas. Além disso, a presente invenção refere-se a um método para a redução de infecções concomitantes em porcos, causadas por patogénios diferentes de PCV-2.

Antecedentes

Em 1996, uma nova doença emergente, designada "Síndrome de Deperdição Multissistémica Pós-desmame" (PMWS), foi descrita em referência a casos observados cinco anos antes no Canadá (Clark T. Patologia da Síndrome de Deperdição Multissistémica Pós-desmame de Porcos. 1996 p. 22-5). O circovírus porcino de

tipo 2 (PCV2) foi identificado como um agente causativo essencial desta síndrome de doença. Entretanto, a PMWS foi observada em virtualmente todas as regiões do mundo que produzem porcos (Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. *J Virol Methods*, 15 de Dezembro de 2004; 122(2):171-8). Os porcos de 5 a 15 semanas de idade são, geralmente, mais afectados (Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: Diagnóstico, Doença e Controlo: Que Sabemos? 16 de Julho de 2006-19 de Julho de 2006; 2006; Allan GM, et al., *Vet Microbiol*, 4 de Fevereiro de 2004; 98(2):165-8; Chae C. *Vet J*, Julho de 2004; 168(1):41-9). Os sinais clínicos incluem um marcado aumento na taxa de mortalidade, deperdição, hipertrofia generalizada de nódulos linfáticos, sinais respiratórios e, ocasionalmente, palidez, icterícia e diarreia (Chae C. *Vet J*, Maio de 2005; 169(3):326-36; Segales J. et al. *Vet Microbiol*, 4 de Fevereiro de 2004; 98(2):151-8). Estes sinais clínicos não se verificam todos ao mesmo tempo numa única vara de porcos afectada por PMWS, mas parece que a expressão de sinais clínicos está indirectamente ligada a co-patogénios específicos de herdade, que têm como alvo, de um modo preferido, diferentes sistemas de órgãos (Krakowka S. et al., *Vet Pathol*, Janeiro de 2001; 38(1):31-42). As investigações epidemiológicas mostraram que o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV), vírus da influenza suína (SIV), parvovírus porcino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Chae C. *Vet J*, Julho de 2004; 168(1):41-9) se verificam, mais geralmente, em combinação com a síndrome de doença.

Para a produção de PMWS, a activação do sistema imunitário foi postulada como sendo o evento central (Krakowka S. et al., *Vet Pathol*, Janeiro de 2001; 38(1):31-42). Embora a inoculação

experimental com PCV2 isoladamente apenas tenha produzido infecções clinicamente assintomáticas e uma evidência histológica muito modesta de inflamação, a infecção dual com PCV2 e PPV ou PRRSV resultou em sinais clínicos mais graves, lesões grosseiras e histológicas, uma carga viral de PCV2 mais alargada e mais elevada dentro de tecidos afectados. Estas verificações parecem ser predominantemente causadas por PCV2, visto que a infecção com PRRSV ou PPV isoladamente não resultou em sinais ou lesões clínicas comparáveis (Allan *et al.*, *J Comp Pathol*, Julho de 1999; 121(1):1-11; Allan GM, *et al.*, *Arch Virol*, 2000; 145(11):2421-9; Harms PA, *et al.*, *Vet Pathol*, Setembro de 2001; 38(5):528-39; Krakowka S, *et al.*, *Vet Pathol*, Maio de 2000; 37(3):254-63; Ostanello F, *et al.*, *Vet Microbiol*, 1 de Julho de 2005; 108(3-4):179-86; Rovira A, *et al.*, *J Virol*, Abril de 2002; 76(7):3232-9). Além disso, um aumento semelhante na gravidade da doença também podia ser alcançado na ausência de outros agentes co-infectantes, se os porcos fossem imunoestimulados com hemocianina de lapa californiana em adjuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA) (Krakowka S. *et al.*, *Vet Pathol*, Janeiro de 2001; 38(1):31-42).

Os efeitos de PCV2 no sistema imunitário do porco não são totalmente conhecidos. Foi referido que as principais células alvo para a replicação de PCV2 são a linhagem de monócitos/macrófagos, assim como outras células de apresentação de antigénios, tal como células dendríticas foliculares (Darwich L, *et al.*, *Arch Virol*, Maio de 2004; 149(5):857-74). Vários estudos sugeriram que o PCV2 infecta células em divisão, macrófagos e linfócitos B, induzindo a apoptose das células B, que conduz à lesão de tecidos linfóides, resultando em extensa depleção de linfócitos (Darwich L, *et al.*, *Arch Virol*, Maio de 2004; 149(5):857-74). Particularmente, porcos afectados com PMWS

mostraram infiltração histiocítica e depleção de linfócitos de centros foliculares e zonas parafoliculares, sintomas associados à presença de PCV2 (Segales J. *et al. Vet Microbiol*, 4 de Fevereiro de 2004; 98(2):151-8; Darwich L, *et al. Arch Virol*, Maio de 2004; 149(5):857-74). Estes factos levaram a que alguns sugerissem que a infecção por PCV2 poderia causar imunossupressão (Darwich L, *et al., Arch Virol*, Maio de 2004; 149(5):857-74; Krakowka S, *et al. Viral Immunol*, 2002; 15(4):567-82).

As abordagens para tratar infecções por PCV2, em particular, PMWS, baseadas numa vacina de ADN são descritas na Patente U.S. Nº 6703023. No documento WO 03/049703 é descrita a produção de uma vacina quimérica viva, compreendendo uma estrutura de PCV1, na qual um gene imunogénico de uma estirpe de PCV2 patogénica substitui um gene da estrutura de PCV1. O documento W099/18214 proporcionou várias estirpes de PCV2 e processos para a preparação de uma vacina de PCV2 morta. Uma vacina de subunidade baseada em ORF-2 eficaz foi referida no documento W006/072065. Quaisquer dessas vacinas destinam-se a ser utilizadas para a vacinação/tratamento de suínos contra PMWS.

O documento WO 2006/113372 A2 divulga a utilização médica de uma vacina de combinação compreendendo, pelo menos, um antigénio de *Helicobacter* e, pelo menos, um antigénio de circovírus porcino e um veículo ou excipiente veterinariamente aceitável para a dedução de uma resposta imunológica contra uma espécie de *Helicobacter* e circovírus porcino.

Não existe referência acerca do potencial impacto de infecções por PCV2 na incidência de infecções concomitantes,

causadas por diversos patógenos suínos relevantes. Particularmente, nada é referido acerca do potencial impacto de PCV2 em patógenos específicos, tais como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida*, PRRSV, *Salmonella spp.*, SIV ou *Streptococcus suis*. Além disso, mesmo que, durante um curto tempo, sejam conhecidas diferentes vacinas de PCV2, ainda não se conhece o seu impacto em infecções concomitantes diferentes de PCV2 em suínos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Perfil de viremia de PCV2. As amostras sanguíneas de animais pré-seleccionados tratados com placebo (Figura 1A; n=110) e animais vacinados (Figura 1B; n=110) foram recolhidas nos intervalos de tempo indicados. Com base nos resultados de PCR quantitativo, os animais foram agrupados em classes de animais com cargas virais subclínicas ($10^4 - 10^6$ gE/mL) e cargas virais relevantes clínicas ($> 10^6$ gE/mL). As barras a branco representam a proporção de animais com cargas virais subclínicas e as barras a negro ilustram a proporção de animais com cargas virais relevantes clínicas por dia de amostragem.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se na verificação, surpreendente, de que a vacina de PCV2 consegue, não apenas reduzir a percentagem de infecções por PCV2 em porcos, ou uma vara de porcos, mas também a percentagem de infecções

concomitantes causadas por patogénios diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2.

Por conseguinte, de acordo com um aspecto, a presente divulgação refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2.

O termo “infecções concomitantes”, como aqui utilizado, deverá significar, mas não está limitado a qualquer infecção de suíno causada por patogénios virais, bacterianos ou fúngicos diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2. O termo “patogénio concomitante”, como aqui utilizado, significa mas não está limitado a um patogénio de suíno diferente de circovírus, em particular, diferente de PCV2. Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação proporciona um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por um ou mais patogénios virais, bacterianos ou fúngicos diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2. De um modo preferido, as infecções concomitantes são causadas por um ou mais patogénios bacterianos, virais ou fúngicos, ou suas combinações. De um modo mais preferido, as infecções concomitantes são causadas por um ou mais patogénios bacterianos ou virais, ou uma sua combinação.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, o termo “infecções concomitantes” também significa que o porco infectado com um ou mais patógenos concomitantes diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2, é co-infectado com PCV2. Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação proporciona um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, co-infectados com PCV2, em que as infecções concomitantes são causadas por um ou mais patógenos diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antígeno de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antígeno de PCV2. De um modo preferido, as infecções concomitantes são causadas por um ou mais patógenos virais, bacterianos ou fúngicos diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2.

O termo “co-infectado com PCV2”, como aqui utilizado, significa, mas não está limitado a qualquer forma de co-infecção com PCV2, o que significa que a infecção por PCV2 ocorre antes, simultaneamente ou após a infecção com os patógenos que são diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2. Também inclui cursos subclínicos, clínicos aparentes, fulminantes e crónicos de infecções por PCV2. Neste contexto, os cursos aparentes não estão limitados a PMWS, mas também incluem quaisquer outras manifestações clínicas de infecções por PCV2, tais como complexo de doença respiratória porcina (PRDC), dermatopatia porcina e síndrome de nefropatia (PDNS), insuficiência reprodutiva, enterite granulomatosa, potencialmente, tremores congénitos (CT-AII) e miocardite perinatal (Chae, *Veterinary J.*, 2005; 169: 326-336).

Contudo, o termo “infecção concomitante” não significa, necessariamente, que o porco ou vara de porcos, esteja co-infectado com PCV2. O termo “infecção concomitante” também se refere, mas não está limitado a casos onde os porcos ou uma vara de porcos, está/estão exposto(s) a PCV2 ou onde existe um risco de ficar (ficarem) infectado(s) com PCV2. Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação proporciona um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2, em que as infecções concomitantes são causadas por um ou mais patogénios diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2. De um modo preferido, as infecções concomitantes são causadas por um ou mais patogénios virais, bacterianos ou fúngicos diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2.

O termo “a percentagem de infecções concomitantes é reduzida” deverá significar que o número de porcos infectados com um patogénio diferente de circovírus, para o referido patogénio, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado. Neste contexto, o termo “grupo de controlo não vacinado” deverá significar um grupo de porcos a que não é administrada uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição

imunogénica compreendendo antigénio de PCV2. Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação também proporciona um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por um patogénio diferente de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2, em que o número de porcos infectados com o referido patogénio diferente de circovírus, para o referido patogénio, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado. De um modo preferido, a infecção concomitante é causada por um patogénio viral, bacteriano ou fúngico diferente de circovírus, em particular, diferente de PCV2. De um modo mais preferido, os referidos porcos, ou vara de porcos, são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2.

As infecções concomitantes causadas por um patogénio viral, bacteriano ou fúngico diferente de circovírus, em particular, diferente de PCV2, podem causar sintomas entéricos, respiratórios, reprodutivos, do sistema nervoso central ou locomotores nos animais infectados. A incidência de quaisquer daqueles sintomas clínicos, causados pelos respectivos patogénios, pode ser reduzida. Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos, ou

uma vara de porcos, causadas por um ou mais patógenos entéricos, respiratórios, reprodutivos, do sistema nervoso central ou locomotores diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antígeno de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antígeno de PCV2. De um modo preferido, os referidos porcos são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2. De um modo mais preferido, o número de porcos infectados com um patógeno entérico, respiratório, reprodutivo, do sistema nervoso central ou locomotor diferente de circovírus, para o referido patógeno entérico, respiratório, reprodutivo, do sistema nervoso central ou locomotor, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido, para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado.

Os patógenos entéricos são, por exemplo, *Lawsonia intracellularis*, *E. coli*, *Streptococcus suis*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Brachyspira spp.*, rotavírus ou coronavírus. Os patógenos respiratórios são, por exemplo, PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*. Os patógenos reprodutivos são, por exemplo, *Leptospira spp.*, PRRSV, *Chlamydia spp.* Os patógenos locomotores são, por exemplo, *S. suis*, *M. hyorhinis*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*. Os patógenos do sistema nervoso central são, por exemplo, vírus da Pseudo-raiva, *S. suis.*, *Haemophilus sp.*

Em geral, o termo “patogénio diferente de PCV2”, significa, mas não está limitado a um ou mais dos patogénios seleccionados do grupo consistindo em: *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP); Vírus da febre suína Africana; *Aspergillus* spp.; Astrovírus; *Ascaris suum*; *Blastocystis* spp.; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*; *Brucella suis*, Biovares 1, 2 e 3 de *Brucella suis*; *Candida* spp.; Vírus da febre suína clássica; *Clostridium* spp., em particular *C. difficile*, tipos A, B e C de *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. tetani*; *Chlamydia* spp., *Cryptosporidium* spp.; Vírus da encefalomiocardite; *Eperythrozoonosis suis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Fusarium* spp.; *Haemophilus parasuis*; Vírus da encefalomielite de hemaglutinação; Vírus da hepatite E; Vírus da encefalite Japonesa; *Hyostrongylus rubidus*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., *L. australis*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagicae*, *L. interrogans*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. sejroe*, *L. bratislava*; *Mannheimia haemolytica*; Vírus de Menangle; *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp., *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; vírus Nipah; *Oesophagostom* spp., *Oesophagostom dentatum*, *Oesophagostom quadrosplinulatum*; *Pasteurella* spp., *P. multocida*; *Penicillium* spp.; Adenovírus porcino; Citomegalovírus porcino; Calicivírus entéricos porcinos; Picornavírus entéricos porcinos; Parvovírus porcino; Coronavírus respiratório porcino; Vírus da PRRS; Vírus da pseudo-raiva; Reovírus; Rotavírus; Rubulavírus; *Salmonella* spp., *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*; *Sarcoptes* spp.; *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp., *S. suis*, *S. porcinus*, *S. dysgalactiae*, Subespécie *equisimilis* de *S. dysgalactiae*; *Strongyloides ransomi*; Herpesvírus suíno; Vírus influenza suíno;

Vírus da varíola suína; Vírus da gastroenterite transmissível; *Trichuris spp.*, *Taenia spp.*, *Trichinella spiralis*; Vírus da estomatite vesicular; Vírus do exantema vesicular do suíno; Vírus do Nilo Ocidental; ou *Yersina spp.*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*.

Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por um ou mais patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2, em que os patogénios que causam as infecções concomitantes são seleccionados do grupo consistindo em: *Actinobacillus suis*; *Arcanobacterium pyogenes*; *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP); Vírus da febre suína Africana; *Aspergillus spp.*; Astrovírus; *Ascaris suum*; *Blastocystis spp.*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira spp.*, *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*; *Brucella suis*, Biovars 1, 2 e 3 de *Brucella suis*; *Candida spp.*; Vírus da febre suína clássica; *Clostridium spp.*, em particular, *C. difficile*, tipos A, B e C de *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. tetani*; *Chlamydia spp.*, *Cryptosporidium spp.*; Vírus da encefalomiocardite; *Eperythrozoonosis suis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Fusarium spp.*; *Haemophilus parasuis*; Vírus da encefalomielite de hemaglutinação; Vírus da hepatite E; Vírus da encefalite Japonesa; *Hyostrogylus rubidus*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira spp.*, *L. australis*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagicae*, *L. interrogans*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. sejroe*, *L. bratislava*; *Mannheimia haemolytica*; Vírus de Menangle;

Mycobacterium spp., *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma* spp., *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*; Vírus Nipah; *Oesophagostum* spp., *Oesophagostum dentatum*, *Oesophagostum quadrospinulatum*; *Pasteurella* spp., *P. multocida*; *Penicillium* spp.; Adenovírus porcino; Citomegalovírus porcino; Calicivírus entéricos porcinos; Picomavírus entéricos porcinos; Parvovírus porcino; Coronavírus respiratório porcino; Vírus da PRRS; Vírus da pseudo-raiva; Reovírus; Rotavírus; Rubulavírus; *Salmonella* spp., *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*; *Sarcoptes* spp.; *Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp., *S. suis*, *S. porcinus*, *S. dysgalactiae*, Subespécie *equisimilis* de *S. dysgalactiae*; *Strongyloides ransomi*; Herpesvírus suíno; Vírus influenza suíno; Vírus da varíola suína; Vírus da gastroenterite transmissível; *Trichuris* spp., *Taenia* spp., *Trichinella spiralis*; Vírus da estomatite vesicular; Vírus do exantema vesicular do suíno; Vírus do Nilo Ocidental; ou *Yersinia* spp., *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*.

De um modo preferido, as referidas infecções concomitantes são causadas por um ou mais dos patogénios seleccionados do grupo consistindo em: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Mycoplasma hyrhinis*; *Pasteurella multocida*; PRRS; *Salmonella* spp. e *Streptococcus suis*. De um modo muito preferido, as referidas infecções concomitantes são causadas por um ou mais dos patogénios seleccionados do grupo consistindo em: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Mycoplasma hyrhinis*; *Pasteurella multocida*; PRRS; *Salmonella* spp. e *Streptococcus suis*. De um modo mais preferido, as referidas infecções concomitantes são causadas por um ou mais dos patogénios seleccionados do grupo consistindo em:

Actinobacillus pleuropneumoniae; *Mycoplasma hyrhinis* e PRRS. De um modo muito preferido, por *Mycoplasma hyrhinis* e/ou PRRS.

De um modo preferido, os referidos porcos são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2, em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2. De um modo mais preferido, o número de porcos infectados com um ou mais dos referidos patógenos acima diferentes de circovírus, para os referidos patógenos, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido, para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado. No caso de infecções múltiplas, as taxas de redução, como descrito acima, referem-se a cada patógeno específico. Por exemplo, a redução de mais de 10% de infecções concomitantes num porco multiplamente infectado, significa que a taxa de infecção, com respeito a um patógeno específico, é reduzida para mais de 10%. Não significa, necessariamente, que a taxa de infecção, com respeito a todos os patógenos, seja reduzida para mais de 10%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado ou com respeito a uma vara de porcos que menos de 10% dos porcos da referida vara estejam infectados pela totalidade dos referidos patógenos.

Os termos “antígeno de PCV2”, como aqui utilizados, referem-se a uma sequência de aminoácidos que deduz uma resposta imunitária contra PCV2 num hospedeiro. Um antígeno, como aqui utilizado, inclui a sequência de comprimento completo de

quaisquer proteínas de PCV2, seus análogos ou seus fragmentos imunogénicos.

O termo “fragmento imunogénico” refere-se a um fragmento de uma proteína que inclui um ou mais epitopos e, deste modo, deduz a resposta imunitária num hospedeiro. Esses fragmentos podem ser identificados utilizando qualquer número de técnicas de mapeamento epitópico, bem conhecidas na técnica. Ver, e. g., Protocolos de Mapeamento Epitópico em *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nova Jérсия. Por exemplo, os epitopos lineares podem ser determinados através, e. g., da síntese concorrente de um grande número de péptidos em suportes sólidos, os péptidos correspondendo a porções da molécula proteica e da reacção dos péptidos com anticorpos, enquanto os péptidos estão ainda ligados aos suportes. Essas técnicas são conhecidas na técnica e descritas em, e. g., Patente U.S. N° 4708871; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. De modo semelhante, os epitopos conformacionais são facilmente identificados através da determinação da conformação espacial de aminoácidos, tais como por, e. g., cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear bidimensional. Ver, e. g., Protocolos de Mapeamento Epitópico, *supra*.

Os antigénios sintéticos também estão incluídos na definição, por exemplo, poliepitopos, epitopos flanqueantes e outros antigénios recombinantes ou sinteticamente derivados. Ver, e. g., Bergmann *et al.*, (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2.777-2781; Bergmann *et al.*, (1996), *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. and Cell Biol.*

75:402-408; Gardner *et al.*, (1998) 12^a Conferência Mundial de SIDA, Genebra, Suíça, 28 de Junho - 3 de Julho, 1998.

Uma “resposta imunitária” significa, mas não está limitada ao desenvolvimento, num hospedeiro, de uma resposta imunitária celular e/ou de anticorpo a um antigénio, uma composição imunogénica ou vacina de interesse. Habitualmente, uma “resposta imunitária” inclui, mas não está limitada a, um ou mais dos seguintes efeitos: produção ou activação de anticorpos, células B, células T auxiliares, células T supressoras e/ou células T citotóxicas, dirigidos especificamente a um antigénio ou antigénios incluídos na composição ou vacina de interesse. De um modo preferido, o hospedeiro exhibirá uma resposta imunológica terapêutica ou protectora (memória), de modo a que a resistência a nova infecção seja melhorada e/ou a gravidade clínica da doença reduzida. Essa protecção será demonstrada por uma redução no número ou gravidade ou ausência de um ou mais dos sintomas associados a infecções por PCV2, no atraso do começo da viremia, numa persistência viral reduzida, numa redução da carga viral global e/ou uma redução da excreção viral.

Os termos “composição imunogénica” ou “vacina” (ambos os termos são utilizados sinonimamente), como aqui utilizados, referem-se a qualquer composição farmacêutica contendo um antigénio de PCV2, cuja composição pode ser utilizada para prevenir ou tratar uma doença ou estado associado a infecção por PCV2 num indivíduo. Uma composição imunogénica preferida pode induzir, estimular ou melhorar a resposta imunitária contra PCV2. Deste modo, o termo abrange composições imunogénicas subunitárias, como descrito abaixo, assim como composições contendo PCV2 intacto morto ou atenuado e/ou inactivado.

Deste modo, de acordo com um aspecto, a presente divulgação refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por um ou mais patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antígeno de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antígeno de PCV2, em que a composição imunogénica compreendendo antígeno de PCV2 é uma composição imunogénica subunitária, uma composição contendo PCV2 intacto morto ou atenuado e/ou inactivado. De um modo preferido, os referidos porcos são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2. De um modo mais preferido, o número de porcos infectados com os referidos patogénios diferentes de circovírus, com respeito a um ou mais dos referidos patogénios, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido, para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado.

O termo "composição imunogénica subunitária", como aqui utilizado, refere-se a uma composição contendo, pelo menos, um polipéptido ou antígeno imunogénico, mas não todos os antígenos, derivados ou homólogos a um antígeno de PCV2. Essa composição é substancialmente isenta de PCV2 intacto. Deste modo, uma "composição imunogénica subunitária" é preparada a partir de, pelo menos, polipéptidos imunogénicos parcialmente purificados ou fraccionados (de um modo preferido, substancialmente purificados) de PCV2 ou seus análogos

recombinantes. Uma composição imunogénica subunitária pode compreender o antigénio ou antigénios subunitários de interesse substancialmente isentos de outros antigénios ou polipéptidos de PCV2 ou na forma fraccionada. Uma composição imunogénica subunitária preferida compreende a proteína ORF-2 de PCV2, como descrito abaixo. São muito preferidas as composições imunogénicas subunitárias que compreendem qualquer dos antigénios de PCV2 proporcionados no documento W006/072065, que são todos aqui incorporados por referência na sua totalidade.

De acordo com mais um aspecto, a composição imunogénica, como aqui utilizada, compreende, de um modo muito preferido, o polipéptido, ou um seu fragmento, expresso por ORF-2 de PCV2. ADN e proteína ORF-2 de PCV2, aqui utilizados para a preparação das composições e dentro dos processos aqui proporcionados, é um domínio altamente conservado dentro de isolados de PCV2 e, desse modo, qualquer ORF-2 de PCV2 seria eficaz como fonte do ADN e/ou polipéptido ORF-2 de PCV2 como aqui utilizado. Uma proteína ORF-2 de PCV2 preferida é a da SEQ ID N° 11 do documento W006/072065. Um polipéptido ORF-2 de PCV adicional preferido é proporcionado como SEQ ID N° 5 do documento W006/072065. Contudo, é compreendido pelos especialistas na técnica que esta sequência poderá variar tanto quanto 6-10% em homologia de sequência e ainda reter as características antigénicas que a tornam útil em composições imunogénicas. As características antigénicas de uma composição imunológica podem ser, por exemplo, estimadas pela experiência de provocação, como proporcionada pelo Exemplo 4 do documento W006/072065. Além disso, a característica antigénica de um antigénio modificado é ainda retida, quando o antigénio modificado confere, pelo menos, 70%, de um modo preferido, 80%, de um modo mais preferido, 90% da imunidade protectora, em comparação com a proteína ORF-2 de

PCV2, codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4, como proporcionada no documento WO06/072065.

Deste modo, de acordo com um aspecto, a presente divulgação refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por patógenos diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antígeno de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antígeno de PCV2, em que o antígeno de PCV2 é um antígeno da proteína ORF-2 de PCV2 que tem, pelo menos, 70%, de um modo preferido, 80%, de um modo ainda mais preferido, 90% da imunidade protectora, em comparação com a proteína ORF-2 de PCV2, codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4, como proporcionada no documento WO06/072065. De um modo preferido, a referida ORF-2 de PCV2 tem a sequência de SEQ ID N° 11 ou SEQ ID N° 5 do documento WO06/072065. De um modo preferido, os referidos porcos são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2. De um modo mais preferido, o número de porcos infectados com os referidos patógenos diferentes de circovírus, é reduzido para mais de 40%, de um modo preferido, para mais de 50%, de um modo mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado.

Em algumas formas, as porções imunogénicas da proteína ORF-2 de PCV2 são utilizadas como o componente antigénico na composição imunogénica compreendendo antígeno de PCV2. O termo "porção imunogénica", como aqui utilizado, refere-se a formas truncadas e/ou substituídas, ou fragmentos da proteína e/ou

polinucleótido ORF-2 de PCV2, respectivamente. De um modo preferido, essas formas truncadas e/ou substituídas, ou fragmentos, compreenderão, pelo menos, 6 aminoácidos contíguos do polipéptido ORF-2 de comprimento completo. De um modo mais preferido, as formas truncadas ou substituídas ou fragmentos, terão, pelo menos, 10, de um modo mais preferido, pelo menos, 15 e, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 19 aminoácidos contíguos do polipéptido ORF-2 de PCV de comprimento completo. A esse respeito, duas sequências preferidas são proporcionadas como SEQ ID N° 9 e SEQ ID N° 10 do documento W006/072065. É ainda compreendido que essas sequências podem ser uma parte de fragmentos maiores ou formas truncadas.

Como mencionado acima, um polipéptido ORF-2 de PCV2 preferido adicional é qualquer um codificado pelas sequências nucleotídicas de SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4. Contudo, é compreendido pelos especialistas na técnica que esta sequência poderá variar tanto quanto 6-20% em homologia de sequência e ainda reter as características antigénicas que a tornam útil em composições imunogénicas. Em algumas formas, uma forma truncada ou substituída, ou fragmento, deste polipéptido ORF-2 de PVC2, é utilizada como o componente antigénico na composição. De um modo preferido, essas formas truncadas ou substituídas, ou fragmentos, compreenderão, pelo menos, 18 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica ORF-2 de PCV2 de comprimento completo, e. g., da SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4. De um modo mais preferido, as formas truncadas ou substituídas, ou fragmentos, terão, pelo menos, 30, de um modo mais preferido, pelo menos, 45 e, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 57 nucleótidos contíguos da sequência nucleotídica ORF-2 de PCV2 de comprimento completo, e. g., SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4.

"Identidade de sequência", como é conhecido na técnica, refere-se a uma relação entre duas ou mais sequências polipeptídicas ou duas ou mais sequências polinucleotídicas, nomeadamente, uma sequência de referência e uma sequência dada a ser comparada com a sequência de referência. A identidade de sequência é determinada através da comparação da sequência dada à sequência de referência, após as sequências terem sido alinhadas de um modo óptimo, para produzir o grau mais elevado de semelhança de sequência, como determinado pela correspondência entre segmentos dessas sequências. Após esse alinhamento, a identidade de sequência é averiguada posição-a-posição, e. g., as sequências são "idênticas" numa particular posição se, nessa posição, os nucleótidos ou resíduos de aminoácidos forem idênticos. O número total dessas identidades de posição é, depois, dividido pelo número total de nucleótidos ou resíduos na sequência de referência, para dar a % de identidade de sequência. A identidade de sequência pode ser facilmente calculada por métodos conhecidos, incluindo, mas não limitados, aos descritos em *Biologia Molecular Computacional*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nova Iorque (1988), *Biocomputação: Informática e Projectos do Genoma*, Smith, D.W. ed., Academic Press, Nova Iorque (1993); *Análise Informática de Dados de Sequência, Parte I*, Griffin, A.M. e Griffin, H. G., ed., Humana Press, Nova Jérсия (1994); *Análise de Sequência em Biologia Molecular*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Iniciador de Análise de Sequência*, Gribskov, M. e Devereux, J., ed., M. Stockton Press, Nova Iorque (1991); e Carillo, H. e Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência. Os métodos preferidos para determinar a identidade de sequência são concebidos para proporcionarem a maior correspondência entre as sequências testadas. Os métodos para determinar a identidade de

sequência são codificados em programas de computador publicamente disponíveis, que determinam a identidade de sequência entre sequências dadas. Exemplos desses programas incluem, mas não estão limitados, ao pacote do programa GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). O programa BLASTX está publicamente disponível da NCBI e outras fontes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência). Estes programas alinham sequências de um modo óptimo, utilizando as ponderações de lacuna predefinidas, de modo a produzir o nível de identidade de sequência mais elevado entre as sequências dada e de referência. Como ilustração, por polinucleótido tendo uma sequência nucleotídica tendo, pelo menos, por exemplo, 85%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95%, de "identidade de sequência" com uma sequência nucleotídica de referência, significa-se que a sequência nucleotídica do dado polinucleótido é idêntica com a sequência de referência, excepto que a sequência polinucleotídica pode incluir até 15, de um modo preferido, até 10, de um modo ainda mais preferido, até 5 mutações pontuais por cada 100 nucleótidos da sequência nucleotídica de referência. Por outras palavras, num polinucleótido tendo uma sequência nucleotídica tendo, pelo menos, 85%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95% de identidade em relação à sequência nucleotídica de referência, até 15%, de um modo preferido, 10%, de um modo ainda mais preferido, 5% dos nucleótidos na sequência de referência podem ser delecionados ou substituídos com outro nucleótido ou um número de nucleótidos até 15%, de um modo preferido, 10%, de um modo ainda mais preferido, 5% dos

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

contíguos dentro da sequência de referência. De um modo preferido, as posições de resíduos que não são idênticas diferem por substituições conservativas de aminoácidos. Contudo, quando se determina a identidade de sequência, as substituições conservativas não estão incluídas como uma correspondência.

“Homologia de sequência”, como aqui utilizado, refere-se a um método de determinar o parentesco de duas sequências. Para determinar a homologia de sequência, duas ou mais sequências são alinhadas de um modo óptimo e, se necessário, são introduzidas lacunas. Contudo, em contraste com “identidade de sequência”, quando se determina a homologia de sequência, as substituições conservativas de aminoácidos são contadas como uma correspondência. Por outras palavras, para se obter um polipéptido ou polinucleótido tendo 95% de homologia de sequência com uma sequência de referência, 85%, de um modo preferido, 90%, de um modo ainda mais preferido, 95% dos resíduos de aminoácidos ou nucleótidos na sequência de referência devem corresponder ou compreender uma substituição conservativa com outro aminoácido ou nucleótido, ou um número de aminoácidos ou nucleótidos até 15%, de um modo preferido, até 10%, de um modo ainda mais preferido, até 5% dos resíduos totais de aminoácidos ou nucleótidos, não incluindo substituições conservativas, na sequência de referência podem ser inseridos dentro da sequência de referência. De um modo preferido, a sequência homóloga compreende, pelo menos, um segmento de 50, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 100, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 250 e, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, 500 nucleótidos.

Uma “substituição conservativa” refere-se à substituição de um resíduo de aminoácido ou nucleótido com outro resíduo de

aminoácido ou nucleótido tendo características semelhantes ou apropriadas, incluindo tamanho, hidrofobicidade, etc., de modo a que a funcionalidade global não se altere significativamente.

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

Deste modo, de acordo com um aspecto, a presente divulgação refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por um ou mais patógenos diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antígeno de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antígeno de PCV2, em que a referida proteína ORF-2 de PCV2 é qualquer uma dessas acima descritas: De um modo preferido, a referida proteína ORF-2 de PCV2 é

- i) um polipéptido compreendendo a sequência de SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 ou SEQ ID N° 11 do documento WO06/07065;
- ii) qualquer polipéptido que seja, pelo menos, 80% homólogo ao polipéptido de i),
- iii) qualquer porção imunogénica dos polipéptidos de i) e/ou ii)
- iv) a porção imunogénica de iii), compreendendo, pelo menos, 10 aminoácidos contíguos incluídos nas sequências de SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 ou SEQ ID N° 11 do documento WO06/072065,

- v) um polipéptido que é codificado por um ADN compreendendo a sequência de SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4 do documento WO06/072065.
- vi) qualquer polipéptido que é codificado por um polinucleótido que é, pelo menos, 80% homólogo ao polinucleótido de v),
- vii) qualquer porção imunogénica dos polipéptidos codificados pelos polinucleótidos de v) e/ou vi)
- viii) a porção imunogénica de vii), em que o polinucleótido codificando para a referida porção imunogénica compreende, pelo menos, 30 nucleótidos contíguos incluídos na sequência de SEQ ID N° 3, ou SEQ ID N° 4 do documento WO06/072065.

De um modo preferido, qualquer das porções imunogénicas tem as características imunogénicas da proteína ORF-2 de PCV2, que é codificada pela sequência de SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4 do documento WO06/07065.

De um modo preferido, os referidos porcos infectados são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2. De um modo mais preferido, o número de porcos infectados com os referidos patógenos diferentes de circovírus, com respeito a um ou mais do referido patógeno, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido, para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado.

De acordo com um aspecto adicional, a proteína ORF-2 de PCV2 é proporcionada na composição imunogénica a um nível de inclusão de antígeno eficaz para o tratamento de animais subcl clinicamente injectados com PCV2. De um modo preferido, o nível de inclusão de proteína ORF-2 de PCV2 é, pelo menos, 0,2 µg de antígeno/mL da composição imunogénica final (µg/mL), de um modo mais preferido, desde cerca de 0,2 a cerca de 400 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 0,3 a cerca de 200 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 0,35 a cerca de 100 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 0,4 a cerca de 50 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 0,45 a cerca de 30 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 0,6 a cerca de 15 µg /mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 0,75 a cerca de 8 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 1,0 a cerca de 6 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 1,3 a cerca de 3,0 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 1,4 a cerca de 2,5 µg/mL, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 1,5 a cerca de 2,0 µg/mL e, de um modo muito preferido, cerca de 1,6 µg/mL.

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

preferido, desde cerca de 0,75 a cerca de 8 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 1,0 a cerca de 6 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 1,3 a cerca de 3,0 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 1,4 a cerca de 2,5 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, desde cerca de 1,5 a cerca de 2,0 µg/dose e, de um modo muito preferido, cerca de 1,6 µg/dose.

O polipéptido ORF-2 de PCV2 utilizado na composição imunogénica, de acordo com a presente invenção, pode ser derivado de qualquer modo, incluindo isolamento e purificação de ORF2 de PCV2, síntese proteica corrente e metodologia recombinante. Os métodos preferidos para a obtenção de polipéptido ORF-2 de PCV2 são proporcionados no documento W006/072065, cujos ensinamentos e conteúdo são por este meio incorporados por referência na sua totalidade. Resumidamente, as células susceptíveis são infectadas com um vector viral recombinante contendo sequências codificantes de ADN de ORF-2 de PCV2, o polipéptido ORF-2 de PCV2 é expresso pelo vírus recombinante e o polipéptido ORF-2 de PCV2 expresso é recuperado do sobrenadante por filtração e inactivado por qualquer método convencional, de um modo preferido, utilizando etilenimina que é, depois, neutralizada para parar o processo de inactivação.

A composição imunogénica, como aqui utilizada, também se refere a uma composição que compreende i), qualquer da proteína ORF-2 de PCV2 descrita acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima e ii), pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína ORF-2 de PCV2, de um modo preferido, de um baculovírus recombinante. Além disso, a composição imunogénica pode compreender i) qualquer das proteínas ORF-2 de PCV2 descritas acima, de um modo preferido,

em concentrações descritas acima, ii), pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína ORF-2 de PCV2, de um modo preferido, de um baculovírus recombinante e iii) uma porção do sobrenadante de cultura celular.

Deste modo, de acordo com um aspecto, a presente divulgação refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por um ou mais patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2, em que o antigénio de PCV2 é ORF-2 de PCV2 recombinante, de um modo preferido um ORF-2 de PCV2 expresso em baculovírus. De um modo preferido, os ORF-2 de PCV2 recombinantes ou expressos em baculovírus tendo a sequência como descrita acima.

A composição imunogénica, como aqui utilizada, também se refere a uma composição que compreende i) qualquer das proteínas ORF-2 de PCV2 descritas acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, ii), pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína ORF-2 de PCV2, de um modo preferido, de um baculovírus recombinante e iii), uma porção da cultura celular; em que cerca de 90% dos componentes têm um tamanho inferior a 1 µm.

A composição imunogénica, como aqui utilizada, também se refere a uma composição que compreende i), qualquer das proteínas ORF-2 de PCV2 descritas acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, ii), pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína ORF-2 de PCV2, iii) uma porção da cultura celular, iv) e agente de inactivação para

inactivar o vector viral recombinante, de um modo preferido BEI, em que cerca de 90% dos componentes i) até iii) têm um tamanho inferior a 1 μ m. De um modo preferido, o BEI está presente em concentrações eficazes para inactivar o baculovírus, de um modo preferido, numa quantidade de 2 a cerca de 8 mM de BEI, de um modo preferido, de cerca de 5 mM de BEI.

A composição imunogénica, como aqui utilizada, também se refere a uma composição que compreende i), qualquer das proteínas ORF-2 de PCV2 descritas acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, ii), pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína ORF-2 de PCV2, iii) uma porção da cultura celular, iv) um agente de inactivação para inactivar o vector viral recombinante, de um modo preferido, BEI e v), um agente de neutralização para parar a inactivação mediada pelo agente de inactivação, em que cerca de 90% dos componentes i) até iii) têm um tamanho inferior a 1 μ m. De um modo preferido, se o agente de inactivação for BEI, a referida composição compreende tiossulfato de sódio em quantidades equivalentes a BEI.

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

retardantes da adsorção e semelhantes. Numa forma de realização preferida, a composição imunogénica compreende a proteína ORF-2 de PCV2, como aqui proporcionada, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, que é misturada com um adjuvante, de um modo preferido, Carbopol e solução salina fisiológica.

Os especialistas na técnica compreenderão que a composição aqui utilizada pode incorporar soluções estéreis conhecidas injectáveis, fisiologicamente aceitáveis. Para a preparação de uma solução pronta-a-utilizar para injeção parentérica ou infusão, estão facilmente disponíveis soluções aquosas isotónicas, tais como, e. g., solução salina ou soluções proteicas plasmáticas correspondentes. Além disso, as composições imunogénicas e vacinais da presente invenção podem incluir diluentes, agentes isotónicos, estabilizantes ou adjuvantes. Os diluentes podem incluir água, solução salina, dextrose, etanol, glicerol e semelhantes. Os agentes isotónicos podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose, entre outros. Os estabilizantes incluem albumina e sais alcalinos de ácido etilenodiaminotetracético, entre outros.

“Adjuvantes”, como aqui utilizado, pode incluir hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, saponinas, e. g., Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsão de água-em-óleo, emulsão de óleo-em-água, emulsão de água-em-óleo-em-água. A emulsão pode ser baseada, em particular, em óleo de parafina líquida leve (tipo Farmacopeia Europeia); óleo isoprenóide, tal como óleo de esqualano ou esqualeno resultante da oligomerização de alcenos, em particular, de isobuteno ou deceno; ésteres de ácidos ou de álcoois contendo um grupo alquilo linear, de um modo mais particular, óleos vegetais,

oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de propilenoglicol, gliceril-tri-(caprilato/caprato) ou dioleato de propilenoglicol; ésteres de ácidos gordos ramificados ou álcoois, em particular, ésteres de ácido isoesteárico. O óleo é utilizado em combinação com emulsionantes para formar a emulsão. Os emulsionantes são, de um modo preferido, surfactantes não iónicos, em particular, ésteres de sorbitano, de manida (e. g., oleato de anidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenoglicol e de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico ou hidroxisteárico que são, opcionalmente, etoxilados e copolímeros em bloco de polioxipropileno-polioxietileno, em particular os produtos Pluronic, especialmente L121. Ver Hunter *et al.*, *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, p. 51-94 (1995) e Todd *et al.*, *Vaccine* 15:564-570 (1997).

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

É um exemplo adicional de um adjuvante, um composto escolhido dos polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e dos copolímeros de anidrido maleico e derivado alquenilo. São compostos adjuvantes vantajosos, os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico que são reticulados, especialmente com éteres de polialquenilo de açúcares ou poliálcoois. Estes compostos são conhecidos pelo termo carbómero (Phameuropa Vol. 8, Nº 2, Junho de 1996). Os especialistas na técnica também podem reportar-se à Patente U. S. Nº 2909462, que descreve esses polímeros acrílicos reticulados com um composto poli-hidroxilado tendo, pelo menos, 3 grupos hidroxilo, de um modo preferido, não

mais de 8, os átomos de hidrogénio de, pelo menos, três hidroxilos sendo substituídos por radicais alifáticos insaturados tendo, pelo menos, 2 átomos de carbono. Os radicais preferidos são os que contêm desde 2 a 4 átomos de carbono, e. g., vinilos, alilos e outros grupos etilenicamente insaturados. Os radicais insaturados podem conter, eles mesmos, outros substituintes, tal como metilo. Os produtos comercializados com o nome Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EUA) são particularmente apropriados. São reticulados com uma sacarose alílica ou com pentaeritritol alílico. De entre eles, pode mencionar-se o Carbopol 974P, 934P e 971P. É muito preferida a utilização de Carbopol, em particular, a utilização de Carbopol 971P, de um modo preferido, em quantidades de cerca de 500 µg a cerca de 5 mg por dose, de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 750 µg a cerca de 2,5 mg por dose e, de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 1 mg por dose.

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

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

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

Além disso, a composição pode incluir um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis. Como aqui utilizado, “um veículo farmacêuticamente aceitável” inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos, agentes retardantes da adsorção e semelhantes. De um modo muito preferido, a composição aqui proporcionada, contém proteína ORF-2 de PCV2 recuperada do sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, em que as referidas células foram infectadas com um vector viral recombinante contendo ADN de ORF-2 de PCV2 e expressando proteína ORF-2 de PCV2 e em que a referida cultura celular foi tratada com cerca de 2 a cerca de 8 mM de BEI, de um modo preferido, com cerca de 5 mM de BEI, para inactivar o vector viral e uma concentração equivalente de um agente de neutralização, de um modo preferido, solução de tiosulfato de sódio para uma concentração final de cerca de 2 a cerca de 8 mM, de um modo preferido, de cerca de 5 mM.

De acordo com uma forma de realização adicional, a presente divulgação também se refere à utilização do antigénio de PCV2 para a preparação de uma composição imunogénica para a redução de infecções concomitantes causadas por um ou mais patogénios diferentes de PCV-2 em porcos ou uma vara de porcos, em que a referida composição imunogénica compreende i), qualquer das proteínas ORF-2 de PCV2 descritas acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, ii), pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína ORF-2 de PCV2,

iii) uma porção da cultura celular, iv) um agente de inactivação para inactivar o vector viral recombinante, de um modo preferido, BEI e v), um agente de neutralização para parar a inactivação mediada pelo agente de inactivação, de um modo preferido, tiosulfato de sódio, em quantidades equivalentes a BEI; e vi) um adjuvante adequado, de um modo preferido, Carbopol 971, em quantidades descritas acima; em que cerca de 90% dos componentes i) até iii) têm um tamanho inferior a 1 µm. De um modo preferido, os referidos porcos são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2. De um modo mais preferido, o número de porcos infectados com os referidos patogénios diferentes de circovírus, com respeito a um ou mais do referido patogénio, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido, para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado.

De acordo com um aspecto adicional, esta composição imunogénica compreende, ainda, um sal farmacêutico aceitável, de um modo preferido, um sal de fosfato, em concentrações fisiologicamente aceitáveis. De um modo preferido, o pH da referida composição imunogénica é ajustado para um pH fisiológico, que significa entre cerca de 6,5 e 7,5.

A composição imunogénica, como aqui utilizada, também se refere a uma composição que compreende, por um mL, i), pelo menos, 1,6 µg de proteína ORF-2 de PCV2 descrita acima,

ii), pelo menos, uma porção de baculovírus expressando a referida proteína ORF-2 de PCV2, iii) uma porção da cultura celular, iv) cerca de 2 a 8 mM de BEI, v) tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes a BEI; e vi) cerca de 1 mg de Carbopol 971 e vii) sal de fosfatos numa concentração fisiologicamente aceitável; em que cerca de 90% dos componentes i) até iii) têm um tamanho inferior a 1 μ m e o pH da referida composição imunogénica é ajustado para cerca de 6,5 a 7,5.

As composições imunogénicas podem incluir, ainda, um ou mais outros agentes imunomodulatórios, tais como, e. g., interleucinas, interferões ou outras citocinas. As composições imunogénicas também podem incluir Gentamicina e Mertiolo. Embora as quantidades e concentrações de adjuvantes e aditivos úteis no contexto da presente invenção possam ser facilmente determinadas pelo especialista na técnica, a presente divulgação contempla composições compreendendo desde cerca de 50 μ g a cerca de 2000 μ g de adjuvante e, de um modo preferido, cerca de 250 μ g/mL de dose da composição vacinal. Deste modo, a composição imunogénica, como aqui utilizada, também se refere a uma composição que compreende desde cerca de 1 μ g/mL a cerca de 60 μ g/mL de antibióticos e, de um modo mais preferido, inferior a cerca de 30 μ g/mL de antibióticos.

A composição imunogénica, como aqui utilizada, também se refere a uma composição que compreende i), qualquer das proteínas ORF-2 de PCV2 descritas acima, de um modo preferido, em concentrações descritas acima, ii), pelo menos, uma porção do vector viral expressando a referida proteína ORF-2 de PCV2, iii) uma porção da cultura celular, iv) um agente de inactivação para inactivar o vector viral recombinante, de um modo preferido, BEI e v), um agente de neutralização para parar a inactivação

mediada pelo agente de inactivação, de um modo preferido tiossulfato de sódio, em quantidades equivalentes a BEI; vi) um adjuvante adequado, de um modo preferido, Carbopol 971, em quantidades descritas acima; vii) uma concentração farmacêutica aceitável de um tampão salino, de um modo preferido de um sal de fosfatos e viii) um agente activo antimicrobiológico; em que cerca de 90% dos componentes i) até iii) têm um tamanho inferior a 1 µm.

A composição imunogénica, como aqui utilizada, também se refere a Ingelvac® CircoFLEX™, (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, MO, EUA), CircoVac® (Merial SAS, Lyon, França), CircoVent (Intervet Inc., Millsboro, DE, EUA) ou Suvaxyn PCV-2 One Dose® (Fort Dodge Animal Health, Kansas City, KA, EUA). Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação refere-se a um método para a redução da percentagem de infecções concomitantes em porcos ou uma vara de porcos, causadas por um ou mais patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio PCV2, em que a referida composição imunogénica compreendendo um antigénio de PCV2 é Ingelvac® CircoFLEX™, CircoVac® CircoVent e/ou Suvaxyn PCV-2 One Dose®, de um modo preferido é Ingelvac® CircoFLEX™. De um modo preferido, os referidos porcos infectados são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2. De um modo mais preferido, o número de porcos infectados com os referidos patogénios diferentes de circovírus, com respeito a um ou mais do referido patogénio, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido, para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais

preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado.

O termo “uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2”, como aqui utilizado, significa mas não está limitado a uma quantidade de antigénio de PCV2 que deduz ou é capaz de deduzir uma resposta imunitária num animal, ao qual é administrada a referida quantidade eficaz de antigénio de PCV2.

A quantidade que é eficaz depende dos ingredientes da vacina e do programa de administração. Tipicamente, quando um vírus inactivado ou uma preparação de vírus vivo modificado é utilizada na vacina de combinação, uma quantidade da vacina contendo cerca de $10^{2,0}$ a cerca de $10^{9,0}$ TCID₅₀ por dose, de um modo preferido, cerca de $10^{3,0}$ a cerca de $10^{8,0}$ TCID₅₀ por dose, de um modo mais preferido, cerca de $10^{4,0}$ a cerca de $10^{8,0}$ TCID₅₀ por dose. Em particular, quando é utilizado PCV2 vivo modificado nas vacinas, a dose recomendada para administrar ao animal susceptível é, de um modo preferido, cerca de $10^{3,0}$ TCID₅₀ (50% do ponto final da dose infecciosa de cultura de tecidos)/dose a cerca de $10^{6,0}$ TCID₅₀/dose e, de um modo mais preferido, cerca de $10^{4,0}$ TCID₅₀/dose a cerca de $10^{5,0}$ TCID₅₀/dose. Em geral, quando é utilizado antigénio purificado, a quantidade de antigénio será entre 0,2 e 5000 microgramas e entre $10^{2,0}$ e $10^{9,0}$ TCID₅₀, de um modo preferido, entre $10^{3,0}$ e $10^{6,0}$ TCID₅₀, de um modo mais preferido, entre $10^{4,0}$ e $10^{5,0}$ TCID₅₀.

As vacinas subunitárias são, normalmente, administradas com um nível de inclusão de antigénio de, pelo menos, 0,2 µg de antigénio por dose, de um modo preferido, com cerca de 0,2 a

cerca de 400 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, com cerca de 0,3 a cerca de 200 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, com cerca de 0,35 a cerca de 100 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, com cerca de 0,4 a cerca de 50 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, com cerca de 0,45 a cerca de 30 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, com cerca de 0,6 a cerca de 16 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, com cerca de 0,75 a cerca de 8 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, com cerca de 1,0 a cerca de 6 µg/dose, de um modo ainda mais preferido, com cerca de 1,3 a cerca de 3,0 µg/dose.

A administração de antigénio de PCV2 a porcos resulta, não apenas na redução da percentagem de infecções concomitantes causadas por patogénios diferentes de circovírus, em particular, diferentes de PCV2, mas também num melhoramento geral da saúde, particularmente na resistência contra essas infecções concomitantes. Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação também se refere a um método para o melhoramento da resistência de porcos contra uma ou mais infecções concomitantes com patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2. De um modo preferido, os referidos porcos são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2.

O termo “melhoramento da resistência de porcos contra infecções concomitantes”, como aqui utilizado, refere-se mas não está limitado a um processo em que o número de porcos infectados com um patogénio diferente de circovírus, com respeito ao referido patogénio, é reduzido para mais de 10%, de um modo

preferido, para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado. Deste modo, de acordo com outro aspecto, a presente divulgação também se refere a um método para o melhoramento da resistência de porcos contra infecções concomitantes com um ou mais patogénios diferentes de PCV2, compreendendo a etapa de administrar ao(s) referido(s) porco(s) uma quantidade eficaz de antigénio de PCV2 ou uma composição imunogénica compreendendo antigénio de PCV2, em que o número de porcos infectados com um ou mais dos referidos patogénios diferentes de circovírus, com respeito a um ou mais dos referidos patogénios, é reduzido para mais de 10%, de um modo preferido, para mais de 20%, de um modo mais preferido, para mais de 30%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 40%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 50%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 60%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 80%, de um modo ainda mais preferido, para mais de 100%, em comparação com um grupo de controlo não vacinado. De um modo preferido, os referidos porcos são co-infectados com PCV2, como definido acima, expostos a PCV2 ou em perigo ou susceptíveis de ficarem infectados com PCV2.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

Os seguintes exemplos expõem materiais e processos preferidos de acordo com a presente invenção. Contudo, deve ser compreendido que estes exemplos são proporcionados apenas a

título de ilustração e nada nestes deve ser considerado como uma limitação do âmbito global da invenção.

EXEMPLO 1

Detecção de infecções concomitantes em animais infectados por PCV-2

População de estudo

O estudo foi conduzido na parte do Sul da Alemanha. Os porcos híbridos de cruzamentos comerciais (Landrace ou Edelschwein (f) x Pietrain (m)) foram obtidos de 15 diferentes explorações de reprodução, sendo parte de uma “comunidade produtora de porcos”. As explorações de reprodução diferiam em tamanho (50 a 300 porcas), gestão e estatuto sanitário. As medidas preventivas de rotina dos porquinhos em todas as explorações de reprodução incluíram injeção de ferro, dentes e corte de cauda e castração. Após desmame na idade de, aproximadamente, 4 semanas, os porquinhos das diferentes explorações de reprodução foram transferidos para uma exploração de criação com um sistema de produção tudo dentro tudo fora. Foram alojados misturados em três currais com pocilgas concebidas para conterem 60 a 120 porcos por pocilga. As medidas preventivas de rotina no local de criação incluíram tratamento profilático com cloridrato de tetraciclina, durante os primeiros dez dias após chegada. Durante a criação, foram realizadas quatro alterações da composição alimentar. A alimentação proporcionada aos animais foi autopreparada à base de cevada e minerais. Na idade de, aproximadamente, 12 semanas, os porcos foram transferidos para uma exploração de engorda com

um sistema de produção tudo dentro tudo fora. Foram novamente misturados e alojados em dois estábulos com pocilgas, concebidas para conterem 10 a 30 porcos por pocilga. Durante a engorda, foram realizadas três alterações da composição alimentar. A alimentação proporcionada foi autopreparada à base de cevada, trigo, milho e concentrado de soro lácteo. Os porcos permaneceram na exploração de engorda durante 13 a 18 semanas.

Historial da doença

O padrão de doença da PMWS tinha ficado clinicamente evidente, aproximadamente, três anos antes do início do estudo, em Novembro de 2002 e foi serologicamente confirmado em Dezembro de 2002. No fim da criação/início da engorda, os animais começaram a mostrar sinais típicos de PMWS, tais como deperdição, sinais respiratórios e um marcado aumento na taxa de mortalidade. A doença foi complicada por co-infecções com PRRSV. A taxa de mortalidade durante a criação (4-12 semanas de idade) variava, habitualmente, entre 3,5 e 4,8%, mas também foram ocasionalmente referidos níveis de pico de até 10% de mortalidade. Durante a fase média a tardia da engorda, os sinais respiratórios e retardamento de crescimento foram predominantes em animais infectados por PCV2. A taxa de mortalidade durante a engorda (porcos de 12-26 semanas de idade) foi, aproximadamente, 1,7-2,4% e o número de reformas foi 1%. O ganho de peso médio diário foi apenas moderado (719-731 g/dia). Três meses antes do início do estudo, o diagnóstico de PMWS foi verificado com base em sinais clínicos e viremia de PCV2, que ocorreram ambos quando os animais tinham, aproximadamente, 9 a 13 semanas de idade. PRRSV e *Mycoplasma hyorhinis* foram identificados em amostras de

lavagem de pulmões de animais infectados por PCV2 como patógenos co-infectantes.

Artigos de teste

Para vacinação activa contra PCV2, foi administrada uma vacina subunitária inactivada (Ingelvac® CircoFLEX™, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH). A vacina continha a proteína da cápside de ORF2 de PCV2 como componente activo e carbómero como adjuvante. A sequência da ORF2 foi derivada de um isolado de PCV2 da América do Norte que foi isolado de amostras de amígdala e fígado de dois porcos com sinais de PMWS. A sequência da ORF2 foi subsequentemente inserida dentro de um sistema de expressão de baculovírus utilizando uma linha celular de insecto derivada de ovários da lagarta-do-milho *Sodoptera frugiperda* (células SF+) como hospedeiro. Um placebo contendo sobrenadante de cultura celular isenta de proteína da cápside de PCV2 e carbómero como adjuvante serviu como artigo de controlo.

Concepção experimental

O ensaio de campo foi realizado de acordo com os princípios de “Boas Práticas Clínicas” (GCP) e seguiu uma concepção de estudo paralelo aleatorizado, controlado negativamente, duplamente cego. Um total de 1519 porquinhos saudáveis foi igualmente distribuído entre dois grupos de tratamento, com respeito a atribuição de peso corporal inicial e ninhada. Uma semana antes do desmame, um grupo de porquinhos (n=754) foi vacinado com Ingelvac® CircoFLEX™ e o outro grupo (n=765) recebeu um placebo. Os artigos de teste foram administrados como uma

única dose de 1 mL intramuscularmente na região direita do pescoço, quando os porquinhos tinham $25,4 \pm 3,18$ dias (média $\pm$ D.P.) de idade. Após desmame, os porcos de ambos os grupos de tratamento foram mantidos em grupos mistos até ao termo da conclusão, de modo a maximizar a exposição uniforme a patogénios.

Reacções de polimerização em cadeia

Os ensaios de reacção de polimerização em cadeia foram utilizados como descrito, de modo a detectar ácidos nucleicos específicos para PRRSV (Mardassi H, et al., *J Clin Microbiol* 1994; 32(9):2197-203), *Mycoplasma hyorhinis* (Caron J., et al., *J Clin Microbiol* 2000; 38(4):1390-6), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Calsamiglia M, et al., *J Vet Diagn Invest*, Maio de 1999; 11(3):246-51), *Streptococcus suis* (Wisselink HJ, et al., *J Clin Microbiol*, Agosto de 2002; 40(8):2922-9), *Pasteurella multocida* (Townsend KM, et al., *J Clin Microbiol*, Abril de 1998; 36(4):1096-100), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Schaller A, et al., Toxinas Apx em espécies *Pasteurellaceae* de animais. *Vet Microbiol*, 12 de Junho de 2000; 74(4):365-76), *Bordetella bronchiseptica* (Hozbor D, et al., *Res Microbiol*, Junho de 1999; 150(5):333-41) e *Haemophilus parasuis* (Calsamiglia M, et al., *J Vet Diagn Invest*, Março de 1999; 11(2):140-5) em amostras de tecido de pulmão.

Para quantificação da carga viral de PCV2 no soro, equivalente(s) de genoma de PCV2 foi/foram quantificado(s) de acordo com o método descrito em Brunborg et al., 2004; *J. Virol Methods* 122: 171-178. Para amplificação de PCV2, foram/são utilizados os iniciadores PCV2-84-1265U21 e PCV2-84-1319L21.

O nível de exclusão para uma amostra positiva foi fixado como 10^4 cópias de molde por mL de soro, com base em experiências de validação. Todos os ensaios de quantificação de ADN de PCV2 foram realizados por bioScreen GmbH, Münster, Alemanha.

Resultados

Viremia de PCV2

Foi investigado se o começo e gravidade dos sinais e lesões clínicos característicos de PMWS observados estavam relacionados com o começo da viremia de PCV2 no sangue de “animais de amostra” pré-seleccionados. Como ilustrado na Figura 1, o começo da viremia de PCV2 iniciou-se no grupo tratado com placebo quando os animais tinham, aproximadamente, 9-10 semanas de idade. Os níveis de pico com até 85% de animais positivos para PCV2 foram alcançados quando os animais tinham, aproximadamente, 11 a 14 semanas de idade. Desde as 14 semanas de idade até ao termo da engorda, a proporção de animais virémicos para PCV2 estava a diminuir sem, contudo, alcançar novamente os níveis de linha de base. Na média, a duração individual da viremia durou 56 dias (dados não mostrados).

Comparativamente com o grupo tratado com placebo, a proporção de animais positivos para PCV2 no grupo vacinado foi significativamente reduzida ($p < 0,0001$), com não mais de 35% de animais positivos no pico da viremia (Figura 1B). A duração média da viremia em animais vacinados foi reduzida em 31 dias ($p < 0,0001$; dados não mostrados).

Outro foco foi colocado na examinação da carga viral nos animais. Neste estudo, as cargas virais de relevância clínica ($>10^6$ gE/mL de soro) foram, principalmente, observadas em animais tratados com placebo na fase precoce da viremia, quando os animais tinham, aproximadamente, 10-15 semanas de idade (Figura 1A). Na idade de 11 semanas, a proporção de animais com cargas virais clínicas relevantes (40%) foi superior à proporção de animais com cargas virais subclínicas relevantes (37%). Esta razão foi-se drasticamente alterando na fase tardia da viremia (17-25 semanas de idade), devido a uma redução significativa de infecções com relevância clínica. Em animais vacinados que eram positivos para PCV2, as infecções subclínicas eram predominantes em todos os intervalos de tempo analisados (Figura 1B).

Em suma, o perfil de PCV2 nos locais de estudo seleccionados durante o tempo do estudo foi caracterizado como se segue: a) um começo da viremia de PCV2 na semana de estudo 9-10 que coincidiu com o começo de sinais e lesões clínicos de PMWS, b) uma elevada carga viral em animais tratados com placebo na fase precoce da viremia de PCV2, c) uma redução significativa na duração da viremia e na percentagem de animais com cargas virais clínicas e subclínicas relevantes em animais vacinados, em comparação com animais tratados com placebo.

Presença de infecções concomitantes em animais tratados com placebo

Os resultados obtidos até agora, confirmam o diagnóstico de PMWS dentro da população de estudo analisada e indicam que a vacinação contra PCV2 pode proteger consideravelmente os animais da PMWS. Esta experiência de imunização controlada por placebo

permitiu, por conseguinte, a testagem da hipótese de que a PMWS causa uma imunossupressão subjacente nos animais. Foi especulado que, no caso de uma imunodeficiência associada a PCV2, a frequência de co-infecções após o começo da viremia de PCV2 seria mais elevada em animais tratados com placebo do que nos animais vacinados. Numa primeira etapa, a exposição dos animais de estudo a organismos oportunistas foi, por conseguinte, analisada em maior detalhe. Visto que a monitorização de sinais clínicos tinha mostrado que os animais eram predominantemente afectados por sinais respiratórios, decidiu-se seleccionar amostras de pulmão de animais mortos para um respectivo ensaio de patogénio por PCR. Na Tabela 3, os resultados são apresentados apenas para animais tratados com placebo, visto que são considerados como reflectindo mais de perto as condições de campo naturais.

Antes do começo da viremia de PCV2 (3-8 semanas de idade), o único patogénio que foi detectado em 2 de 5 amostras de pulmão de animais tratados com placebo foi o *Streptococcus suis*. No começo da viremia de PCV2 (9-10 semanas de idade), 1 em 8 amostras de pulmão de animais tratados com placebo verificou-se positiva para PCV2, enquanto 4 em 8 das amostras de pulmão analisadas testaram positivo para PRRSV. Outros patogénios detectados em baixo número, isoladamente ou em combinação com estes dois patogénios, foram *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Streptococcus suis*. A quantidade mais elevada de patogénios co-infectantes foi detectada em amostras de pulmão de animais tratados com placebo durante a fase aguda da viremia de PCV2 (11-16 semanas de idade). Entre as 17 amostras de pulmão testadas positivo para PCV2, 12 também se verificaram positivas para PRRSV e 13 para *Mycoplasma hyorhinis*. Além disso, foram esporadicamente

detectadas co-infecções com *Streptococcus suis* ou *Pasteurella multocida*. Finalmente, na fase tardia da viremia (17-26 semanas de idade), as co-infecções com *Mycoplasma hyopneumoniae* eram predominantes (6 em 7 amostras de pulmão positivas para PCV2) mas também se verificaram co-infecções com *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Streptococcus suis*. Durante todo o período de tempo após o começo da viremia (9-26 semanas de vida), apenas 2 em 22 das amostras de pulmão de animais tratados com placebo testaram positivo apenas para PCV2. Na maior parte das amostras de pulmão analisadas, positivas para PCV2, foram detectadas combinações de dois ou três organismos oportunistas. Durante a duração do estudo, a infecção por PCV2 foi, deste modo, verificada em associação com várias infecções respiratórias concomitantes. O começo e pico da viremia de PCV2 coincidiram com os começos e picos de co-infecções por PRRSV e *Mycoplasma hyorhinis*, ao passo que a fase tardia da viremia de PCV2 foi acompanhada pelo começo de uma infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Redução de co-infecções por vacinação contra PCV2

A comparação da frequência de patógenos respiratórios detectados em amostras de pulmão não revelou diferenças importantes entre ambos os grupos de tratamento quanto ao tempo antes do começo da viremia de PCV2 (dados não mostrados). Após o começo da viremia de PCV2 (10-26 semanas de idade), a proporção de amostras de pulmão de animais vacinados que testaram positivo para *Mycoplasma hyorhinis* e PRRSV foi reduzida em 71% ($p=0,0293$) e 46% ($p=0,2847$), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados do estudo de B05 BIVI 030

	Placebo		Vacina		Redução
	%	(N)	%	(N)	%
PCV2	92	(24/26)	55	(6/11)	40
PRRSV	50	(13/26)	27	(3/11)	46
<i>M. hyorhinis</i>	62	(16/26)	18	(2/11)	71
<i>M. hyopneumoniae</i>	23	(6/26)	45	(5/11)	–
<i>S. suis</i>	12	(3/26)	27	(3/11)	–
<i>P. multocida</i>	4	(1/26)	9	(1/11)	–
APP	8	(2/26)	0	(0/11)	100
<i>B. bronchiseptica</i>	0	(0/26)	0	(0/11)	0
<i>H. parasuis</i>	0	(0/26)	0	(0/11)	0

Além disso, as amostras de pulmão de animais tratados com placebo verificaram ser esporadicamente positivas para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Diferenças ligeiras no número de amostras de pulmão positivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis* ou *Pasteurella multocida* foram observadas num segundo estudo entre ambos os grupos de tratamento. Como indicado na Tabela 2, estes patógenos estavam presentes apenas a baixas frequências (*Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*) ou surgiram na fase mais tardia da infecção por PCV2 (*Mycoplasma hyopneumoniae*).

Noutro estudo (estudo B05 BIVI 013), uma resistência semelhante a patógenos concomitantes foi observada em animais vacinados, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados do estudo de B05 BIVI 013

	Placebo		Vacina		Redução
	%	(N)	%	(N)	%
<i>P. multocida</i>	14	15/109	0	0/32	100
<i>H. parasuis</i>	3	3/109	0	0/32	100
<i>Salmonella spp.</i>	5	5/109	0	0/32	100
APP	4	4/109	0	0/32	100
<i>S. suis</i>	50	15/30	n. d.	n. d.	n. d.

Sob a influência de vacinação contra PCV-2, a frequência das infecções por PCV2, assim como a frequência das co-infecções por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyrhinis*, *Pasteurella multocida*, PRRSV, *Salmonella spp.*, *Streptococcus suis* foi, deste modo, reduzida de um modo notável.

Noutro estudo, uma resistência semelhante a *Mycoplasma hyopneumoniae* também foi observada em animais vacinados.

LITERATURA

[1] Clark T. Patologia da Síndrome de Deperdição Multissistémica Pós-Desmame de Porcos. 1996 p. 22-5.

[2] Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantificação de circovírus porcino de tipo 2 isolado de amostras de soro/plasma e tecido, de porcos saudáveis e porcos com síndrome de deperdição multissistémica pós-desmame,

utilizando um PCR em tempo real baseado em TaqMan. *J Virol Methods* 15 de Dezembro de 2004; 122(2):171-8.

[3] Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: Diagnóstico, Doença e Controlo: Que Sabemos? 16 de Julho de 2006-19 de Julho de 2006; 2006.

[4] Allan GM, McNeilly F, Ellis J, et al. PMWS: Modelo experimental e co-infecções. *Vet Microbiol*, 4 de Fevereiro de 2004; 98(2):165-8.

[5] Chae C. Síndrome de Deperdição Multissistémica Pós-Desmame: uma revisão de etiologia, diagnóstico e patologia. *Vet J*, Julho de 2004; 168(1):41-9.

[6] Chae C. Uma revisão de síndromes e doenças associadas a circovírus porcino 2. *Vet J*, Maio de 2005; 169(3):326-36.

[7] Segales J, Domingo M, Chianini F, et al. A imunossupressão na síndrome de deperdição multissistémica pós-desmame afectou porcos. *Vet Microbiol*, 4 de Fevereiro de 2004; 98(2):151-8.

[8] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. A activação do sistema imunitário é o evento central na produção da doença de deperdição em porcos infectados com circovírus porcino 2 (PCV-2). *Vet Pathol*, Janeiro de 2001; 38(1):31-42.

[9] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, et al. Reprodução experimental de doença de deperdição grave por co-infecção

de porcos com circovírus porcino e parvovírus porcino. *J Comp Pathol*, Julho de 1999; 121(1):1-11.

[10] Allan GM, McNeilly F, Ellis J, et al. A infecção experimental de porquinhos privados de colostro com circovírus porcino 2 (PCV2) e vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV) potencia a replicação de PCV2. *Arch Virol*, 2000; 145(11):2421-9.

[11] Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, et al. Reprodução experimental de doença grave em porcos CD/CD infectados, de um modo concorrente, com circovírus porcino de tipo 2 e vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina. *Vet Pathol*, Setembro de 2001; 38(5):528-39.

[12] Krakowka S, Ellis JA, Mcehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. Síndrome de deperdição viral do suíno: reprodução experimental da síndrome de deperdição multissistêmica pós-desmame no suíno gnotobiótico por co-infecção com circovírus porcino 2 e parvovírus porcino. *Vet Pathol*, Maio de 2000; 37(3):254-63.

[13] Ostanello F, Caprioli A, Di FA, et al. Infecção experimental de porcos convencionais alimentados com colostro de 3 semanas de idade com circovírus porcino de tipo 2 e parvovírus porcino. *Vet Microbiol*, 1 de Julho de 2005; 108(3-4):179-86.

[14] Rovira A, Balasch M, Segales J, et al. Inoculação experimental de porcos convencionais com vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina e circovírus porcino 2. *J Virol*, Abril de 2002; 76(7):3232-9.

[15] Darwich L, Segales J, Mateu E. Patogénese da síndrome de deperdição multissistémica pós-desmame causada por Circovírus porcino 2: Um enigma imunitário. *Arch Virol*, Maio de 2004; 149(5):857-74.

[16] Krakowka S. Ellis JA, McNeilly F, et al. Características imunológicas da infecção por circovírus porcino de tipo 2. *Viral Immunol* 2002; 15(4):567-82.

[17] Batista L. Síndrome de Deperdição Multissistémica Pós-Desmame (PMWS) no Quebeque, trata-se de uma doença emergente? 4 de Março de 2006-7 de Março de 2006; 2006.

[18] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, et al. Protecção do suíno contra a síndrome de deperdição multissistémica pós-desmame (PMWS) por proteínas de circovírus porcino de tipo 2 (PCV2). *Vaccine*, 7 de Novembro de 2003; 21(31):4565-75.

[19] Caron J., Ouardani M., Dea S. Diagnóstico e diferenciação de infecções por *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma hyorhinis* em porcos por amplificação por PCR dos genes p36 e p46. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4):1390-6.

[20] Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. Aplicação de um ensaio de reacção de polimerização em cadeia com iniciador interno para detectar *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de esfregaços nasais. *J Vet Diagn Invest*, Maio de 1999; 11(3):246-51.

- [21] Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. Ensaaios de PCR multiplex para detecção simultânea de seis serotipos principais e dois fenótipos associados a virulência de *Streptococcus suis* em espécimes amigdalares de porcos. *J Clin Microbiol*, Agosto de 2002; 40(8):2922-9.
- [22] Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Desenvolvimento de ensaios de PCR para identificação específica de espécie e tipo de isolados de *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol*, Abril de 1998; 36(4):1096-100.
- [23] Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. Toxinas Apx em espécies *Pasteurellaceae* de animais. *Vet Microbiol*, 12 de Junho de 2000; 74(4):365-76.
- [24] Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detecção de *Bordetella bronchiseptica* pela reacção de polimerização em cadeia. *Res Microbiol*, Junho de 1999; 150(5):333-41.
- [25] Calsamiglia M, Pijoan C, Solano G, Rapp-Gabrielson V. Desenvolvimento de um ensaio de hibridação de placa de captura específica de oligonucleótido para detecção de *Haemophilus*.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA INC

<120> REDUÇÃO DE INFECÇÕES CONCOMITANTES EM PORCOS ATRAVÉS
DA UTILIZAÇÃO DE ANTIGÊNIO DE PCV2

<130> P10-0100

<160> 11

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta é uma sequência de Kozak modificada.

<400> 1

ccgccatg

8

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Esta é uma sequência de Eco R1 recombinante.

<400> 2

gaattc

6

<210> 3

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 3

cagctatgac	gtatccaagg	aggcgttacc	gcagaagaag	acaccgcccc	cgcagccatc	60
ttggccagat	cctccgccgc	cgccccctggc	tcgtccaccc	ccgccaccgc	taccggttga	120
gaaggaaaaa	tggcatcttc	aacacccgcc	tctcccgac	cttcggatat	actgtggaga	180
aggaaaaatg	gcattctcaa	caccgcgctc	tcccgacac	tcggatatac	tgtgacgact	240
ttgttcccc	gggagggggg	accaacaaaa	tctctatacc	ctttgaatac	tacagaataa	300
gaaagggttaa	ggttgaattc	tggccctgct	ccccatcac	ccagggtgat	aggggagtgg	360
gctccactgc	tgttattcta	gatgataact	ttgtaacaaa	ggccacagcc	ctaacctatg	420
acccatatgt	aaactactcc	tcccgcata	caatccccca	acccttctcc	taccactccc	480
gttacttcac	acccaaacct	gttcttgact	ccactattga	ttacttccaa	ccaaataaca	540
aaaggaatca	gctttggctg	aggctacaaa	cctctagaaa	tgtggaccac	gtaggcctcg	600
gcactgcgtt	cgaaaacagt	aaatacgacc	aggactacaa	tatccgtgta	accatgtatg	660
tacaattcag	agaatttaat	cttaaagacc	ccccacttaa	accctaaatg	aat	713

<210> 4

<211> 713

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 4

ccgccatgac	gtatccaagg	aggcgttacc	gcagaagaag	acaccgcccc	cgcagccatc	60
ttggccagat	cctccgccgc	cgccccctggc	tcgtccaccc	ccgccaccgc	taccggttga	120
gaaggaaaaa	tggcatcttc	aacacccgcc	tctcccgac	cttcggatat	actgtcaagg	180
ctaccacagt	cacaacgccc	tcctgggcgg	tggacatgat	gagatttaat	attgacgact	240
ttgttcccc	gggagggggg	accaacaaaa	tctctatacc	ctttgaatac	tacagaataa	300
gaaagggttaa	ggttgaattc	tggccctgct	ccccatcac	ccagggtgat	aggggagtgg	360
gctccactgc	tgttattcta	gatgataact	ttgtaacaaa	ggccacagcc	ctaacctatg	420
acccatatgt	aaactactcc	tcccgcata	caatccccca	acccttctcc	taccactccc	480
gttacttcac	acccaaacct	gttcttgact	ccactattga	ttacttccaa	ccaaataaca	540
aaaggaatca	gctttggctg	aggctacaaa	cctctagaaa	tgtggaccac	gtaggcctcg	600
gcactgcgtt	cgaaaacagt	aaatacgacc	aggactacaa	tatccgtgta	accatgtatg	660
tacaattcag	agaatttaat	cttaaagacc	ccccacttga	accctaagaa	ttc	713

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 5

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
65 70 75 80
Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140
Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
180 185 190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
195 200 205
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 6

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
65 70 75 80
Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140
Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
180 185 190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
195 200 205
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225 230

<210> 7

<211> 756

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

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

<400> 7

gcgccgcg	gaattcgatc	cgccatgacg	tatccaagga	ggcgttaccg	cagaagaaga	60
caccgcccc	gcagccatct	tggccagatc	ctccgcccgc	gcccctggct	cgtccacccc	120
cgccaccgct	accgttggag	aaggaaaaat	ggcatcttca	acaccgcct	ctcccgcacc	180
ttcgatata	ctgtcaaggc	taccacagtc	acaacgccct	cctgggcggt	ggacatgatg	240
agatttaata	ttgacgactt	tgttcccccg	ggagggggga	ccaacaaaat	ctctataccc	300
tttgaatact	acagaataag	aaagggttaag	gttgaattct	ggccctgctc	ccccatcacc	360
cagggtgata	ggggagtggg	ctccactgct	gttattctag	atgataactt	tgtaacaaag	420
gccacagccc	taacctatga	cccatatgta	aactactcct	cccgccatac	aatcccccaa	480
cccttctcct	accactcccc	ttacttcaca	cccaaacctg	ttcttgactc	cactattgat	540
tactttccaac	caaataacaa	aaggaatcag	ctttggctga	ggctacaaac	ctctagaaat	600
gtggaccacg	taggcctcgg	cactgcgttc	gaaaacagta	aatacgacca	ggactacaat	660
atccgtgtaa	ccatgtatgt	acaattcaga	gaatttaatc	ttaaagaccc	cccacttgaa	720
ccctaagaat	tctatcacta	gtgaattcgc	ggccgc			756

<210> 8

<211> 10387

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

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

<400> 8

aagctttact	cgtaaagcga	gttgaaggat	catattttagt	tgcgtttatg	agataagatt	60
gaaagcacgt	gtaaaatggt	tcccgcgcgt	tggcacaact	atttacaatg	cgccaagtt	120
ataaaagatt	ctaactctgat	atgtttttaa	acacctttgc	ggcccgagtt	gtttgcgtac	180
gtgactagcg	aagaagatgt	gtggaccgca	gaacagatag	taaaacaaaa	ccctagtatt	240
ggagcaataa	tcgatttaac	caacacgtct	aaatattatg	atggtgtgca	tttttgcgg	300
gcgggcctgt	tatacaaaaa	aattcaagta	cctggccaga	ctttgccgcc	tgaaagcata	360
gttcaagaat	ttattgacac	ggtaaaagaa	ttacagaaa	agtgtcccgg	catgttggtg	420
ggcgtgcact	gcacacacgg	tattaatcgc	accggttaca	tgggtgtgcag	atatttaatg	480
cacaccctgg	gtattgcccc	gcaggaagcc	atagatagat	tcgaaaaagc	cagaggtcac	540
aaaattgaaa	gacaaaatta	cgttcaagat	ttattaattt	aattaatatt	atttgcattc	600
tttaacaaat	actttatcct	attttcaaat	tgttgcgctt	cttcacgca	acaaaaacta	660
tgtttcgctt	gctccgttta	gcttgtagcc	gatcagtgcc	gttggttcaa	tcgacggtag	720
gattaggccg	gatatttctc	accacaatgt	tggcaacggt	gatgttacgt	ttatgctttt	780
ggttttccac	gtacgtcttt	tggccggtaa	tagccgtaaa	cgtagtgccg	tcgcgcgtca	840
cgcacaacac	cggatgtttg	cgcttgtccg	cggggtattg	aaccgcgcga	tccgacaaat	900

ccaccacttt	ggcaactaaa	tcggtgacct	gcgcgtcttt	tttctgcatt	atttcgtctt	960
tcttttgc	ggtttcttgg	aagccggtgt	acatgcggtt	tagatcagtc	atgacgcgcg	1020
tgacctgcaa	atcttttgcc	tcgatctgct	tgtccttgat	ggcaacgatg	cgttcaataa	1080
actcttggtt	tttaacaagt	tcctcggttt	tttgccgac	caccgcttgc	agcgcgtttg	1140
tgtgctcggt	gaatgtcgca	atcagcttag	tcaccaactg	tttgctctcc	tcctcccgtt	1200
gtttgatcgc	gggatcgtac	ttgccggtgc	agagcacttg	aggaattact	tcttctaaaa	1260
gccattcttg	taattctatg	gcgtaaggca	atgttgactt	cataatcagc	tgaatcacgc	1320
cggatttagt	aatgagcact	gtatgcggct	gcaaatacag	cgggtcgccc	cttttcacga	1380
cgctgttaga	ggtagggccc	ccattttgga	tggtctgctc	aaataacgat	ttgtatttat	1440
tgtctacatg	aacacgtata	gctttatcac	aaactgtata	ttttaaaactg	ttagcgacgt	1500
ccttgggcac	gaaccggacc	tgttggtcgc	gctctagcac	gtaccgcagg	ttgaacgtat	1560
cttctccaaa	tttaaattct	ccaattttaa	cgcgagccat	tttgatacac	gtgtgtcgat	1620
tttgcaacaa	ctattgtttt	ttaacgcaaa	ctaaacttat	tgtggtaagc	aataattaaa	1680
tatgggggaa	catgcgccgc	tacaacactc	gtcgttatga	acgcagacgg	cgccgggtctc	1740
ggcgcaagcg	gctaaaacgt	gttgccggtt	caacgcggca	aacatcgcaa	aagccaatag	1800
tacagttttg	atttgcata	taacggcgat	tttttaaatt	atcttattta	ataaatagtt	1860
atgtgaccaa	caactccccg	cccgcgttga	cagctgcac	ctcgaagcag	tcgttgacgc	1920
cttctccgtt	gtggccgaac	acgtcgagcg	gggtggtcgat	gaccagcggc	gtgccgcacg	1980
cgacgcacaa	gtatctgtac	accgaatgat	cgctgggcca	aggcacgctg	gcctccaagt	2040
ggcaatattg	gcaaattcga	aaatatatac	agttgggttg	tttgcgcata	tctatcgtgg	2100
cggtgggcata	gtacgtccga	acgttgattt	gcatcgcaag	cgaaattaaa	tcattgtgat	2160
tagttgcgatt	aaaacgttgt	acatcctcgc	ttttaatcat	gccgtcgatt	aaatcgcgca	2220
atcgagtcaa	gtgatcaaag	tgtggaataa	tgttttcttt	gtattcccga	gtcaagcgca	2280
gcgcgtat	taacaaacta	gccatcttgt	aagttagttt	catttaatgc	aactttatcc	2340
ataataatat	tatgtatcgc	acgtcaagaa	ttaacaatgc	gcccgttgct	gcactcaac	2400
acgactatga	tagagatcaa	ataaagcgcg	ataaaatag	cttgcgacgc	aacgtgcacg	2460
atctgtgcac	gcgttccggc	acgagctttg	attgtaataa	gtttttacga	agcgatgaca	2520
tgacccccgt	agtgcacaac	atcacgcccc	aaagaactgc	cgactacaaa	attaccgagt	2580
atgtcgggtga	cgttaaaaact	attaagccat	ccaatcgacc	gtagtcgaa	tcaggaccgc	2640
tggtgcgagc	agccgcgaag	tatggcgaa	tgatgtgata	acgtgtggag	tccgctcatt	2700
agagcgctcat	gtttagacaa	gaaagctaca	tatttaattg	atcccgatga	ttttattgat	2760
aaattgaccc	taactccata	cacggtattc	tacaatggcg	gggttttgg	caaaatttcc	2820
ggactgcgat	tgtacatgct	gttaacggct	ccgcccacta	ttaatgaa	taaaaaattcc	2880
aatttttaaaa	aacgcagcaa	gagaaaacatt	gagataaaag	aatgcgtaga	aggaaagaaa	2940
aatgtcgtcg	acatgctgaa	caacaagatt	aatatgcctc	cggtataaaa	aaaaatatg	3000
aacgatttga	aagaaaacaa	tgtaccgcgc	ggcggtatgt	acaggaagag	gtttatacta	3060
aactgttaca	ttgcaaacgt	ggtttcgtgt	gccaagtgtg	aaaaccgatg	tttaatcaag	3120
gctctgacac	atcttctaca	ccacgactcc	ccagtggtgg	gtgaagtcac	gcatctttta	3180
atcaaatccc	aagatgtgta	taaaccacca	aactgccaaa	aatgaaaac	tgctgacaag	3240
ctctgtccgt	ttgctggcaa	ctgcaagggt	ctcaatccta	tttgtaatta	ttgaataata	3300
aaacaattat	aaatgctaaa	tttggttttt	attaacgata	caaaccacaa	gcaacaagaa	3360
attatctagt	attatctata	attgaaaacg	atcgctgagg	atcgctgagg	taatatataa	3420
aatcattttt	aaatgattca	cagttaat	gcgacaatat	aatttttatt	tcacataaac	3480
tagacgcctt	gtcgtcttct	tcttcgtatt	ccttctcttt	ttcatttttc	tcctcataaa	3540
aattaacata	gttattatcg	tatccatata	tgtatctatc	gtatagagta	aattttttgt	3600
tgtcataaat	atatatgtct	tttttaattg	gggtgatagt	accgctgcgc	atagtttttc	3660
tgaattttac	aacagtgcta	ttttctcgga	gtgtgttgct	gtgtgttgct	tttaattatta	3720
aatattatata	atcaatgaat	ttgggacgt	gggttttgta	caatatgttg	ccggcatagt	3780
acgcagcttc	ttctagttca	attacaccat	tttttagcag	caccggatta	acataacttt	3840
ccaaaatgtt	gtacgaaccg	ttaaacaaaa	acagttcacc	tcccttttct	atactattgt	3900
ctgcgagcag	ttggttggtg	ttaaaaataa	cagccattgt	aatgagacgc	acaaaactaat	3960
atcacaaact	ggaaatgtct	atcaatata	agttgctgat	atcatggaga	taattaaaa	4020
gataaccatc	tcgcaataaa	ataagtattt	tactgttttc	gtaacagttt	tgtataaaaa	4080
aaacctataa	atattccgga	ttattcatac	cgtcccacca	tcgggcgcgg	atcagatctg	4140
cagcgccgcg	gggaattcga	tccgcatatg	cgtatccaa	gaggcggtac	cgcgaagaaa	4200
gacaccgccc	ccgcagccat	cttgcccgga	tccctccgcc	ccgcccctgg	ctcgtccacc	4260
cccgccaccg	ctaccgttgg	agaaggaaaa	atggcatctt	caacaccgcg	ctctcccgcg	4320
ccttcggata	tactgtcaag	gctaccacag	tcacaacgcc	ctcctggggc	gtggacatga	4380
tgagatttt	tattgacgac	tttgttcccc	ggggaggggg	gaccaacaaa	atctctatac	4440
cctttgaaat	ctacagaata	agaaaaggtta	aggttgaatt	ctggccctgc	tccccatca	4500
cccagggtga	taggggagtg	ggctccactg	ctgttattct	agatgataac	tttgtaacaa	4560
aggccacagc	cctaaccctat	gacccatattg	taaactactc	ctcccgccat	acaatcccc	4620
aacccttctc	ctaccactcc	cgttacttca	cacccaaacc	tggtcttgac	tccactattg	4680
attacttcca	accaaataac	aaaagggaatc	agctttggct	gaggctacaa	acctctagaa	4740
atgtggacca	cgtaggcctc	ggcactgcgt	tcgaaaacag	taaatacgac	caggactaca	4800
atatccgtgt	aaccatgtat	gtacaattca	gagaatttaa	tcttaaagac	ccccacttg	4860
aaccctaaga	attctatcac	tagtgaattc	gcggccgccc	gccgctccag	aattctagaa	4920

ggtacccggg	atcctttcct	gggacccggc	aagaaccaa	aactcactct	cttcaaggaa	4980
atccgtaatg	ttaaaccgga	cacgatgaag	cttgctggtg	gatggaaagg	aaaagagttc	5040
tacagggaaa	cttggacccg	cttcatggaa	gacagcttcc	ccattgttaa	cgaccaagaa	5100
gtgatggatg	ttttccttgt	tgtcaacatg	cgtcccacta	gacccaaccg	ttgttacaaa	5160
ttcctggccc	aacacgctct	gcgttgcgac	cccactatg	tacctcatga	cgtgattagg	5220
atcgtcagc	cttcatgggt	gggcagcaac	aacgagtacc	gcatcagcct	ggctaagaag	5280
ggcggcggct	gccaataat	gaaccttcac	tctgagtaca	ccaactcggt	cgaacagttc	5340
atcgatcgtg	tcatctggga	gaacttctac	aagcccacgt	tttacctcgg	taccgactct	5400
gctgaagagg	aggaaattct	ccttgaagtt	tccctgggtg	tcaaagtaaa	ggagtttgca	5460
ccagacgcac	ctctgttcac	tggctccggc	tattaaaaca	cgatacattg	ttattagtag	5520
atattattaag	cgctagattc	tgtgcgttgt	tgattttacag	acaattgttg	tacgtatttt	5580
aataattcat	taaatttata	atccttaggg	tggtatgtta	gagcgaaaaa	caaatgattt	5640
tcagcgtctt	tatatctgaa	tttaaatatt	taaatcctcaa	tagatttgta	aaataagttt	5700
cgattagttt	caaacaagg	ttgtttttcc	gaaccgatgg	ctggactatc	taatggattt	5760
tcgctcaacg	ccacaaaact	tgccaaatct	tgtagcagca	atctagcttt	gtcgatatct	5820
gtttgtgttt	tgttttgtaa	taaaggttcg	acgtcgttca	aaatattatg	cgcttttgta	5880
ttcttttcat	cactgtcgtt	agtgtaaca	taaatcgacg	taaacacgtt	aaataaagct	5940
tggacatatt	taacatcggg	cgtgttagct	ttattaggcc	gattatcgct	gtcgtcccaa	6000
ccctcgtcgt	tagaagttgc	ttccgaagac	gattttgcca	tagccacacg	acgcctatta	6060
attgtgtcgg	ctaacacgtc	cgcgatcaaa	ttttagattg	agctttttgg	aattatttct	6120
gattgcgggc	gtttttgggc	gggtttcaat	ctaactgtgc	ccgattttta	ttcagacaa	6180
acgttagaaa	gcgatggtgc	aggcgggtgt	aacatctcag	acggcaaatc	tactaatggc	6240
ggcgggtggt	gagctgatga	taaatctacc	atcgggtggag	gcgcaggcgg	ggctggcggc	6300
ggaggcggag	gcggaggtgg	tgccggtgat	gcagacggcg	gtttaggctc	aaatgtctct	6360
ttaggcaaca	cagtcggcac	ctcaactatt	gtactgggtt	cgggcggcgt	ttttggtttg	6420
accggtctga	gacgagtgcg	atttttttcg	tttctaatag	cttccaacaa	ttgtgtctgt	6480
tcgtctaaag	gtgcagcggg	ttgaggttcc	gtcggcattg	gtggagcggg	cggcaattca	6540
gacatcgatg	gtggtggtgg	tggtggaggc	gctggaatgt	taggcacggg	agaaggtggg	6600
ggcggcgggt	ccgcgggtat	aatttgttct	ggtttagttt	gttcgcgcac	gattgtgggc	6660
acgggctgag	gcgcggctgg	ctgcacaacg	ctgcacgtgc	tgcttcgagg	cagcgcttgg	6720
ggtggtggca	attcaatatt	ataattggaa	tacaaatcgt	aaaaatctgc	tataagcatt	6780
gtaatttcgc	tatcgtttac	cgtgccgata	tttaacaacc	gctcaatgta	agcaattgta	6840
ttgtaaagag	attgtctcaa	gctcgcgcga	cgccgataac	aagccttttc	atttttacta	6900
cagcattgta	gtggcgagac	acttcgctgt	cgctgcacgt	catgtatgct	ttgttacgaa	6960
aaacgtcgtt	ggcaagcttt	aaaatattta	aaagaacatc	tctgttcagc	accactgtgt	7020
tgctcgtaaat	gttgtttttg	ataatttgcg	cttcgcgagt	atcgacacgt	tcaaaaaatt	7080
gatgcgcatt	aattttgttg	ttcctattat	tgaataaata	agattgtaca	gattcatatc	7140
tacgattcgt	catggccacc	acaaatgcta	cgctgcacac	gctggtacaa	ttttacgaaa	7200
actgcaaaaa	cgtaaaaact	cggatataaaa	taatcaacgg	gcgctttggc	aaaatatcta	7260
ttttatcgca	caagcccact	agcaaatgtt	atttgcagaa	aacaatttcg	gcgcacaatt	7320
tttaacgctga	cgaaataaaa	gttcaccagt	taatgagcga	ccacccaaat	tttataaaaa	7380
tcatattttaa	tcacgggttc	atcaacaacc	acgtgtcgtg	gatggactac	gtatgctgtc	7440
ccgattttatt	tgaaacacta	caaattaaag	gcgagctttc	gtaccaactt	gttagcaata	7500
ttattagaca	gctgtgtgaa	gcgctcaacg	atttgcacaa	gcacaatttc	atacacaacg	7560
acataaaaact	cgaaaaatgtc	ttatattttcg	aagcacttga	tcgcgtgtat	gtttgcgatt	7620
acggattgtg	caaacacgaa	aactcactta	gcgtgcacga	cggcacgttg	gagtatttta	7680
gtccggaaaa	aattcgacac	acaactatgc	acgtttcgtt	tgactggtag	gcggcgtggt	7740
aacatacaag	ttgctaacgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	7800
gctcacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	ggggtgccta	7860
atgagtgaag	taactcacat	taattgcgtt	gcgctcactg	cccgttttcc	agtcgggaaa	7920
cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	7980
tgggcgctct	tccgcttcc	cgtcactga	ctcgtgcgc	tcggctggtc	ggctgcggcg	8040
agcggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	8100
aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	8160
gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	8220
tcagagggtg	cgaaacccga	caggactata	aagataaccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	8280
cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	8340
ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	8400
cgttcgtctc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggtt	cagcccagac	gctgcgcctt	8460
atccggtaac	tatcgtcttg	agtcacaacc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	8520
agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttccttgaa	8580

gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	8640
gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	8700
tagcgggtgt	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	8760
agatcctttg	atcttttcta	cgggtctga	cgctcagttg	aacgaaaact	cacgttaagg	8820
gatttttggtc	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	8880
aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	8940
aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	tcacccatag	ttgcctgact	9000
ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	9060
gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	9120
aagggccgag	gcgagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	9180
ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagtccgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	9240
tgctacaggc	atcgtgggtg	cacgctcgtc	gtttggtag	gcttcattca	gctccggttc	9300
ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgttgtgc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	9360
cggtccttcg	atcgttgta	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	9420
agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgcttttctg	tgactggtga	9480
gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	9540
gtcaatacgg	gataataccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgctca	tcattggaaa	9600
acgttcttcg	gggcgaaaac	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	9660
accactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	9720
agcaaaaaa	ggaaggcaaa	atgccgcaaa	aaagggaata	agggcgacac	ggaaatgttg	9780
aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcaggggt	attgtctcat	9840
gagcgataac	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaacia	atagggggtc	cgcgacatt	9900
tccccgaaaa	gtgccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	9960
aaataggcgt	atcacgaggc	cctttcgtct	cgcgcgtttc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	10020
ctgacacatg	cagctcccgg	agacggtcac	agcttgctctg	taagcggatg	ccgggagcag	10080
acaagcccgt	cagggcgcgt	cagcgggtgt	tggcgggtgt	cggggctggc	ttactatgc	10140
ggcatcagag	cagattgtac	tgagagtgc	ccatattgcg	tgtaaatatc	cgcacagatg	10200
cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggcgcca	ttcgccattc	aggctgcgca	actgttggga	10260
agggcgatcg	gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaaaggg	gatgtgctgc	10320
aaggcgatta	agttgggtaa	cgccagggtt	ttcccagttc	cgacgttgta	aaacgacggc	10380
cagtgcc				10387		

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 9

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

His	Leu	Gly	Gln
		20	

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> Circovirus porcino

<400> 10

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

<210> 11

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 11

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15
Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
65 70 75 80
Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95
Arg Ile Lys Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140
Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

Lisboa, 6 de Agosto de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogénica consistindo na proteína ORF-2 do Circovírus Porcino de Tipo 2 (PCV-2) e um ou mais veículos veterinariamente aceitáveis, para utilização na redução da infecção concomitante causada por PCV-2 e um ou mais patogénios virais, bacterianos e/ou fúngicos diferentes de PCV-2 em porcos.
2. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que os um ou mais veículos veterinariamente aceitáveis são seleccionados do grupo consistindo em solventes, meios de dispersão, revestimentos, adjuvantes, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, antibacterianos e agentes antifúngicos, agentes isotónicos e agentes de retardamento da adsorção.
3. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada por a infecção concomitante ser causada por um patogénio viral.
4. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por a infecção concomitante ser causada pelo vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Porcina (PRRS).
5. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada por a infecção concomitante ser causada por um patogénio bacteriano.

6. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por a infecção concomitante ser causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.
7. Proteína ORF-2 de PCV-2 como antígeno para a redução da infecção concomitante causada por PCV2 e um ou mais patógenos virais, bacterianos e/ou fúngicos diferentes de PCV-2 em porcos.
8. Proteína ORF-2 de PCV-2 como antígeno para a utilização de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por a infecção concomitante ser causada por um patógeno viral.
9. Proteína ORF-2 de PCV-2 como antígeno para a utilização de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por a infecção concomitante ser causada pelo vírus da PRRS.
10. Proteína ORF-2 de PCV-2 como antígeno para a utilização de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por a infecção concomitante ser causada por um patógeno bacteriano.
11. Proteína ORF-2 de PCV-2 como antígeno para a utilização de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por a infecção concomitante ser causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus suis*.

Lisboa, 6 de Agosto de 2012

Figura 1A:

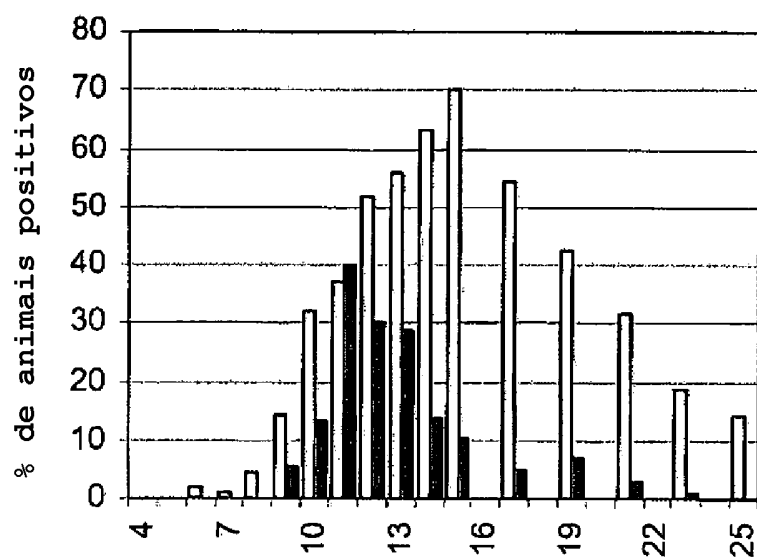


Figura 1B:

