



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

(21) **PI0620823-1 A2**

(22) Data de Depósito: 28/12/2006
(43) Data da Publicação: 22/11/2011
(RPI 2133)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/00
A61K 39/12

(54) Título: USO DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS CONTRA PCV2 PARA DIMINUIÇÃO DE SINTOMAS CLÍNICOS EM PORCOS

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2005 US 60/755,016, 17/10/2006 US 60/829,809, 17/10/2006 US 60/829,809, 29/12/2005 US 60/755,016

(73) Titular(es): Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

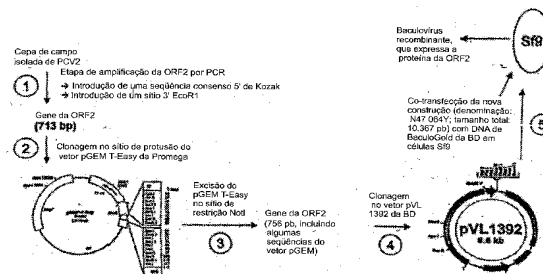
(72) Inventor(es): Greg Nitzel, Marc Eichmeyer, Merrill Schaeffer, Michael B. Roof, Phillip Wayne Hayes

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006062662 de 28/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/094893de 23/08/2007

(57) Resumo: USO DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS CONTRA PCV2 PARA DIMINUIÇÃO DE SINTOMAS CLÍNICOS EM PORCOS. A presente invenção refere-se ao uso de uma composição imunogênica, contendo um antígeno do circovírus suíno do tipo 2 (PCV2), para tratamento de várias manifestações clínicas (doenças). De preferência, as manifestações clínicas estão associadas à infecção por PCV2. De preferência, elas incluem linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes. Além disso, os sintomas clínicos incluem linfadenopatia, combinada a um ou a vários dos seguintes sintomas, em porcos: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios da reprodução, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc. Ademais, os sintomas clínicos incluem lesões semelhantes as de EPS (Enteropatia Proliferativa Suma), normalmente associadas a infecções por Lawsonia intracellularis.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS CONTRA PCV2 PARA DIMINUIÇÃO DE SINTOMAS CLÍNICOS EM PORCOS**".

Listagem de seqüências

5 Este pedido de patente contém uma listagem de seqüências no formato em papel ou no formato para leitura em computador, cujos ensinamentos e conteúdo são aqui incorporados por referência neste pedido.

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

10 A presente invenção refere-se ao uso de uma composição imunogênica, contendo um antígeno do circovírus suíno tipo 2 (PCV2), para tratamento de várias manifestações clínicas (doenças). De preferência, as manifestações clínicas estão associadas à infecção por PCV2. Mais especialmente, a presente invenção relaciona-se com uma composição imunológica
15 com efeito para induzir uma resposta imunológica que reduz ou diminui a gravidade dos sintomas clínicos associados à infecção por PCV2. De preferência, a composição imunológica compreende um antígeno do PCV2, produzido por recombinação. Ainda mais preferivelmente, o antígeno do PCV2 é uma proteína produzida por recombinação, codificada por uma das se-
20 qüências de fase de leitura aberta (ORFs) no genoma do PCV2. Ainda mais preferivelmente, o antígeno é uma proteína da ORF2 do PCV2. Mais especialmente, a presente invenção relaciona-se com uma composição imunológica efetiva para tratamento de sintomas clínicos associados a infecções por PCV2 em suínos que receberam a composição imunológica, e em que a
25 composição compreende a proteína expressa pela ORF2 do PCV2. Outra característica da presente invenção é o uso de qualquer uma das composições providas neste pedido de patente, sob a forma de medicamento, de preferência, um medicamento veterinário e, ainda mais preferivelmente, sob a forma de vacina. Ademais, a presente invenção refere-se também ao uso
30 de qualquer uma das composições aqui expostas, para o preparo de um medicamento que reduza ou diminua a gravidade de sintomas clínicos, associados com infecção por PCV2. De preferência, o medicamento objetiva a

prevenção de uma infecção por PCV2 e, ainda mais preferivelmente, em suínos. Uma outra característica da presente invenção refere-se a um processo para a produção de um medicamento, compreendendo uma composição imunogênica contra PCV2 para o tratamento de várias manifestações clínicas.

Descrição da Técnica Anterior

O circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é um vírus pequeno (17 -22 nm de diâmetro), icosaédrico não envelopado cujo genoma é composto por DNA de fita única circular. O PCV2 compartilha aproximadamente 80% de identidade de seqüência com o circovírus suíno tipo 1 (PCV1). No entanto, ao contrário do PCV1, que é, de maneira geral, não virulento, suínos infectados pelo PCV2 exibem uma síndrome comumente denominada como Síndrome Multissistêmica do Definhamento Pós-Desmame (PMWS). A PMWS é caracterizada clinicamente por emagrecimento progressivo, palidez cutânea, desgaste, dificuldade respiratória, diarreia, icterícia e coloração amarela. Alguns suínos afetados poderão apresentar uma combinação de todos os sintomas, enquanto que outros afetados terão somente um ou dois destes sintomas. Na necropsia, lesões microscópicas e macroscópicas estão também presentes em múltiplos tecidos e órgãos, sendo os órgãos linfóides o local mais comum das lesões. Foi observada uma forte correlação entre a quantidade de ácido nucléico ou antígeno do PCV2 e a gravidade das lesões linfóides microscópicas. As taxas de mortalidade de suínos infectados por PCV2 podem aproximar-se de 80%. Além da PMWS, o PCV2 foi associado com várias outras infecções incluindo pseudo-raiva, síndrome reprodutiva e respiratória de suínos (PRRS), doença de Glasser, meningite estreptocócica, salmonelose, colibacilose pós-desmame, hepatose dietética e broncopneumonia supurativa. No entanto, não foi ainda confirmado por pesquisa se quaisquer destes sintomas clínicos são, de fato, o resultado direto de uma infecção por PCV2. Além disso, não se sabe ainda se qualquer um destes sintomas clínicos pode ser efetivamente reduzido ou curado por um agente ativo direcionado contra o PCV2.

Abordagens atuais para tratamento de infecções por PCV2 in-

cluem vacinas à base de DNA, como aquelas expostas na patente U.S. nº 6 703 023. No entanto, estas vacinas não têm sido eficientes para conferir imunidade protetora contra infecção por PCV2 ou para reduzir, diminuir a gravidade ou curar quaisquer sintomas clínicos associados com a mesma.

5 Além disso, vacinas descritas na técnica anterior centraram-se exclusivamente na prevenção de infecções por PCV2 em suínos, porém não consideraram qualquer outro uso médico.

De acordo com o mesmo, a técnica necessita uma composição imunogênica para o tratamento de várias manifestações clínicas. Ademais, a
10 técnica necessita uma composição imunológica que confira imunidade protetora contra infecção por PCV2, porém que possa ser utilizada também para tratar sintomas clínicos existentes associados com infecção por PCV2.

Descrição da Invenção

A presente invenção supera os problemas inerentes na técnica
15 anterior e proporciona um avanço distinto no estado da técnica. A presente invenção propicia uso(s) medicinais de composição(ões) imunogênica(s) compreendendo antígeno do PCV2.

Em geral, não foram observados eventos adversos ou reações
20 no local da injeção em quaisquer das composições imunogênicas de antígenos do PCV2, conforme utilizadas no presente. Dessa forma, as composições imunogênicas utilizadas neste pedido parecem ser seguras quando administradas a porcos com menos de 15 semanas de vida, de preferência, com menos de 6 semanas de vida, mais preferivelmente, com menos de 3
25 semanas, sendo o mais preferível com menos 2 de semanas. Alternativamente, é preferida a administração das composições imunogênicas da presente invenção no período de, pelo menos, 2, sendo preferivelmente de, pelo menos, 3 semanas da descrição a PCV virulento. De acordo com uma
30 outra concretização, composições imunogênicas utilizadas neste pedido para qualquer uso medical aqui descrito, são administradas a porcos de 3 semanas de vida ou mais, de preferência, de 2 semanas de vida ou mais, sendo o mais preferível que não tenham mais do que 15 semanas de vida.

Inesperadamente, foi constatado que o uso terapêutico das composições imunogênicas descritas abaixo é efetivo para diminuir a gravi-

composições imunogênicas descritas abaixo é efetivo para diminuir a gravidade de vários sintomas clínicos em suínos. Foi descoberto, especialmente, que o uso terapêutico das composições imunogênicas da presente invenção e, especificamente, das composições compreendendo antígeno da ORF2 do PCV2 ORF2 é efetivo para reduzir ou diminuir linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes, em suínos infectados por PCV2. Além disso, o uso terapêutico de uma composição antigênica, conforme provido neste pedido, e que compreende antígeno de PCV2, de preferência, antígeno da ORF2, reduz a carga global do circovírus e o seu impacto imunossupressor e, pelo mesmo, resulta em nível mais alto de resistência geral à doença e redução de incidência de doenças e sintomas associados a PCV-2.

Dessa forma, uma característica da presente invenção refere-se ao uso de uma composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, mais preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida, para o preparo de um medicamento para a prevenção, diminuição e/ou redução de linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes em suínos. De preferência, o referido medicamento é efetivo para a prevenção, diminuição e/ou redução de linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes, associados a infecções por PCV2 em suínos. Ainda mais preferivelmente, o referido medicamento é efetivo para prevenção, diminuição e/ou redução de linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes, associados a infecções por PCV2 em porcos, quando administrado a porcos com menos de 15 semanas de vida, de preferência, com menos de 6 semanas de vida, preferivelmente, com menos de 3 semanas, sendo o mais preferível, com menos de 2 semanas de vida. Alternativamente, é preferida a administração das composições imunogênicas da presente invenção no período de, pelo menos, 2 e, de preferência, no período de, pelo menos, 3 semanas da exposição a PCV virulento.

Outra característica da presente invenção refere-se a um método para o tratamento de linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos

multinucleados/gigantes em suínos, compreendendo a administração de uma composição imunogênica, conforme provida no presente, para um porco, a referida composição imunogênica compreendendo um antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, mais preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2. Em ainda uma outra característica, a presente invenção provê um método para o tratamento de linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes, associados a uma infecção por PCV2 em suínos, compreendendo a administração de uma composição imunogênica, conforme provida no presente, para um porco, a referida composição imunogênica compreendendo um antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, mais preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2. De preferência, o referido tratamento resulta na diminuição, redução, prevenção e/ou cura da linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes, em suínos que recebem a referida composição imunogênica. De acordo com uma outra característica, os referidos métodos para tratamento compreendem ainda a administração da referida composição imunogênica para porcos com menos de 15 semanas de vida, de preferência, com menos de 6 semanas de vida, preferivelmente, com menos de 3 semanas, sendo o mais preferível, com menos de 2 semanas de vida. Alternativamente, é preferida a administração das composições imunogênicas da presente invenção no período de, pelo menos, 2 e, de preferência, no período de, pelo menos, 3 semanas da exposição a PCV virulento.

Foi ainda descoberto que o uso terapêutico de uma composição imunogênica compreendendo um antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, mais preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme provida no presente, pode reduzir ou diminuir linfadenopatia, em combinação com um ou com vários dos seguintes sintomas em suínos acometidos: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc.

Dessa forma, uma característica da presente invenção refere-se ao uso de uma composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, mais preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida, para o preparo de um medicamento para a prevenção, diminuição ou redução de linfadenopatia, em combinação com um ou por em combinação com um ou com vários dos seguintes sintomas em suínos acometidos: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc. em porcos. De preferência, o referido medicamento é efetivo para a prevenção, diminuição e/ou redução de linfadenopatia, em combinação com ou com vários dos seguintes sintomas, associados com infecção por PCV2 em porcos: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc. De acordo com uma outra característica, o referido medicamento é efetivo para a prevenção, diminuição e/ou redução de linfadenopatia, em combinação com um ou com vários dos seguintes sintomas em porcos: (1) 1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc, em porcos, quando administrado para porcos com menos de 15 semanas de vida, de preferência, com menos de 6 semanas de vida, preferivelmente, com menos de 3 semanas, sendo o mais preferível com menos de 2 semanas de vida. Alternativamente, é preferida a administração das composições imunogênicas da presente invenção no período de, pelo menos, 2 e, de preferência, no período de, pelo menos, 3 semanas da exposição a PCV virulento.

Além disso, a presente invenção refere-se também a um método para o tratamento de linfadenopatia, em combinação com um ou com vários dos seguintes sintomas em porcos: (1) 1) pneumonia intersticial com

edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atroficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc, o referido método compreendendo a administração de uma composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida. De preferência, a presente invenção refere-se também a um método para o tratamento de linfadenopatia, em combinação com um ou com vários dos seguintes sintomas em porcos: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atroficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc, o referido método compreendendo a administração de composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida, para um porco. De preferência, o referido tratamento resulta na diminuição ou redução da linfadenopatia e de um ou vários dos seguintes sintomas associados com infecção por PCV2 em porcos: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atroficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc. De acordo com uma outra característica, os referidos métodos para tratamento compreendem ainda administração da composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida, para porcos com menos de 15 semanas de vida, de preferência, com menos de 6 semanas de vida, preferivelmente, com menos de 3 semanas, sendo o mais preferível com menos de 2 semanas de vida. Alternativamente, é preferida a administração das composições imunogênicas da presente invenção no período de, pelo menos, 2 e, de preferência, no período de, pelo menos, 3 semanas da exposição a PCV virulento.

Foi também inesperadamente constatado que o uso terapêutico

de uma composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida, pode reduzir também lesões semelhantes às de EPS (Enteropatia Proliferativa Suína), conhecidas normalmente como estando associadas a infecções por *Lawsonia intracellularis* (Ileíte).

Dessa forma, uma característica da presente invenção refere-se ao uso de uma composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida, para o preparo de um medicamento para a prevenção, diminuição da gravidade e/ou redução de lesões semelhantes às de EPS, conhecidas normalmente como estando associadas a infecções por *Lawsonia intracellularis* em suínos. De acordo com ainda uma outra característica, o referido medicamento é efetivo para a prevenção, diminuição da gravidade e/ou redução de lesões semelhantes às de EPS, conhecidas normalmente como estando associadas a infecções por *Lawsonia intracellularis*, quando administrado para porcos com menos de 15 semanas de vida, de preferência, com menos de 6 semanas de vida, preferivelmente, com menos de 3 semanas, sendo o mais preferível com menos de 2 semanas de vida. Alternativamente, é preferida a administração das composições imunogênicas da presente invenção no período de, pelo menos, 2 e, de preferência, no período de, pelo menos, 3 semanas da exposição a PCV virulento.

Além disso, a presente invenção refere-se também a um método para o tratamento de lesões semelhantes às de EPS, conhecidas normalmente como estando associadas com infecções por *Lawsonia intracellularis*, o referido método compreendendo a administração de uma composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida, para um porco. De preferência, o referido tratamento resulta na diminuição ou redução das lesões semelhantes às de EPS, normalmente conhecidas como estando associadas a infecções por *Lawsonia intracellularis*. De acordo com uma outra característica, os métodos de tra-

tamento descritos acima compreendem ainda a administração da composição imunogênica compreendendo antígeno do PCV2, de preferência, antígeno recombinante do PCV2 e, preferivelmente, proteína da ORF2 do PCV2, conforme aqui provida, para porcos com menos de 15 semanas de vida, de preferência, com menos de 6 semanas de vida, preferivelmente, com menos de 3 semanas, sendo o mais preferível com menos de 2 semanas de vida. Alternativamente, é preferida a administração das composições imunogênicas da presente invenção no período de, pelo menos, 2 e, de preferência, no período de, pelo menos, 3 semanas da exposição a PCV virulento.

A Composição Imunogênica

A composição imunogênica, conforme utilizada no presente, possui o efeito de induzir resposta imune contra PCV2 e de prevenir, reduzir e/ou diminuir a gravidade dos sintomas clínicos, associados à infecção por PCV2. A composição compreende geralmente, pelo menos, um antígeno do PCV2.

A não ser que definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos, utilizados neste pedido de patente, possuem os mesmos significados conforme comumente entendidos por qualquer técnico no assunto ao qual esta invenção pertence. O termo "composição imunogênica", conforme utilizado neste pedido, refere-se a qualquer composição farmacêutica contendo um antígeno do PCV2 que pode ser utilizada para prevenir ou tratar uma doença ou condição associada à infecção por PCV2 em um sujeito. Uma composição imunogênica preferida pode induzir, estimular ou intensificar a resposta imune contra PCV2. O termo, dessa forma, abrange composições imunogênicas subunitárias, conforme descritas abaixo, bem como composições contendo PCV2 completo morto ou atenuado e/ou inativado.

O termo "composição imunogênica subunitária", conforme utilizado neste pedido, refere-se a uma composição contendo, pelo menos, um polipeptídeo imunogênico ou antígeno, porém não todos os antígenos, derivados ou homólogos a um antígeno do PCV2. Esse tipo de composição é

substancialmente livre de PCV2 intacto. Dessa forma, uma "composição imunogênica subunitária" é preparada a partir de polipeptídeos imunogênicos, pelo menos, parcialmente purificados ou fracionados (de preferência, substancialmente purificados), do PCV2 ou de análogos recombinantes dos mesmos. Uma composição imunogênica subunitária pode compreender subunidades do antígeno ou antígenos de interesse, substancialmente livres de outros antígenos ou polipeptídeos do PCV2, ou em frações do mesmo. Uma composição imunogênica subunitária preferida compreende a proteína da ORF2 do PCV2, conforme descrita abaixo.

Uma "resposta imunológica ou imune" a uma composição ou vacina é o desenvolvimento, no hospedeiro, de uma resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo à composição ou vacina de interesse. Geralmente, uma "resposta imune" inclui, entre outros, um ou mais dos seguintes efeitos: a produção ou ativação de anticorpos, células B, células T auxiliares, células T supressoras e/ou células T citotóxicas e/ou células T yd, direcionada especificamente para um antígeno ou antígenos, incluídos na composição ou vacina de interesse. De preferência, o hospedeiro exibirá uma resposta imunológica terapêutica ou imunológica de forma que a resistência à nova infecção será intensificada e/ou a gravidade da doença, reduzida. Essa proteção será demonstrada por redução em número ou gravidade ou ausência de um ou mais dos sintomas associados a infecções por PCV2, conforme descritas acima.

Os termos proteína ou polipeptídeo "imunogênico" ou "antígeno", conforme utilizados neste pedido, referem-se a uma seqüência de aminoácidos que provoca uma resposta imunológica, conforme descrita acima. Uma proteína ou polipeptídeo "imunogênico", conforme utilizado neste pedido, inclui a cadeia em extensão completa de quaisquer proteínas do PCV2, análogos das mesmas ou fragmentos imunogênicos das mesmas. O termo "fragmento imunogênico" refere-se a um fragmento de uma proteína que inclui um ou mais epítomos e, dessa forma, provoca a resposta imunológica descrita acima. Estes fragmentos podem ser identificados empregando quaisquer técnicas de mapeamento de epítomos, bem conhecidas na técni-

ca. Consultar, por exemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por exemplo, epítomos lineares podem ser determinados, por exemplo, pela síntese concomitante de um grande número de peptídeos, em
5 suportes sólidos, correspondentes a porções da molécula protéica e a reação dos peptídeos com anticorpos enquanto ainda presos aos suportes. Estas técnicas são conhecidas na arte e estão descritas, por exemplo, na Patente U.S. Nº 4 708 871; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. Semelhantemente, epítomos que se combinam são prontamente identificados por
10 determinação de conformação espacial de aminoácidos como por cristalografia de raios x e ressonância magnética nuclear bidimensional. Consultar, por exemplo, *Epitope Mapping Protocols*, supra.

Antígenos sintéticos estão incluídos também na definição, por
15 exemplo, poliepítomos, epítomos adjacentes e outros antígenos recombinantes ou derivados por via sintética. Consultar, por exemplo, Bergmann *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777-2781; Bergmann *et al.* (1996), *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. and Cell Biol.* 75:402-408; Gardner *et al.*, (1998) 12ª Conferência Mundial sobre AIDS, Genebra, Suíça,
20 28 de junho - 03 de julho de 1998.

Em uma concretização preferida da presente invenção, é provida uma composição imunogênica que induz resposta imune e, de preferência, confere imunidade protetora contra os sinais clínicos de infecção por PCV2. A composição compreende do modo mais preferível o polipeptídeo, ou
25 fragmento deste, expresso pela ORF2 do PCV2, como o componente antigênico da composição. O DNA da ORF2 e da proteína do PCV2, conforme utilizados no presente, para o preparo das composições e nos processos providos neste pedido, é um domínio altamente conservado nos isolados de PCV2 e, de acordo com o mesmo, qualquer ORF2 do PCV2 seria efetiva como a fonte
30 do DNA da ORF2 e/ou do polipeptídeo do PCV, conforme utilizado neste pedido. Uma proteína preferida da ORF2 do PCV2 é aquela representada pela SEQ ID NO. 11. Um polipeptídeo preferido da ORF2 do PCV é provido,

neste pedido, como a SEQ ID NO. 5, porém ficando entendido por aqueles versados na técnica que a homologia desta seqüência poderia variar em até 6-10% e ainda assim, reter as características antigênicas que a torna útil em composições imunogênicas. As características antigênicas de uma composição imunológica podem ser, por exemplo, estimadas pelo experimento de provocação, conforme provido pelo Exemplo 4. Além disso, a característica antigênica de um antígeno modificado é retida ainda quando o antígeno modificado confere, pelo menos, 70%, de preferência, 80% e, preferivelmente, 90% da imunidade protetora em comparação à da proteína da ORF2 do PCV2 ORF 2, codificada pela seqüência de polinucleotídeos, representada pela SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:4. Uma "composição imunogênica", conforme utilizada neste pedido, significa uma proteína da ORF2 do PCV2 que provoca uma "resposta imunológica", no hospedeiro, de resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo à proteína da ORF2 do PCV2. De preferência, esta composição imunogênica é capaz de provocar ou intensificar uma resposta imune contra PCV2 e, pelo mesmo, conferir imunidade protetora contra infecção por PCV2 e redução na incidência, gravidade ou prevenção de um ou mais, de preferência, de todos os sinais clínicos associados com a mesma.

Em algumas formas, as porções imunogênicas da proteína da ORF2 do PCV2 são utilizadas como o componente antigênico na composição. O termo "porção imunogênica", conforme utilizado neste pedido, refere-se a formas truncadas e/ou substituídas, ou fragmentos da proteína e/ou polinucleotídeo da ORF2 do PCV2, respectivamente. De preferência, estas formas truncadas e/ou substituídas, ou fragmentos, compreenderão, pelo menos, 6 aminoácidos contíguos do polipeptídeo de seqüência completa da ORF2. De preferência, as formas truncadas e/ou substituídas, ou fragmentos, terão, pelo menos, 10, preferivelmente, pelo menos, 15, e, ainda mais preferivelmente, pelo menos, 19 aminoácidos contíguos do polipeptídeo de seqüência completa da ORF2. A esse respeito, duas seqüências preferidas são fornecidas neste pedido, representadas pelas SEQ ID NOs. 9 e 10. Ficando entendido ainda que estas seqüências podem fazer parte de fragmen-

tos maiores ou de formas truncadas.

Um outro polipeptídeo da ORF2 do PCV2, fornecido neste pedido, é codificado pelas seqüências de nucleotídeos, representadas pela SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4. No entanto, ficando entendido por especialistas na técnica que a homologia desta seqüência poderia variar em até 6-20% e ainda reter as características antigênicas que a torna útil em composições imunogênicas. Em algumas formas são utilizadas formas truncadas ou substituídas, ou fragmento, deste polipeptídeo da ORF2 do PCV2 como o componente antigênico na composição. De preferência, estas formas truncadas ou substituídas, ou fragmentos, compreenderão pelo menos 18 nucleotídeos contíguos da seqüência completa de nucleotídeos da ORF2, por exemplo, da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4. De preferência, as formas truncadas ou substituídas, ou fragmentos, terão, pelo menos, 30, preferivelmente, pelo menos 45, sendo ainda mais preferível, pelo menos, 57 nucleotídeos contíguos da seqüência completa de nucleotídeos da ORF2, por exemplo, da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

"Identidade de seqüência, conforme conhecida na técnica, refere-se à relação entre duas ou mais seqüências de polipeptídeos, a saber, uma seqüência de referência, e uma seqüência específica a ser comparada com a seqüência de referência. A identidade de seqüência é determinada pela comparação da seqüência específica com a seqüência de referência, depois que as seqüências tiverem sido o mais adequadamente alinhadas a fim de ser obtido o grau mais alto de similaridade, conforme determinado pela combinação entre faixas destas seqüências. Após este alinhamento, a identidade de seqüência é averiguada de posição em posição, por exemplo, as seqüências são "idênticas" em uma posição em particular, se naquela posição os nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos forem idênticos. O número total destas identidades de posição é dividido, em seguida, pelo número total de nucleotídeos ou resíduos na seqüência de referência, fornecendo o % de identidade de seqüência. A identidade de seqüência pode ser calculada prontamente por métodos conhecidos, incluindo, entre outros, aqueles descritos em *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford Uni-

versity Press, New York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); e Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência neste pedido. Métodos preferidos para determinar identidade de seqüência são criados para que a maior combinação entre as seqüências testadas possa ser fornecida. Os métodos para determinar identidade de seqüência são codificados em programas de computador publicamente disponíveis que determinam a identidade de seqüência entre seqüências especificadas. Exemplos destes programas incluem, entre outros, o pacote de programas GCG (Devereux, J. *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). O programa BLASTX é disponibilizado para o público pelo NCBI e por 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 neste pedido). Estes programas alinham seqüências da forma mais adequada, ponderando intervalos padrão a fim de ser produzido o nível mais alto de identidade de seqüência entre a seqüência especificada e a de referência. A título de ilustração, por polinucleotídeo contendo seqüência de nucleotídeos com, pelo menos, por exemplo, 85%, de preferência, 90% e, mais preferivelmente, com 95% de "identidade de seqüência", em relação a uma seqüência de nucleotídeos de referência, pretende-se que a seqüência de nucleotídeos do polinucleotídeo especificado é idêntica à seqüência de referência, exceto que a seqüência do polinucleotídeo especificado poderá incluir até 15, de preferência, até 10 e, mais preferivelmente, até 5 mutações pontuais a cada 100 nucleotídeos da seqüência de nucleotídeo de referência. Em outras palavras, em um polinucleotídeo contendo seqüência de nucleotídeos com, pelo menos, por exemplo, 85%, de preferência, 90% e, ainda

mais preferivelmente, com 95% de identidade em relação à seqüência de nucleotídeos de referência, até 15%, de preferência, 10% e, ainda mais preferivelmente, até 5% dos nucleotídeos na seqüência de referência poderão ser excluídos ou substituídos por um outro nucleotídeo, ou um número de

5 nucleotídeos até 15%, de preferência, 10% e, ainda mais preferivelmente, 5% dos nucleotídeos totais na seqüência de referência poderá ser inserido na seqüência de referência. Essas mutações da seqüência de referência poderão ocorrer nas posições 5' ou 3' terminais da seqüência de nucleotí-

10 deos de referência ou em qualquer local entre estas posições terminais, intercaladas individualmente entre nucleotídeos na seqüência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da seqüência de referência. Analogamente, por polinucleotídeo contendo uma seqüência especificada de aminoácidos com, pelo menos, por exemplo, 85%, de preferência, 90% e, ainda mais preferivelmente, com 95% de identidade de seqüência em relação a

15 uma seqüência de aminoácidos de referência, pretende-se que a seqüência especificada de aminoácidos do polipeptídeo é idêntica à seqüência de referência, exceto que a seqüência especificada do polipeptídeo poderá incluir até 15, de preferência, até 10 e, ainda mais preferivelmente, até 5 alterações em aminoácido por cada 100 aminoácidos da seqüência de aminoácidos de

20 referência. Em outras palavras, para obter uma seqüência especificada de polipeptídeo com, pelo menos, 85%, de preferência, 90% e, ainda mais preferivelmente, com 95% de identidade de seqüência com uma seqüência de aminoácidos de referência, até 15%, de preferência, até 10% e, ainda mais preferivelmente, até 5% dos resíduos de aminoácidos na seqüência de refe-

25 rência poderão ser excluídos ou substituídos por outro aminoácido, ou um número de aminoácidos até 15%, de preferência, até 10% e, ainda mais preferivelmente, até 5% do número total de resíduos de aminoácidos na seqüência de referência poderão ser inseridos na seqüência de referência. Essas alterações da seqüência de referência poderão ocorrer nas posições

30 terminais de aminoácidos ou de carboxi da seqüência de aminoácidos de referência ou em qualquer local entre estas posições terminais, intercaladas individualmente entre resíduos na seqüência de referência ou em um ou

mais dos grupos contíguos dentro da seqüência de referência. De preferência, posições de resíduos que não forem idênticas diferem por substituições conservadoras de aminoácidos. No entanto, substituições conservadoras não estão incluídas como combinação, quando se determina identidade de seqüência.

"Homologia de seqüência", conforme utilizada neste pedido, refere-se a um método de determinação da relação entre duas seqüências. Para determinar homologia de seqüência, duas ou mais seqüências são alinhadas do modo mais adequado, sendo introduzidos intervalos, se necessário. No entanto, ao contrário de "identidade de seqüência", substituições conservadoras de aminoácidos são contadas como combinação, quando se determina homologia de seqüência. Em outras palavras, para se obter um polipeptídeo ou polinucleotídeo com 95% de homologia de seqüência com uma seqüência de referência, 85%, de preferência, 90% e, ainda mais preferivelmente, 95% dos resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos na seqüência de referência deverão combinar ou compreender uma substituição conservadora por outro aminoácido ou nucleotídeo, ou um número de aminoácidos ou nucleotídeos até 15%, de preferência, até 10% e, ainda mais preferivelmente, até 5% dos resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos totais, não incluindo substituições conservadoras, na seqüência de referência poderão ser inseridos na seqüência de referência. De preferência, a seqüência homóloga compreende um trecho de, pelo menos, 50, preferivelmente, de, pelo menos, 100, ainda mais preferivelmente de, pelo menos, 250, sendo o mais preferível, de pelo menos, 500 nucleotídeos.

"Substituição conservadora" refere-se à substituição de um resíduo de aminoácido ou nucleotídeo por outro resíduo de aminoácido ou nucleotídeo com características ou propriedades semelhantes, como tamanho, hidrofobicidade, etc., de forma que a funcionalidade total não se altere significativamente.

"Isolado" significa alterado "artificialmente pelo homem" de seu estado natural, ou seja, se ocorre em natureza, foi modificado ou retirado de seu ambiente original ou ambos. Por exemplo, um polinucleotídeo ou poli-

peptídeo naturalmente presente em um organismo vivo não é "isolado", porém o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo separado dos materiais que coexistem em seu estado natural é "isolado", de acordo com o uso empregado para este termo neste pedido.

- 5 Dessa forma, a composição imunogênica, conforme utilizada neste pedido, refere-se também a uma composição que compreende proteína da ORF2 do PCV2, em que a proteína da ORF2 do PCV2 é qualquer uma das descritas acima. De preferência, a referida proteína da ORF2 do PCV2 é
- 10 i) um polipeptídeo compreendendo a seqüência representada pela SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11;
- ii) qualquer polipeptídeo, pelo menos, 80% homólogo ao polipeptídeo de i),
- iii) qualquer porção imunogênica dos polipeptídeos de i) e/ou ii);
- iv) a porção imunogênica de iii), compreendendo, pelo menos, 10 aminoácidos contíguos, incluídos nas seqüências representadas pela SEQ ID NO: 5,
- 15 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11;
- v) um polipeptídeo codificado por DNA que compreenda a seqüência representada pela SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4;
- vi) qualquer polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo, pelo menos, 80% homólogo ao polinucleotídeo de v);
- 20 vii) qualquer porção imunogênica dos polipeptídeos codificados pelo polinucleotídeo de v) e/ou vi);
- viii) a porção imunogênica de vii), em que o polinucleotídeo que codifica a referida porção imunogênica compreende, pelo menos, 30 nucleotídeos contíguos, incluídos nas seqüências representadas pela SEQ ID NO: 3 ou SEQ
- 25 ID NO: 4.

De preferência, qualquer uma destas porções imunogênicas possuem as características da proteína da ORF do PCV2, codificada pela seqüência representada pela SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

- De acordo com outra característica, a proteína da ORF2 do
- 30 PCV2 é provida na composição imunológica em nível de inclusão de antígeno efetivo para indução da resposta imune desejada, a saber, redução da incidência, diminuição da gravidade ou prevenção de um ou mais sinais clí-

nicos, resultantes de infecção por PCV2. De preferência, o nível de inclusão da proteína da ORF2 do PCV2 é de, pelo menos, 0,2 μg de antígeno/ml da composição imunogênica final ($\mu\text{g}/\text{ml}$), preferivelmente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferível, de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sendo o mais preferível de aproximadamente 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

De acordo com outra característica, o nível de inclusão de antígeno da ORF2 é, de pelo menos, 0,2 μg / proteína da ORF2 do PCV2, conforme descrita acima, por dose da composição antigênica final ($\mu\text{g}/\text{dose}$), de preferência de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 $\mu\text{g}/\text{dose}$, preferivelmente, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,45 a aproximadamente 30 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 15 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 8 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3,0 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,5 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ainda mais preferivelmente, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 $\mu\text{g}/\text{dose}$, sendo o mais preferível de aproxima-

damente 1,6 µg/dose.

O polipeptídeo da ORF2 do PCV2, utilizado na composição imunogênica de acordo com a presente invenção, pode ser derivado de qualquer maneira, incluindo isolamento e purificação da ORF2 do PCV2, síntese
5 protéica convencional e metodologia recombinante. Métodos preferidos para se obter polipeptídeo da ORF2 do PCV2 ORF2 são providos no Pedido de Patente U.S. Série Nº 11/034 797, cujos ensinamentos e exposição são aqui incorporados por referência neste pedido. Resumidamente, células susceptíveis são infectadas por um vetor viral recombinante, contendo seqüências
10 codificadoras de DNA da ORF2 do PCV2, o polipeptídeo da ORF2 do PCV2 expressado é recuperado do sobrenadante por filtração e inativado por qualquer método convencional, de preferência utilizando etilenimina binária, a qual é neutralizada, em seguida, para interromper o processo de inativação.

A composição imunogênica, conforme utilizada neste pedido,
15 refere-se também a uma composição que compreende i) qualquer proteína da ORF2 do PCV2 descrita acima, de preferência em concentrações descritas acima, e ii) pelo menos uma parte do vetor viral que expressa a referida proteína da ORF2 do PCV2, de preferência um baculovírus recombinante. Além disso, a composição imunogênica pode compreender i) qualquer prote-
20 ína da ORF2 do PCV2 descrita acima, de preferência em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma parte do vetor viral que expressa a referida proteína da ORF2 do PCV2, de preferência um baculovírus recombinante, e iii) uma parte do sobrenadante da cultura celular.

A composição imunogênica, conforme utilizada neste pedido,
25 refere-se também a uma composição que compreende i) qualquer proteína da ORF2 do PCV2 descrita acima, de preferência em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma parte do vetor viral que expressa a referida proteína da ORF2 do PCV2, de preferência um baculovírus recombinante, e
30 iii) uma parte da cultura celular; em que aproximadamente 90% dos componentes apresentam tamanho inferior a 1 µm.

A composição imunogênica, conforme utilizada neste pedido, refere-se também a uma composição que compreende i) qualquer proteína

da ORF2 do PCV2 descrita acima, de preferência em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma parte do vetor viral que expressa a referida proteína da ORF2 do PCV2, iii) uma parte da cultura celular, iv) e agente inativador para inativar o vetor viral recombinante, de preferência, BEI, em que aproximadamente 90% dos componentes i) a iii) apresentam tamanho inferior a 1 µm. De preferência, BEI está presente em concentrações efetivas para inativar o baculovírus. Concentrações efetivas são descritas acima.

A composição imunogênica, conforme utilizada neste pedido, refere-se também a uma composição que compreende i) qualquer proteína da ORF2 do PCV2 descrita acima, de preferência em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma parte do vetor viral que expressa a referida proteína da ORF2 do PCV2, iii) uma parte da cultura celular, iv) um agente inativador para inativar o vetor viral recombinante, de preferência, BEI, e v) um agente de neutralização para interromper a inativação mediada pelo agente inativador, em que aproximadamente 90% dos componentes i) a iii) apresentam tamanho inferior a 1 µm. De preferência, se o agente inativador for BEI, a referida composição compreende tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes às de BEI.

O polipeptídeo é incorporado em uma composição que pode ser administrada a um animal suscetível à infecção por PCV2. Em formas preferidas, a composição poderá incluir também componentes adicionais, conhecidos de especialistas na técnica (consultar também *Remington's Pharmaceutical Sciences*, (1990), 18ª ed. Mack Publ., Easton). Adicionalmente, a composição poderá incluir um ou mais veículos veterinários aceitáveis. Conforme utilizado neste pedido, "veículo veterinário aceitável" inclui quaisquer e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos, adjuvantes, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos, agentes de adsorção prolongada e semelhantes. Em uma concretização preferida, a composição imunogênica compreende proteína da ORF2 do PCV2, conforme provida neste pedido, de preferência em concentrações descritas acima, a qual é misturada com um adjuvante, de preferência, Carbopol, e solução salina fisiológica.

Especialistas na técnica entenderão que a composição utilizada neste pedido poderá incorporar soluções estéreis conhecidas injetáveis, fisiologicamente aceitáveis. Para o preparo de uma solução de uso imediato, para injeção parenteral ou infusão, soluções aquosas isotônicas como, por exemplo, solução salina ou soluções de proteínas plasmáticas correspondentes, são disponíveis de imediato. Ademais, as composições imunogênicas e de vacina da presente invenção pode incluir diluentes, agentes isotônicos, estabilizadores ou adjuvantes. Diluentes podem incluir água, solução salina, dextrose, etanol, glicerol e semelhantes. Agentes isotônicos podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose, entre outros. Estabilizadores incluem albumina e sais alcalinos do ácido etilendiaminotetracético, entre outros.

"Adjuvantes", conforme utilizado no presente, podem incluir hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, saponinas, por exemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsão água-em-óleo, emulsão óleo-em-água, emulsão água-em-óleo-em-água. A emulsão pode ser especialmente à base de óleo de parafina líquida leve (do tipo da Farmacopéia Européia), óleo isoprenóide, como esqualano ou óleo de esqualeno, resultante da oligomerização de alcenos, especialmente de isobuteno ou deceno; ésteres de ácidos ou de álcoois contendo grupo alquila linear, mais especialmente, óleos vegetais, etil oleato, propileno glicol di-(caprilato/caprato), gliceril tri-(caprilato/caprato) ou dioleatopropileno glicol ; ésteres de ácidos graxos ou álcoois ramificados, especialmente ésteres de ácido isoesteárico. O óleo é utilizado em combinação com emulsificantes para formar a emulsão. Os emulsificantes são, de preferência, tensoativos não iônicos, especialmente, ésteres de sorbitano, de manitol (por exemplo, oleato de manitol anidro), de glicol, de poliglicerol, de propilenoglicol e de ácido oléico, isoesteárico, ricinoléico ou hidroxiesteárico, os quais são opcionalmente etoxilados e copolímeros de bloco de polioxipropileno-polioxietileno, em particular, os produtos Plurônicos, especialmente, L121. Consultar, Hunter *et al.*, *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). JohnWiley and

Sons, NY, páginas 51-94 (1995) e Todd *et al.*, *Vaccine* 15:564-570 (1997).

Por exemplo, é possível usar a emulsão SPT, descrita na página 147 do livro "*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 do mesmo livro.

Um outro exemplo de adjuvante é um composto escolhido entre os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e os copolímeros de anidrido maléico e derivado alquenila. Compostos adjuvantes vantajosos são os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico, em ligação cruzada, especialmente com éteres polialquenila de açúcares ou poliálcoois. Estes compostos são conhecidos pela denominação carbômero (*Pharmeuropa* Vol. 8, Nº 2, Junho 1996). Técnicos no assunto podem consultar também a Patente U.S. Nº 2 909 462 que descreve estes polímeros acrílicos em ligação cruzada com um composto polihidroxilado com, pelo menos, 3 grupos hidroxilas, de preferência, com não mais do que 8, os átomos de hidrogênio de, pelo menos, três hidroxilas sendo substituídos por radicais alifáticos não saturados com, pelo menos, 2 átomos de carbono. Os radicais preferidos são aqueles contendo de 2 a 4 átomos de carbono, por exemplo, vinilas, alilas e outros grupos não saturados por radicais etilenilas. Os próprios radicais não saturados podem conter outros substituintes, como metila. Os produtos vendidos sob o nome Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, USA) são particularmente apropriados. Eles apresentam ligação cruzada com alil sacarose ou com alil pentaeritritol. Entre eles, podem ser mencionados Carbopol 974P, 934P e 971P. O mais preferido é o uso de Carbopol, especialmente, o uso de Carbopol 971P, de preferência em quantidades aproximadamente de 500 µg a aproximadamente 5 mg por dose, ainda mais preferido, em quantidade de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por, sendo o mais preferido em quantidade de aproximadamente 1 mg por dose.

Outros adjuvantes adequados incluem, entre outros, o sistema adjuvante RIBI (Ribi Inc.), Co-polímero de bloco (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lipídeo A, adjuvante Avridina lipídeo-amina, enterotoxina lábil ao calor de *E. coli* (recombinante ou não), toxina de

cólera, IMS 1314 ou muramil dipeptídeo, entre muitos outros.

De preferência, a quantidade do adjuvante acrescentada é de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, a quantidade do adjuvante acrescentada é de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, a quantidade do adjuvante acrescentada é de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dose. Ainda mais preferivelmente, a quantidade do adjuvante acrescentada é de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dose. Sendo o mais preferível que a quantidade de adjuvante acrescentada seja de aproximadamente 1 mg por dose.

Adicionalmente, a composição pode incluir um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis. Conforme utilizado no presente, "veículo farmacologicamente aceitável" inclui quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de adsorção prolongada e semelhantes. Mais preferivelmente, a composição aqui provida contém proteína da ORF2 do PCV2 recuperada do sobrenadante de células cultivadas *in vitro*, em que as referidas células foram infectadas por um vetor viral recombinante contendo DNA da ORF2 do PCV2 ORF2 que expressa a proteína da ORF2 do PCV2 e, em que a referida cultura de células foi tratada com aproximadamente BEI em concentração de 2 a aproximadamente 8 mM, de preferência, com BEI a aproximadamente 5 mM para inativar o vetor viral, e uma concentração equivalente de um agente neutralizador, de preferência, uma solução de tiosulfato de sódio em concentração final de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, de preferência, de aproximadamente 5 mM.

A presente invenção refere-se também a uma composição imunogênica que compreende i) quaisquer das proteínas da ORF2 do PCV2 ORF2, descritas acima, de preferência, em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma parte do vetor viral que expressa a referida proteína da ORF2 do PCV2, iii) uma parte da cultura celular, iv) um agente inativador para inativar o vetor viral recombinante, de preferência, BEI, e v) um agente

neutralizador para interromper a inativação mediada pelo agente inativador, de preferência, tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes às de BEI; e vi) um adjuvante adequado, de preferência, Carbopol 971 em quantidades descritas acima; em que aproximadamente 90% dos componentes i) a iii) possuem tamanho inferior a 1 μm . De acordo com uma outra característica, esta composição imunogênica compreende ainda um sal farmacêutico aceitável, de preferência, um sal de fosfato em concentrações fisiologicamente aceitáveis. De preferência, o pH da referida composição imunogênica é ajustado para um pH fisiológico, ou seja, entre aproximadamente 6,5 e 7,5.

10 A composição imunogênica, conforme utilizada no presente, refere-se também a uma composição que compreende por um ml i) pelo menos, 1,6 μg de proteína da ORF2 do PCV2, descrita acima, ii) pelo menos uma parte do baculovírus que expressa a referida proteína da ORF2 do PCV2 iii) uma parte da cultura celular, iv) BEI de 2 a 8 mM, v) tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes às de BEI; e vi) aproximadamente 1 mg de Carbopol 971, e vii) sal de fosfato em concentração fisiologicamente aceitável; em que aproximadamente 90% dos componentes i) a iii) possuem tamanho inferior a 1 μm e o pH da referida composição imunogênica é ajustado para aproximadamente 6,5 a 7,5.

20 As composições imunogênicas podem incluir ainda um ou mais outros agentes imunomoduladores como, por exemplo, interleucinas, interferons ou outras citocinas. As composições imunogênicas podem incluir também Gentamicina e Mertiolate. Embora as quantidades e concentrações de adjuvantes e aditivos, úteis no contexto da presente invenção, possam ser imediatamente determinadas por um versado na técnica, a presente invenção contempla composições compreendendo de aproximadamente 50 μg a aproximadamente 2000 μg de adjuvante e, de preferência, de aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dose da composição da vacina. Dessa forma, a composição imunogênica, conforme utilizada no presente, refere-se também a uma composição que compreenda de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a aproximadamente 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antibióticos e, mais preferivelmente, com menos de aproximadamente 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antibióticos.

A composição imunogênica, conforme utilizada no presente, refere-se também a uma composição que compreende i) quaisquer das proteínas da ORF2 do PCV2 ORF2, descritas acima, de preferência, em concentrações descritas acima, ii) pelo menos uma parte do vetor viral que expressa a referida proteína da ORF2 do PCV2, iii) uma parte da cultura celular, iv) um agente inativador para inativar o vetor viral recombinante, de preferência, BEI, e v) um agente neutralizador para interromper a inativação mediada pelo agente inativador, de preferência, tiosulfato de sódio em quantidades equivalentes às de BEI; vi) um adjuvante adequado, de preferência, Carbo-pol 971 em quantidades descritas acima; vii) um tampão salino em concentração farmacêutica aceitável, de preferência de um sal de fosfato, e viii) um agente ativo antimicrobiano; em que aproximadamente 90% dos componentes de i) a iii) possuem tamanho inferior a 1 μ m.

Foi surpreendentemente constatado que a composição imunogênica, compreendendo a proteína da ORF2 do PCV2, permaneceu altamente estável por um período acima de 24 meses. Foi também constatado que as composições imunogênicas são muito eficazes em reduzir os sintomas clínicos associados a infecções por PCV2. Foi descoberto também que as composições imunogênicas, compreendendo a proteína da ORF2 do PCV2, conforme descrita no presente, expressa pelo baculovírus recombinante, têm efeito surpreendentemente maior do que uma composição imunogênica compreendendo o vírus completo PCV2 sob forma inativada ou antígeno viral isolado da ORF2 do PCV2. Em particular, foi surpreendentemente constatado que, a proteína da ORF2 do PCV2 expressa pelo baculovírus recombinante é eficaz em concentrações muito baixas, ou seja, concentrações de até 0,25 μ g/dose. Este alto potencial imunogênico inesperado da proteína da ORF2 do PCV2 é aumentado pelo Carbopol. Os Exemplos 1 a 3 expõem em detalhes a produção de composições imunogênicas compreendendo ORF2 do PCV2.

A composição imunogênica, conforme utilizada no presente, refere-se também a 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).

Administração da composição imunogênica

5 A composição de acordo com a invenção pode ser aplicada por via intradérmica, intratraqueal ou intravaginal. A composição pode ser aplicada, de preferência, por via intramuscular ou intranasal, mais preferivelmente, por via intramuscular. Em animal, pode ser vantajoso aplicar as composições farmacêuticas, conforme descritas acima, por via intravenosa ou injeção direta em tecidos direcionados. Em relação à aplicação sistêmica, a
10 via intravenosa, intravascular, intramuscular, intranasal, intra-arterial, intraperitoneal, oral ou intratecal são preferidas. Uma aplicação mais local pode ser efetuada por via subcutânea, intradérmica, intracutânea, intracardiaca, intralobal, intramedular, intrapulmonar ou diretamente ou próximo do tecido a ser tratado (tecido conjuntivo, ósseo, muscular, nervoso, epitelial). Dependendo
15 da duração e efetividade desejadas do tratamento, as composições de acordo com a invenção podem ser administradas uma ou várias vezes, além de intermitentemente, por exemplo, diariamente por vários dias, semanas ou meses, e em doses diferentes.

De preferência, pelo menos uma dose das composições imunogênicas, conforme descritas acima, é administrada por via intramuscular para o sujeito em necessidade das mesmas. De acordo com uma outra característica, o antígeno do PCV-2 ou a composição imunogênica compreendendo qualquer um destes antígenos do PCV-2, conforme descritos acima, é formulado e administrado em um (1) mL por dose. Dessa forma, de acordo
20 com uma outra característica, a presente invenção refere-se também a uma composição imunogênica de 1 ml, compreendendo antígeno do PCV-2, conforme descrito acima, para redução ou diminuição de linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes, em porcos infectados por PCV2.

30 De acordo com uma outra característica, a presente invenção refere-se a uma composição imunogênica de 1 ml, compreendendo antígeno do PCV-2, conforme descrito acima, para redução ou diminuição de linfoa-

denopatia em combinação com um ou vários dos seguintes sintomas em porcos: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados.

De acordo com uma outra característica, pelo menos uma outra administração de, pelo menos, uma dose da composição imunogênica, conforme descrita acima, é fornecida a um sujeito em necessidade da mesma, em que a segunda ou qualquer outra administração é fornecida, pelo menos, 14 dias após a administração inicial ou de quaisquer administrações anteriores. De preferência, a composição imunogênica é administrada com um estimulante imune. De preferência, o referido estimulante imune é fornecido, pelo menos, duas vezes. De preferência, o intervalo entre a primeira e a segunda ou qualquer outra administração do estimulante imune é de, pelo menos, 3 dias, mais preferivelmente de, pelo menos, 5 dias e ainda mais preferivelmente de, pelo menos, 7 dias. De preferência, o estimulante imune é fornecido, pelo menos, 10 dias, preferivelmente, 15 dias, ainda mais preferivelmente, 20, ainda mais preferivelmente, pelo menos, 22 dias após a administração inicial da composição imunogênica provida neste pedido. Um estimulante imune preferido é, por exemplo, hemocianina do molusco *keyhole limpet* (KLH), de preferência, emulsificada com adjuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA). No entanto, deve ser entendido com isso, que qualquer outro estimulante imune conhecido de um versado na técnica pode ser utilizado também. O termo "estimulante imune", conforme utilizado no presente, significa qualquer agente ou composição que consiga desencadear a resposta imune, de preferência sem iniciar ou aumentar uma resposta imune específica, por exemplo, a resposta imune contra um patógeno específico. É ainda orientada administração do estimulante imune em dose adequada.

Além disso, foi também surpreendentemente constatado que o potencial imunogênico das composições imunogênicas utilizadas no presente, de preferência, aquelas que compreendem proteína da ORF2 do PCV2 expressa por baculovírus recombinante, ainda mais preferivelmente, em

combinação com Carbopol, pode ser ainda confirmado pela administração da vacina MLV contra PRRS (Síndrome respiratória e reprodutiva suína) da IngelVac (consultar, o Exemplo 5). Sinais clínicos e manifestações da doença causados por PCV2 são ampliados em grande medida na presença de infecção com PRRS. No entanto, as composições imunogênicas e estratégias de vacinação, conforme aqui providas, diminuem este efeito em grande medida, além de mais do que o esperado. Em outras palavras, um efeito sinérgico inesperado foi observado quando animais, de preferência, leitões, foram tratados com quaisquer das composições imunogênicas de ORF2 do PCV2, conforme aqui providas, e a vacina MLV contra PRRS da Ingelvac (Boehringer Ingelheim).

Breve Descrição dos Desenhos

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

As Figuras 2a e 2b são fluxogramas esquemáticos da produção de uma das composições utilizadas de acordo com a presente invenção.

Descrição Detalhada das Concretizações Preferidas

Os exemplos seguintes expõem materiais e procedimentos preferidos de acordo com a presente invenção. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser utilizados, na prática ou em teste da presente invenção, os métodos, dispositivos e materiais preferidos são descritos abaixo. Deverá ser entendido, contudo, que estes exemplos são fornecidos a título somente de ilustração e, nada nos mesmos, deve ser considerado uma limitação sobre o alcance geral da invenção.

Exemplo 1

Este exemplo compara os rendimentos relativos de ORF2, empregando métodos da presente invenção com métodos conhecidos na técnica anterior. Quatro frascos tipo *spinner* (rotação) de 1000 ml foram cultivados com aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células Sf+ /ml em 300 ml de meio livre de soro para inseto, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). A cultura principal de células é identificada como Estoque Principal de Célula SF+

(*Spodoptera frugiperda*), passagem 19, Lot nº N112-095W. As células utilizadas para gerar o Estoque Principal de Célula SF+ foram obtidas da Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. A linhagem de células SF+, para este exemplo, foi confirmada entre as passagens 19 e 59. Outras passagens 5 funcionarão para finalidades da presente invenção, porém, para aumentar a escala do processo até produção em larga escala, serão necessárias provavelmente, pelo menos, 19 passagens, e passagens além da 59ª poderão ter efeito sobre expressão, embora esse fato não tenha sido investigado. Mais detalhadamente, as culturas iniciais de células SF+, provenientes de armazenamento em nitrogênio líquido, foram cultivadas em meio Excell 420 em 10 suspensão em frascos estéreis tipo *spinner* sob constante agitação. As culturas foram cultivadas em frascos tipo *spinner* de 100 ml a 250 ml com 25 a 150 ml de meio livre de soro Excell 420. Quando as células multiplicaram-se e atingiram densidade celular de $1,0 - 8,0 \times 10^6$ células/ml, foram divididas 15 em novos frascos com densidade de plantio de $0,5 - 1,5 \times 10^6$ células/ml. Culturas de expansão subsequente foram cultivadas em frascos tipo *spinner* até que fossem produzidos 36 litros, ou em biorreatores de aço inoxidável de até 300 litros por um período de 2-7 dias a 25 – 29°C.

Após a semeadura, os frascos foram incubados a 27°C por 20 quatro horas. Subseqüentemente, cada frasco foi semeado com baculovírus recombinante contendo o gene da ORF2 do PCV2 (SEQ ID NO: 4). O baculovírus recombinante contendo o gene da ORF2 do PCV2 foi gerado da seguinte maneira: o gene da ORF2 do PCV2 de uma cepa norte-americana de PCV2 foi amplificado por PCR para conter uma seqüência 5' de Kozak (SEQ 25 ID NO: 1) e um sítio 3' de EcoR1 (SEQ ID NO: 2), e clonado no vetor pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Em seguida, foi extraído, subseqüentemente, e subclonado no vetor de transferência pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). A porção subclonada é representada neste pedido pela SEQ ID NO: 7. O plasmídeo pVL1392, contendo o gene da ORF2 do 30 PCV2, foi denominado N47-064Y e, em seguida, co-transfectado com DNA de baculovírus BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) em células Sf+ de insetos (Protein Sciences, Meriden, CT) a fim de ser gerado o baculovírus

recombinante contendo o gene da ORF2 da PCV2. O novo constructo é apresentada neste pedido como SEQ ID NO: 8. O baculovírus recombinante, contendo o gene da ORF2 do PCV2 ORF2, foi purificado em placa e o Vírus Semente Principal (MSV) foi propagado na linhagem de células SF+, dividido em alíquotas e armazenado a -70 °C. O MSV foi identificado positivamente como baculovírus com ORF2 do PCV2 por PCR-RFLP; empregando iniciadores específicos de baculovírus. Células de inseto infectadas por baculovírus com ORF2 de PCV2 para gerar MSV ou Vírus Semente de Trabalho expressam antígeno da ORF2 do PCV2, conforme detectado por anticorpos policlonais do soro ou anticorpos monoclonais em um ensaio indireto fluorescente de anticorpos. Adicionalmente, a identidade do baculovírus com ORF2 do PCV2 foi confirmada por seqüenciamento de aminoácido N-terminal. O MSV do baculovírus com ORF2 do PCV2 foi testado de novo quanto à pureza, de acordo com 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28 e 113.55. Cada baculovírus recombinante semeado nos frascos tipo *spinner* apresentou multiplicidades de infecção (MOIs) variadas. O Frasco 1 foi semeado com 7,52 ml de semente de 0,088 MOI; o frasco 2, com 3,0 ml de semente de 0,36 MOI; o frasco 3, com 1,5 ml de semente de 0,18 MOI e o frasco 4 com 0,75 ml de semente de 0,09 MOI. Um fluxograma esquemático, ilustrando as etapas básicas utilizadas para construir um baculovírus recombinante com ORF2 de PCV2 é fornecido aqui como a Figura 1.

Após terem sido semeados com o baculovírus, os frascos foram incubados, em seguida, a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias, além de serem agitados a 100 rpm durante esse período. Os frascos foram fechados com tampas ventiladas para permitir passagem de ar. Amostras de cada frasco foram coletadas a cada 24 horas durante os 7 dias seguintes. Após extração, cada amostra foi centrifugada e o pélete e o sobrenadante foram separados e microfiltrados, em seguida, através de uma membrana com tamanho de poro de 0,45 – 1,0 μm .

Em seguida, foi efetuada a quantificação de ORF2 presente nas amostras resultantes por meio de um ensaio por ELISA. O ensaio por ELISA foi conduzido com o anticorpo de captura anti-Prot.G de IgG Pab Suína de

PCV2 purificado (diluído 1:250 em PBS) diluído até 1:6000 em tampão Carbonato a 0,05 M (pH 9,6). 100 µl do anticorpo foram colocados, em seguida, nas cavidades da placa de microtitulação, incubada durante a noite a 37°C. A placa foi, em seguida, lavada três vezes com uma solução de lavagem que compreendia 0,5 ml de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100 ml de 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) e 899,5 ml de água destilada. Subseqüentemente, 250 µl de uma solução bloqueadora (5 g de leite desidratado sem gordura da marca Carnation (Nestle, Glendale, CA) em 10 ml de D-PBS QS até 100 ml com água destilada) foram acrescentados a cada cavidade. A próxima etapa foi lavar a placa de teste e, em seguida, adicionar antígeno pré-diluído. O antígeno pré-diluído foi produzido pela adição de 200 µl de solução diluente (0,5 ml de Tween 20 em 999,5 ml de D-PBS) a cada cavidade em uma placa de diluição. A amostra foi diluída, em seguida, na proporção de 1:240 e de 1:480, e 100 µl de cada uma destas amostras diluídas foram acrescentados a uma das cavidades superiores na placa de diluição (ou seja, uma cavidade superior recebeu 100 µl da diluição de 1:240 e a outra, 100 µl da diluição de 1:480). Diluições em série foram efetuadas, a seguir, com o restante da placa, removendo-se 100 µl de cada cavidade sucessiva e transferindo-os para a cavidade seguinte na placa. Cada cavidade foi misturada antes de ser efetuada a transferência seguinte. A lavagem da placa de teste incluiu três lavagens da placa com o tampão de lavagem. A placa foi lacrada, em seguida, e incubada por uma hora a 37°C antes de ser lavada três vezes mais com o tampão de lavagem. O anticorpo de detecção utilizado foi o anticorpo monoclonal contra ORF2 de PCV. Ele foi diluído até 1:300 em solução diluente, e 100 µl do anticorpo de detecção diluído foi adicionado, em seguida, às cavidades. A placa foi lacrada, em seguida, e incubada por uma hora a 37°C antes de ser lavada três vezes com o tampão de lavagem. O diluente conjugado foi preparado, em seguida, pela adição de soro normal de coelho (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) à solução diluente até concentração de 1%. O conjugado formado pelo anticorpo de Cabra anti-(H+I)-HRP de camundongo (Jackson Immunoresearch) foi diluído no diluente conjugado até 1:10.000. 100 µl do anticorpo conjugado dilu-

- ido foram acrescentados, em seguida, a cada cavidade. A placa foi lacrada, em seguida, e incubada por 45 minutos a 37°C antes de ser lavada três vezes com o tampão de lavagem. 100 µl do substrato (Substrato Peroxidase TMB, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), misturados com volume igual de Substrato Peroxidase B (KPL), foram acrescentados a cada cavidade. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. 100 µl de solução de HCl a 1 N foram acrescentados, em seguida, a todas as cavidades para interromper a reação. A placa foi submetida, em seguida, a leitura por ELISA. Os resultados deste ensaio são fornecidos na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1

Dia	Frasco	ORF2 em <i>pélete</i> (µg)	ORF2 em sobrenadante (µg)
3	1	47,53	12
3	2	57,46	22
3	3	53,44	14
3	4	58,64	12
4	1	43,01	44
4	2	65,61	62
4	3	70,56	32
4	4	64,97	24
5	1	31,74	100
5	2	34,93	142
5	3	47,84	90
5	4	55,14	86
6	1	14,7	158
6	2	18,13	182
6	3	34,78	140
6	4	36,88	146
7	1	6,54	176
7	2	12,09	190
7	3	15,84	158
7	4	15,19	152

Estes resultados indicam que, quando o tempo de incubação é estendido, a expressão de ORF2 no sobrenadante das células centrifugadas

e meio é maior do que no pélete das células centrifugadas e meio. De acordo com o mesmo, permitir que a expressão de ORF2 prossiga por, pelo menos, 5 dias, e a sua recuperação no sobrenadante, em vez de permitir que a expressão prossiga por menos de 5 dias e recuperar ORF2 das células, fornece um aumento maior em rendimentos de ORF2 e uma melhora significativa sobre métodos anteriores.

Exemplo 2

Este exemplo fornece dados sobre a eficácia da invenção reivindicada neste pedido. Um frasco tipo *spinner* de 1000 ml foi semeada com aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células Sf+ /ml em 300 ml de meio Excell 420. O frasco foi incubado, em seguida, a 27°C e agitado a 100 rpm. Subseqüentemente, o frasco foi semeado com 10 ml de vírus semente PCV2 ORF2/Bac p+6 (o baculovírus recombinante contendo o gene da ORF2 do PCV2, com 6 passagens adicionais nas células Sf9 de inseto) com 0,1 MOI, após 24 horas de incubação.

O frasco foi incubado, em seguida, a 27°C por, no total, 6 dias. Após a incubação, o frasco foi centrifugado e três amostras do sobrenadante resultante foram colhidas e inativadas. O sobrenadante foi inativado por elevação de sua temperatura até $37 \pm 2^\circ\text{C}$. À primeira amostra, foi acrescentada uma solução de 2-bromoetilamina hidrobrometo a 0,4 M, que tinha sido submetido à ciclização para etilenoimina binária (BEI) a 0,2 M em NaOH a 0,3 N, ao sobrenadante para fornecer uma concentração final de BEI de 5 mM. À segunda amostra, foi acrescentado BEI a 10 mM ao sobrenadante. À terceira amostra, não foi acrescentado BEI ao sobrenadante. As amostras foram agitadas, em seguida, continuamente por 48 horas. Foi acrescentada solução de tiosulfato de sódio a 1,0 M para fornecer uma concentração mínima final de 5 mM a fim de ser neutralizado qualquer BEI residual. A quantidade de ORF2 em cada amostra foi quantificada em seguida, empregando o mesmo procedimento de ensaio por ELISA, descrito no Exemplo 1. Na Tabela 2 abaixo, são apresentados os resultados deste ensaio.

Tabela 2

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

Este exemplo demonstra que a neutralização com BEI não remove ou degrada quantidades significativas da proteína da ORF2 do PCV2 produzida. Esse achado é evidenciado pelo fato de não haver perda grande de ORF2 no sobrenadante do BEI ou de temperaturas elevadas. Especialistas na técnica reconhecerão que a ORF2 recuperada é um produto protéico estável.

Exemplo 3

Este exemplo demonstra que a presente invenção permite a produção de ORF2 recombinante do PCV2 em escala pequena para produção em grande escala. $5,0 \times 10^5$ células/ml de células SF+/ml em 7000 ml de meio ExCell 420 foram plantadas em Biorreator Applikon de 20000 ml. O meio e as células foram incubados em seguida a 27°C e agitados a 100 RPM pelas próximas 68 horas. Na 68^a hora, 41,3 ml do MSV+3 do Baculovírus ORF2 PCV2 foram acrescentados a 7000 ml do meio ExCell 420. A mistura resultante foi acrescentada, em seguida, ao biorreator. Durante os sete dias seguintes, a mistura foi incubada a 27°C e agitada a 100 RPM. Foram extraídas amostras do biorreator a cada 24 horas, iniciando-se no 4^o dia, após infecção, e cada amostra foi centrifugada. O sobrenadante foi preservado e a quantidade de ORF2 foi quantificada em seguida, empregando densitometria por SDS-PAGE. Na Tabela 3 abaixo são apresentados os resultados dessa análise:

Tabela 3

Dia após infecção:	ORF2 em sobrenadante ($\mu\text{g/ml}$)
4	29,33
5	41,33
6	31,33
7	60,67

Exemplo 4

Este exemplo testa a eficácia de sete possíveis vacinas contra PCV2 e define ainda parâmetros de eficácia, após exposição a uma cepa virulenta de PCV2. Cento e oito (108) leitões, nascidos por cesariana e privados de colostro (CDCD), com 9-14 dias de vida foram divididos aleatoriamente em 9 grupos de mesmo tamanho. A Tabela 4 apresenta o Desenho Geral do Estudo para este Exemplo.

Tabela 4. Desenho Geral do Estudo

Grupo	Nº de porcos	Tratamento	Dia de tratamento	KLH/ICFA no Dia 21 e Dia 27	Provocação com PCV2 virulento no Dia 24	Necropsia no Dia 49
1	12	Vacina nº 1 contra PCV2 - (vORF2 16 µg)	0	+	+	+
2	12	Vacina nº 2 contra PCV2 - (vORF2 8 µg)	0	+	+	+
3	12	Vacina nº 3 contra PCV2 - (vORF2 4 µg)	0	+	+	+
4	12	Vacina nº 4 contra PCV2 - (rORF2 16 µg)	0	+	+	+
5	12	Vacina nº 5 contra PCV2 - (rORF2 8 µg)	0	+	+	+
6	12	Vacina nº 6 contra PCV2 - (rORF2 4 µg)	0	+	+	+

continuação

Grupo	Nº de porcos	Tratamento	Dia de tratamento	KLH/ICFA no Dia 21 e Dia 27	Provocação com PCV2 virulento no Dia 24	Necropsia no Dia 49
7	12	Vacina nº 7 contra PCV2 - (Célula completa de vírus morto)	0	+	+	+
8	12	Nenhum – Controles de provocação	N/A	+	+	+
9	12	Nenhum – Grupo de estrito controle negativo	N/A	+	-	+

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

5 Sete dos grupos (Grupos 1 - 7) receberam doses de polipeptídeo da ORF2 do PCV2, um dos grupos atuou como controle de provocação e não recebeu ORF2 de PCV2 e um outro grupo atuou como o grupo de estrito controle negativo e também não recebeu ORF2 de PCV2. No Dia 0, os Grupos de 1 a 7 foram tratados com as vacinas designadas. Leitões no Grupo 7 receberam tratamento de reforço no Dia 14. Os leitões foram observados
10 quanto a eventos adversos e reações no local da injeção após a vacinação e no Dia 19, sendo transferidos para o segundo centro do estudo. No segundo centro do estudo, os Grupos 1-8 foram abrigados em um prédio, enquanto que o Grupo 9 foi acomodado em um prédio separado. Todos os porcos receberam hemocianina do molusco *keyhole limpet* (KLH)/adjuvante incompleto de Freund (ICFA) nos Dias 21 e 27, e no Dia 24, os Grupos 1-8 foram
15 provocados com um PCV2 virulento.

Foram coletadas amostras de sangue, pré e pró-provocação, para sorologia do PCV2. Após a provocação, foram coletados dados de peso corporal para determinação de ganho médio diário de peso (GMDP) e sintomas clínicos, bem como amostras de *swab* nasal para determinação de descarga nasal de PCV2. No Dia 49, todos os porcos sobreviventes foram necropsiados, os pulmões foram pontuados quanto a lesões e tecidos selecionados foram conservados em formalina para realização de testes de Imuno-histoquímica (IHQ) em data posterior.

25 Materiais e Métodos

Este foi um estudo parcialmente cego de viabilidade de vacinação-provocação, conduzido em porcos CDCD de 9 a 14 dias de vida no Dia 0. Para serem incluídas no estudo, títulos de PCV2 por IFA de porcas foram $\leq 1:1000$. Adicionalmente, o status sorológico das porcas era de uma manada conhecida de PPRS negativo. Vinte e oito (28) porcas foram testadas
30 quanto ao status sorológico para PCV2. Quatorze (14) porcas apresentaram título de PCV2 ≤ 1000 e foram transferidas para o primeiro centro do estudo.

Cento e dez (110) leitões nasceram por cirurgias por corte de cesariana e foram disponibilizados para este estudo no Dia -4. No Dia -3, 108 porcos CDCD, no primeiro centro do estudo, foram pesados, identificados com etiquetas na orelha, agrupados por peso e designados aleatoriamente para 1 dos 9 grupos, conforme apresentado na tabela 4. Em relação a animais em teste que atenderam aos critérios de inclusão e foram incluídos no estudo, porém excluídos mais tarde por qualquer motivo, o Investigador e Monitor efetuaram consultas para determinar o uso dos dados coletados do animal na análise final. Os dados destes animais incluídos foram excluídos e o motivo para exclusão foi documentado. Inicialmente, nenhuma porca foi excluída. No total, 108 de 110 porcos disponíveis foram designados aleatoriamente para um dos 9 grupos no Dia -3. Os dois porcos menores (N^{os} 17 e 19) não foram designados para um grupo e ficaram disponíveis como extras, se necessário. Durante o transcurso do estudo, vários animais foram retirados. O Porco 82 (Grupo 9) no Dia -1, Porco n^o 56 (Grupo 6) no Dia 3, Porco n^o 53 (Grupo 9) no Dia 4, Porco n^o 28 (Grupo 8) no Dia 8, Porco n^o 69 (Grupo 8) no Dia 7 e Porco n^o 93 (Grupo 4) no Dia 9, foram, cada um, encontrados mortos antes da provocação. Estes seis porcos não foram incluídos nos resultados finais do estudo. O Porco n^o 17 (um dos porcos extras) foi designado para o Grupo 9. O outro porco extra, porco n^o 19, foi excluído do estudo.

As fórmulas fornecidas para cada um dos grupos foram as seguintes: O Grupo 1 foi designado para administração de 1 ml de ORF2 viral (vORF2), contendo 16 µg de ORF2/ml. Isso foi efetuado pela mistura de 10,24 ml de ORF2 viral (256 µg/25 µg/ml = 10,24 ml de vORF2) com 3,2 ml de Carbopol a 0,5% e 2,56 ml de solução salina com tampão fosfato e pH de 7,4. O resultado foi 16 ml da fórmula para o grupo 1. O Grupo 2 foi designado para administração de 1 ml de vORF2, contendo 8 µg de vORF2/ml. Isso foi efetuado pela mistura de 5,12 ml de vORF2 (128 µg/25 µg/ml = 5,12 ml de vORF2) com 3,2 ml de Carbopol a 0,5% e 7,68 ml de solução salina com tampão fosfato e pH de 7,4. O resultado foi 16 ml da fórmula para o grupo 2. O Grupo 3 foi designado para administração de 1 ml de vORF2, contendo 4 µg de vORF2/ml. Isso foi efetuado pela mistura de 2,56 ml de vORF2 (64

$\mu\text{g}/25 \mu\text{g}/\text{ml} = 2,56 \text{ ml}$ de vORF2) com 3,2 ml de Carbopol a 0,5% e 10,24 ml de solução salina com tampão fosfato e pH de 7,4. O resultado foi 16 ml da fórmula para o grupo 3. O Grupo 4 foi designado para administração de 1 ml de ORF2 recombinante (rORF2), contendo 16 μg de rORF2/ml. Isso foi efetuado pela mistura de 2,23 ml de rORF2 ($512 \mu\text{g}/230 \mu\text{g}/\text{ml} = 2,23 \text{ ml}$ de rORF2) com 6,4 ml de Carbopol a 0,5% e 23,37 ml de solução salina com tampão fosfato e pH de 7,4. O resultado foi 32 ml da fórmula para o grupo 4. O Grupo 5 foi designado para administração de 1 ml de rORF2, contendo 8 μg de rORF2/ml. Isso foi efetuado pela mistura de 1,11 ml de rORF2 ($256 \mu\text{g}/230 \mu\text{g}/\text{ml} = 1,11 \text{ ml}$ de rORF2) com 6,4 ml de Carbopol a 0,5% e 24,49 ml de solução salina com tampão fosfato e pH de 7,4. O resultado foi 32 ml da fórmula para o grupo 5. O Grupo 6 foi designado para administração de 1 ml de rORF2, contendo 8 μg de rORF2/ml. Isso foi efetuado pela mistura de 0,56 ml de rORF2 ($128 \mu\text{g}/230 \mu\text{g}/\text{ml} = 0,56 \text{ ml}$ de rORF2) com 6,4 ml de Carbopol a 0,5% e 25,04 ml de solução salina com tampão fosfato e pH de 7,4. O resultado foi 32 ml da fórmula para o grupo 6. O Grupo 5 foi designado para administração de 2 ml de vacina com célula inteira de PCV2 morto (PCV2 KV), contendo o MAX de PCV2 KV. Isso foi efetuado pela mistura de 56 ml of PCV2 KV com 14 ml de Carbopol a 0,5%. O resultado foi 70 ml of da fórmula para o grupo 7. Finalmente, o grupo 8 foi designado para administração de KLH em 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ou 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por dose de 2 ml. Isso foi efetuado pela mistura de 40,71 ml de KLH (7,0 μg de proteína/ml em 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml} = 570 \text{ ml}$ ($7,0 \mu\text{g}/\text{ml})(x) = (0,5)(570 \text{ ml})$), 244,29 ml de solução salina com tampão fosfato e pH de 7,4 e 285 ml de adjuvante de Freund. A Tabela 5 descreve os cronogramas para as principais atividades deste Exemplo.

Tabela 5. Atividades do estudo

Dia do estudo	Atividade do estudo
-4, 0 a 49	Observações gerais quanto à saúde geral e sintomas clínicos
-3	Pesagem; Randomização para grupos; Coleta de amostras de sangue de todos os porcos
0	Exame de saúde; Administração de IVP N ^{os} 1-7 aos Grupos 1-7, respectivamente
0-7	Observação dos porcos quanto a reações no local da injeção
14	Reforço do Grupo 7 com Vacina contra PCV2 N ^o 7; Coleta de amostras de sangue de todos os porcos
14-21	Observação do Grupo 7 quanto a reações no local da injeção
16-19	Tratamento de todos os porcos com antibióticos (dados faltando)
19	Transporte dos porcos do primeiro centro de teste para o segundo centro de teste
21	Tratamento dos Grupos 1-9 com KLH/ICFA
24	Coleta de amostras de sangue e de <i>swab</i> nasal de todos os porcos; Pesagem de todos os porcos; Provocação dos Grupos 1-8 com material de provocação contendo PCV2
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47	Coleta de amostras de <i>swab</i> nasal de todos os porcos
27	Tratamento dos Grupos 1-9 com KLH/ICFA

continuação

31	Coleta de amostras de sangue de todos os porcos
49	Coleta de amostras de sangue e de <i>swab</i> nasal de todos os porcos; Pesagem de todos os porcos; Necropsia de todos os porcos; Anotação de lesões macroscópicas com ênfase em icterícia e úlceras gástricas; Avaliação de pulmões quanto a lesões; Coleta de amostras de tecido fresco e fixado em formalina; Conclusão da fase em vida do estudo

Após a conclusão da fase em vida do estudo, tecidos fixados em formalina foram examinados por Imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de antígeno do PCV2 por um patologista, amostras de sangue foram avaliadas quanto à sorologia para PCV2, amostras de swab nasal foram avaliadas quanto à descarga de PCV2 e o ganho médio diário de peso (GMDP) foi determinado desde o Dia 24 ao Dia 49.

Os animais foram abrigados no primeiro centro do estudo em jaulas individuais em cinco salas, desde o nascimento até aproximadamente 11 dias de vida (aproximadamente Dia 0 do estudo). Cada sala tinha disposição idêntica e consistiu em pilhas de jaulas de aço inoxidável com ar aquecido e filtrado, suprido separadamente para cada unidade de isolamento. Cada sala tinha aquecimento e ventilação separados e, pelo menos, foi impedida contaminação cruzada de ar entre as salas. Os animais foram abrigados em dois prédios diferentes, no segundo centro do estudo. O Grupo 9 (o grupo de estrito controle negativo) foi abrigado separadamente em um prédio de acabamento convertido, e os Grupos, em um prédio de viveiro convertido. Cada grupo foi abrigado em cercado separado (11-12 porcos por cercado), e em cada cercado fornecido com aproximadamente 0,28 m² (3,0 pés quadrados) por porco. Cada cercado estava sobre um deque elevado com piso feito de plástico. Um fosso abaixo dos cercados serviu como tanque para conter excrementos e resíduos. Cada prédio possuía os seus próprios sistemas separados de aquecimento e ventilação, com pouca possibilidade de contaminação cruzada entre os prédios.

No primeiro centro do estudo, os leitões foram alimentados com ração de leite especialmente formulada desde o nascimento até aproximadamente 3 semanas de vida. Próximo ao Dia 19, todos os leitões consumiram ração sólida misturada especial (aproximadamente com 4 semanas e ½ de vida). No segundo centro do estudo, todos os leitões foram alimentados com ração mista comercial de prescrição livre, própria para a sua idade e peso, *ad libitum*. Em ambos os centros, foi fornecida água *ad libitum*.

Todos os porcos em teste foram tratados com Vitamina E no Dia -2, com injeções de ferro no Dia -1 e com NAXCEL® (1,0 ml, IM, em patas alternadas) nos Dias 16, 17, 18 e 19. Além disso, o Porco nº 52 (Grupo 9) foi tratado com injeção de ferro no Dia 3; o Porco nº 45 (Grupo 6) foi tratado com injeção de ferro no Dia 11, o Porco nº 69 (Grupo 8) foi tratado com NAXCEL® no Dia 6, o Porco nº 74 (Grupo 3) foi tratado com dexametazona e penicilina Dia 14 e o Porco nº 51 (Grupo 1) foi tratado com dexametazona e penicilina no Dia 13 e com NAXCEL® no Dia 14, por vários motivos de saúde.

Enquanto estiveram em ambos os centros de estudo, os porcos ficam sob cuidado veterinário. Foram conduzidos exames de saúde nos animais no Dia 0, e registrados na Ficha de Registro de Exame de Saúde. Antes da vacinação, todos os animais apresentavam boa saúde e estado nutricional, conforme determinados por observação no Dia 0. Foi observado que todos os animais apresentavam boa saúde e estado nutricional antes de ser conduzida a provocação. As carcaças e tecidos foram dispostos por apresentação. A disposição final dos animais do estudo foi registrada no Registro de Disposição do Animal.

No Dia 0, porcos designados para os Grupos 1-6 receberam 1,0 ml de Vacinas 1-6 contra PCV2, respectivamente, IM na região esquerda do pescoço, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x ½". Porcos designados para o Grupo 7 receberam 2,0 ml de Vacina nº 7 contra PCV2, IM na região esquerda do pescoço, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x ½". No Dia 14, porcos designados para o Grupo 7 receberam 2,0 ml de

Vacina nº 7 contra PCV2, IM na região direita do pescoço, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x ½".

No Dia 21, todos os porcos em teste receberam 2,0 ml de K-LH/ICFA IM, na pata direita, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x ½". No Dia 27, todos os porcos em teste receberam 2,0 ml de K-LH/ICFA IM, na pata esquerda, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x 1".

No Dia 24, porcos designados para os 1-8 receberam 1,0 ml de material de provocação ISUVDL de PCV2 (5,11 log₁₀ TCID₅₀/ml) IM, na região esquerda do pescoço, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x 1". 1,0 ml adicional do mesmo material foi administrado IN para cada porco (0,5 ml por narina), empregando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e cânula nasal.

Os porcos em testes foram observados diariamente quanto à saúde geral e eventos adversos, no Dia -4 e a partir do Dia 0 ao Dia 19. As observações foram registradas no Registro de Observação Clínica. Todos os porcos em testes foram observados do Dia 0 ao Dia 7, e o Grupo 7 foi observado ainda do Dia 14 ao 21, quanto às reações no local da injeção. O ganho médio diário de peso foi determinado por pesagem de cada porco em balança calibrada nos Dias -3, 24 e 49, ou no dia em que um porco era encontrado morto após provocação. Os pesos corporais foram registrados na Ficha de Peso Corporal. O peso corporal do Dia -3 foi utilizado para bloquear a inclusão de porcos antes de randomização. Os dados de peso do Dia 24 e Dia 49 foram utilizados para determinar o ganho médio diário de peso (GMDP), de cada porco, durante estes intervalos de tempo. Para porcos que morreram após provocação e antes do Dia 49, o GMDP foi ajustado para representar o GMDP do Dia 24 até o dia da morte.

A fim de determinar a sorologia para PCV2, foi coletado sangue venoso total de cada leitão do seio venoso orbital, nos Dias -3 e 14. De cada leitão, foi coletado sangue do seio venoso orbital por inserção de tubo capilar estéril no canto médio de um dos olhos e drenagem de aproximadamente 3,0 ml de sangue total, em Tubo Separador de Soro de 4,0 ml (SST).

Nos Dias 24, 31 e 49, foi coletado sangue venoso total de cada porco da veia cava anterior, utilizando agulha Vacutainer estéril de 18 g x 1 ½" (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey), um suporte de agulha Vacutainer e um SST de 13 ml. As coletas de sangue em cada intervalo de tempo foram registradas no Registro de Coleta de Sangue. Depois de ter sido permitido que o sangue, contido em cada SST, coagulasse, cada SST foi virado para baixo e o soro, recolhido. O soro recolhido foi transferido para um tubo estéril de pressão negativa e armazenado a -70 ± 10 °C até ser testado em data posterior. Amostras de soro foram testadas quanto à presença de anticorpos contra PCV2 pelo pessoal do departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da BIVI.

Os porcos foram observados uma vez ao dia, do Dia 20 ao Dia 49, quanto a sintomas clínicos, sendo as observações clínicas registradas no Registro de Observação Clínica.

A fim de testar descarga nasal de PCV2, nos Dias 24, 25 e, em seguida a cada dia ímpar do estudo até e incluindo o Dia 49, um *swab* estéril de dacron foi inserido, por via intranasal na narina esquerda ou direita de cada porco (um *swab* por porco), tão assepticamente quanto possível, girado por alguns segundos e, em seguida, retirado. Cada *swab* foi, em seguida, colocado em um tubo estéril com tampa de pressão, contendo 1,0 ml de meio EMEM com IFBS a 2%, 500 unidades/ml de Penicilina, 500 µg/ml de Estreptomicina e 2,5 µg/ml de Fungizona. O *swab* foi quebrado dentro do tubo de pressão negativa, sendo este lacrado e devidamente identificado com o número do animal, o número do estudo, a data de coleta, o dia do estudo e "*swab* nasal". Tubos de pressão negativa lacrados foram armazenados a -40 ± 10 °C até serem transportados durante a noite em gelo para BIVI-St. Joseph. As coletas de *swab* nasal foram registradas na Ficha de Coleta de Amostra de *Swab* Nasal. O departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da BIVI conduziu os testes quantitativos de isolamento de vírus (VI) para PCV2, em amostras de *swab* nasal. Os resultados são expressos em valores de \log_{10} . Valores de 1,3 logs ou menores foram considerados negativos e qualquer valor acima de 1,3 logs foi considerado positivo.

Porcos que morreram (N^{os} 28, 52, 56, 69, 82 e 93), no primeiro centro do estudo, foram necropsiados ao nível necessário para determinar um diagnóstico. Lesões macroscópicas foram registradas e os tecidos destes porcos foram descartados. No segundo centro do estudo, porcos cuja morte foi anterior ao Dia 49 (N^{os} 45, 23, 58, 35), porcos encontrados mortos no Dia 49 antes de ser conduzida eutanásia (N^{os} 2, 43) e porcos sacrificados no Dia 49 foram submetidos à necropsia. Lesões macroscópicas foram anotadas e os percentuais de lobos pulmonares com lesões foram registrados na Ficha de Relatório de Necropsia.

De cada um dos 103 porcos necropsiados no segundo centro do estudo, uma amostra de tecido de narina, pulmão, coração, fígado, linfonodo mesentérico, rim e de linfonodo inguinal foram colocadas em um único recipiente com formalina a 10% tamponada, enquanto que uma outra amostra de tecido dos mesmos órgãos foi colocada em saco plástico *Whirl-pak* (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino Unido) e cada *Whirl-pak* foi colocado em gelo. Cada recipiente foi devidamente identificado. Coletas de amostras foram registradas na Ficha de Relatório de Necropsia. Posteriormente, amostras de tecidos fixadas em formalina e uma Ficha de Solicitação De Diagnóstico foram submetidas para testes de IHQ. Os testes de IHQ foram conduzidos de acordo com os procedimentos laboratoriais padrão do ISU de amostras recebidas, preparo de amostra e slide e técnicas de coloração. Tecidos frescos em *Whirl-paks* foram enviados em sacos de gelo para o Monitor do Estudo para armazenamento (-70 ° ± 10 °C) e possível uso futuro. Tecidos fixados em formalina foram examinados por um patologista para detecção de PCV2 por IHQ e classificados utilizando o seguinte sistema de pontuação: 0 = Nenhuma; 1 = Escassa coloração positiva, poucos sítios; 2 = Coloração positiva moderada, múltiplos sítios; e 3 = Coloração positiva abundante difusa em todo o tecido. Em decorrência de LN inguinal de LN mesentérico não poder ser diferenciado positivamente pelo patologista, os resultados para estes tecidos foram identificados simplesmente como Linfonodo, e a pontuação foi fornecida para a pontuação mais alta para cada um destes dois tecidos por animal.

Resultados

Os resultados para este exemplo são fornecidos abaixo. Segundo anotações, um porco do Grupo 9 morreu antes do Dia 0, e 5 outros porcos morreram após a vacinação (1 porco do Grupo 4; 1 porco do Grupo 6; 2 porcos do Grupo 8 e porco do Grupo 9). O exame pós-morte indicou que todos os seis morreram em decorrência de infecções subjacentes que não foram associadas à vacinação ou a PMWS. Adicionalmente, não foram observados eventos adversos ou reações no local da injeção em quaisquer grupos.

Os resultados de ganho médio diário de peso (GMDP) são apresentados abaixo na Tabela 6. O Grupo 9, o grupo de estrito controle negativo, apresentou o GMDP mais alto ($1,06 \pm 0,17$ libras/dia), seguido pelo Grupo 5 ($0,94 \pm 0,22$ libra/dia), o qual recebeu uma dose de 8 μg de rORF2. O Grupo 3 que recebeu uma dose de 4 μg e vORF2, apresentou o GMDP mais baixo ($0,49 \pm 0,21$ libra/dia), seguido pelo Grupo 7 ($0,50 \pm 0,15$ libra/dia), o qual recebeu 2 doses de vacina com vírus morto.

Tabela 6. Resumo de Ganho Médio Diário de Peso (GMDP) dos Grupos

Grupo	Tratamento	N	GMDP – libras/dia (Dia 24 ao Dia 49) ou ajustado para porcos mortos antes do Dia 29
1	vORF2 - 16 μg (1 dose)	12	$0,39 \pm 0,13$ ks ($0,87 \pm 0,29$ libra)/dia
2	vORF2 – 8 μg (1 dose)	12	$0,32 \pm 0,15$ ks ($0,70 \pm 0,32$ libra)/dia
3	vORF2 – 4 μg (1 dose)	12	$0,22 \pm 0,09$ ($0,49 \pm 0,21$ libra)/dia
4	rORF2 - 16 μg (1 dose)	11	$0,38 \pm 0,14$ ks ($0,84 \pm 0,30$ libra)/dia
5	rORF2 - 8 μg (1 dose)	12	$0,43 \pm 0,10$ ks ($0,94 \pm 0,22$ libra)/dia
6	rORF2 - 4 μg (1 dose)	11	$0,33 \pm 0,11$ ks ($0,72 \pm 0,25$ libra)/dia
7	KV (2 doses)	12	$0,23 \pm 0,07$ ks ($0,50 \pm 0,15$ libra)/dia
8	Controles de provocação	10	$0,34 \pm 0,09$ ks ($0,76 \pm 0,19$ libra)/dia
9	Estrito controle negativo	11	$0,48 \pm 0,08$ ks ($1,06 \pm 0,17$ libra)/dia

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

Os resultados de sorologia para PCV2 são apresentados abaixo na Tabela 7. Todos os nove grupos foram soronegativos para PCV2 no Dia -3. No Dia 14, os Grupos que receberam vacinas com vORF2 apresentaram os títulos mais altos, os quais variaram de 187,5 a 529,2. Porcos que receberam vacina com vírus morto apresentaram os títulos seguintes mais altos, seguidos pelos grupos que receberam vacinas com rORF2. Os Grupos 8 e 9 permaneceram soronegativos neste momento. No Dia 24 e Dia 31, porcos que receberam vacinas com vORF2 continuaram a demonstrar forte resposta sorológica, seguidos de perto pelo grupo que recebeu duas doses de vacina com vírus morto. Porcos que receberam vacinas com rORF2 foram mais lentos em apresentar resposta sorológica, e os Grupos 8 e 9 continuaram sendo soronegativos. No Dia 49, porcos que receberam vacina com vORF2, 2 doses da vacina com vírus morto e a dose mais baixa de rORF2 exibiram as respostas sorológicas mais fortes. Porcos que receberam 16 µg e 8 µg de vacinas com rORF2 apresentaram títulos de IFA ligeiramente mais altos do que os de controles de provocação. O Grupo 9, no Dia 49, exibiu forte resposta sorológica.

Tabela 7. Resumo de Títulos de PCV2 por IFA dos Grupos

Título médio de IFA

Grupo	Tratamento	Dia -3	Dia 14	Dia 24	Dia 31**	Dia 49***
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	50,0	529,2	4400,0	7866,7	11054,5
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	50,0	500,0	3466,7	6800,0	10181,8
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	50,0	187,5	1133,3	5733,3	9333,3
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	50,0	95,5	1550,0	3090,9	8000,0
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	50,0	75,0	887,5	2266,7	7416,7

continuação

6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	50,0	50,0	550,0	3118,2	10570,0
7	KV (2 doses)	50,0	204,2	3087,5	4620,8	8680,0
8	Controles de pro- vocação	50,0	55,0	50,0	50,0	5433,3
9	Estrito controle negativo	50,0	59,1	59,1	54,5	6136,4

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

- 5 *Para fins de cálculo, um título ≤ 100 por IFA foi designado como um título de "50"; um título ≥ 6400 por IFA foi designado como um título de "12.800".

**Dia de Provocação

***Dia de Necropsia

- 10 Os resultados das observações clínicas pós-provocação são apresentados abaixo na Tabela 8. Este resumo de resultados inclui observações quanto a Comportamento Anormal, Respiração Anormal, Tosse e Diar-
rêia. A Tabela 9 inclui os resultados do Resumo de Incidência Geral de Sin-
tomas Clínicos dos Grupos, e a Tabela 10 inclui resultados do Resumo de
15 Taxas de Mortalidade Pós-Provocação dos Grupos. O sintoma clínico mais
comum anotado neste estudo foi comportamento anormal, o qual foi classifi-
cado de letargia discreta à grave. Porcos que receberam as duas doses
mais baixas de vORF2, porcos que receberam 16 µg de rORF2 e porcos que
receberam duas doses de vacina de KV apresentaram taxas de incidência \geq
27,3%. Porcos que receberam 8 µg de rORF2 e o grupo de estrito controle
20 negativo não apresentaram comportamento anormal. Nenhum dos porcos
neste estudo exibiu respiração anormal. A tosse foi observada, freqüente-
mente, em todos os grupos (0 a 25%), da mesma forma que diarreia (0 -
20%). Nenhum sintoma clínico observado foi patognômico de PMWS.

- 25 A incidência geral de sintomas clínicos variou entre os grupos. Grupos que receberam qualquer uma das vacinas com vORF2, o grupo que
recebeu 16 µg de rORF2, o grupo que recebeu 2 doses de vacina de KV e o
grupo de controle de provocação apresentaram a incidência mais alta de

sintomas clínicos no geral ($\geq 36,4\%$). O grupo de estrito controle negativo, o grupo que recebeu 8 μg de rORF2 e o grupo que recebeu 4 μg de rORF2 apresentaram taxas de incidência geral de sintomas clínicos de 0%, 8,3% e 9,1%, respectivamente.

- 5 No geral, as taxas de mortalidade entre os grupos variaram também. O grupo que recebeu 2 doses de vacina com KV apresentou a taxa de mortalidade mais alta (16,7%); enquanto que grupos que receberam 4 μg de vORF2, 16 μg de rORF2 ou 8 μg de rORF2 e o grupo de estrito controle negativo apresentaram, todos, taxas de mortalidade de 0%.

10 Tabela 8. Resumo de Observações nos Grupos de Comportamento Anormal, Respiração Anormal, Tosse e Diarréia

Grupo	Tratamento	N	Comportamento anormal ¹	Respiração anormal ²	Tosse ³	Diarréia ⁴
1	vORF2 - 16 μg (1 dose)	12	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)
2	vORF2 - 8 μg (1 dose)	12	4/12 (33,3%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	1/12 (8,3%)
3	vORF2 - 4 μg (1 dose)	12	8/12 (66,7%)	0/12 (0%)	2/12 (16,7%)	1/12 (8,3%)
4	rORF2 - 16 μg (1 dose)	11	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
5	rORF2 - 8 μg (1 dose)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)
6	rORF2 - 4 μg (1 dose)	11	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 doses)	12	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)
8	Controles de Provocação	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	Estrito Controle Negativo	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

- 15 ¹Número total de porcos em cada grupo que exibiu comportamento anormal

por, pelo menos 1 dia

²Número total de porcos em cada grupo que exibiu respiração anormal por, pelo menos 1 dia

5 ³Número total de porcos em cada grupo que exibiu tosse por, pelo menos 1 dia

⁴Número total de porcos em cada grupo que exibiu diarréia por, pelo menos 1 dia

Tabela 9. Resumo de Incidência Geral nos Grupos de Sintomas Clínicos

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

10 vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

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

Tabela 10. Resumo de Taxas de Mortalidade Pós-Provocação dos Grupos

Grupo	Tratamento	N	Mortos pós-provocação	Taxa de mortalidade
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	1	8,3%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8,3%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	0	0%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	0	0%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	0	0%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1	9,1%
7	KV (2 doses)	12	2	16,7%
8	Controles de Provocação	10	1	10%
9	Estrito Controle Negativo	11	0	0%

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

- 5 Resultados de descarga nasal de PCV2 são apresentados abaixo na Tabela 11. Após provocação no Dia 24, 1 porco no Grupo 7 começou a apresentar descarga de PCV2 no Dia 27. Nenhum dos outros porcos apresentou descarga até o Day 33. A maior parte da descarga nasal foi observada do Dia 35 ao Dia 45. Grupos que receberam qualquer uma das três vacinas com vORF2 e grupos que receberam 4 ou 8 µg de rORF2 apresentaram a incidência mais baixa de descarga nasal de PCV2 ($\leq 9,1\%$). O grupo de controle de provocação (Grupo 8) apresentou a taxa mais alta de descarga (80%), seguido pelo grupo de estrito controle negativo (Grupo 9), o qual apresentou taxa de incidência de 63,6%.
- 10

Tabela 11. Resumo de Incidência dos Grupos de Descarga Nasal de PCV2

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que apresentou descarga por pelo menos 1 dia	Taxa de incidência
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	1	8,3%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8,3%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	1	8,3%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	2	18,2%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	1	8,3%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	1	9,1%
7	KV (2 doses)	12	5	41,7%
8	Controles de Provocação	10	8	80%
9	Estrito Controle Negativo	11	7	63,6%

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

5 O Resumo de Incidência de Icterícia dos Grupos, Incidência de Úlceras Gástricas dos Grupos, Pontuações Médias de Lesões Pulmonares dos Grupos e de Incidência de Lesões Pulmonares dos Grupos são exibidos abaixo na Tabela 12. Seis porcos morreram, no primeiro centro do estudo, durante a fase pós-vacinação do estudo (Grupo 4, N = 1; Grupo 6, N = 1; 10 Grupo 8, N = 2; Grupo 9, N = 2). Quatro dos seis porcos apresentaram lesões fibrinosas em uma ou mais cavidades do corpo, um porco (Grupo 6) apresentou lesões compatíveis com doença por clostrídios e um porco (Grupo 9) não exibiu lesões macroscópicas. Nenhum dos porcos que morreram durante a fase pós-vacinação do estudo apresentou lesões compatíveis com 15 PMWS.

Porcos que morreram após a provocação e porcos sacrificados no Dia 49 foram necropsiados. Na necropsia, não foi observada icterícia e úlceras gástricas em qualquer grupo. Em relação a % médio de lesões pulmonares, o Grupo 9 exibiu o % médio mais baixo de lesões pulmonares

(0%), seguido pelo Grupo 1 com $0,40 \pm 0,50\%$ e o Grupo 5 com $0,68 \pm 1,15\%$. Os Grupos 2, 3, 7 e 8 exibiram o % médio mais alto de lesões pulmonares ($\geq 7,27\%$). Cada um destes quatro grupos continha um porco com % de lesões pulmonares $\geq 71,5\%$, desviando os resultados destes quatro grupos e tornando-os mais altos. Com exceção do Grupo 9 com 0% de lesões pulmonares anotadas, os demais 8 grupos apresentaram $\leq 36\%$ de lesões pulmonares. Quase todas as lesões pulmonares anotadas foram descritas como vermelhas/púrpuras e consolidadas.

5
10 Tabela 12. Resumo de Incidência de Icterícia dos Grupos, Incidência de Úlceras Gástricas dos Grupos, % Médio dos Grupos de Pontuações de Lesões Pulmonares e Incidência dos Grupos de Lesões Pulmonares Anotadas

Grupo	Tratamento	Icterícia	Úlceras gástricas	% médio de lesões pulmonares	Incidência de lesões pulmonares anotadas
1	vORF2 - 16 μg (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,40 \pm 0,50%	10/12 (83%)
2	vORF2 - 8 μg (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,41 \pm 20,2%	10/12 (83%)
3	vORF2 - 4 μg (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	9,20 \pm 20,9%	10/12 (83%)
4	rORF2 - 16 μg (1 dose)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	1,5 \pm 4,74%	4/11 (36%)
5	rORF2 - 8 μg (1 dose)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,68 \pm 1,15%	9/12 (75%)
6	rORF2 - 4 μg (1 dose)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2,95 \pm 5,12%	7/11 (64%)
7	KV (2 doses)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,27 \pm 22,9%	9/12 (75%)
8	Controles de Provocação	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9,88 \pm 29,2%	8/10 (80%)
9	Estrito Controle Negativo	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus

recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

O Resumo de Incidência de resultados positivos por IHQ dos Grupos é apresentado na Tabela 13. O Grupo 1 (vORF2 - 16 µg) e o Grupo 5 (rORF2 - 8 µg) apresentaram a taxa mais baixa de resultados positivos de IHQ (16,7%). O Grupo 8 (Controles de Provocação) e o Grupo 9 (Estrito Controle Negativo) apresentaram a taxa mais alta de resultados positivos por IHQ, 90% e 90,9%, respectivamente.

Tabela 13. Resumo de Taxa de Incidência de IHQ positiva dos Grupos

Grupo	Tratamento	N	N de porcos que apresentou pelo menos um tecido positivo para PCV2	Taxa de incidência
1	vORF2 - 16 µg (1 dose)	12	2	16,7%
2	vORF2 - 8 µg (1 dose)	12	3	25,0%
3	vORF2 - 4 µg (1 dose)	12	8	66,7%
4	rORF2 - 16 µg (1 dose)	11	4	36,3%
5	rORF2 - 8 µg (1 dose)	12	2	16,7%
6	rORF2 - 4 µg (1 dose)	11	4	36,4%
7	KV (2 doses)	12	5	41,7%
8	Controles de Provocação	10	9	90,0%
9	Estrito Controle Negativo	11	10	90,9%

10 vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

15 Após provocação, o Grupo 5, que recebeu uma dose de 8 µg de antígeno de rORF2, apresentou desempenho superior ao dos outros 6 grupos de vacinas. O Grupo 5 exibiu o GMDP mais alto $0,43 \pm 0,010$ ks/dia ($0,94 \pm 0,22$ libra/dia), a incidência mais baixa de comportamento anormal (0%), a segunda incidência mais baixa de tosse (8,3%), a incidência mais baixa de sintomas clínicos em geral (8,3%), a taxa de mortalidade mais baixa (0%), a taxa mais baixa de descarga nasal de PCV2 (8,3%), a segunda

taxa mais baixa para % médio de lesões pulmonares ($0,68 \pm 1,15\%$) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos positivos (16,7%). Grupos que receberam vários níveis de antígeno de rORF2 exibiram desempenho superior no geral ao de grupos que receberam vários níveis de vORF2, e o do grupo que recebeu 2 doses de vacina contendo célula completa de PCV2 morto teve o pior desempenho. As Tabelas 14 e 15 contêm resumos de dados pós-provocação dos grupos.

Tabela 14. Resumo de dados pós-provocação dos grupos - Parte 1

Grupo	N	Tratamento	GMDP KS/dia (lilbra /dia)	Comportamento anormal	Tosse	Incidência global de sintomas clínicos
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dose)	00,39 ± 0,13 (0,87 ± 0,29)	2/12 (16,7%)	3/12 (25%)	41,7%
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dose)	0,32 ± 0,15 (0,70 ± 0,32)	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)	41,7%
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dose)	0,22 ± 0,01 (0,49 ± 0,21)	8/12 (66,7%)	2/12 (16,7%)	66,7%
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dose)	0,38 ± 0,14 (0,84 ± 0,30)	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	36,4%
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dose)	0,43 ± 0,10 (0,94 ± 0,22)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	8,3%
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dose)	0,43 ± (0,72 ± 0,25)	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	9,1%
7	12	KV (2 doses)	0,23 ± 0,07 (0,50 ± 0,15)	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	58,3%
8	10	Controles de Provocação	0,34 ± 0,09 (0,76 ± 0,19)	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40%

continuação

Grupo	N	Tratamento	GMDP (libra /dia)	Comportamento anormal	Tosse	Incidência global de sintomas clínicos
9	11	Estrito Controle Negativo	0,48 ± 0,08 (1,06 ± 0,17)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0%

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto =

Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

Tabela 15. Resumo de dados pós-provocação dos grupos - Parte 2

Grupo	N	Tratamento	Taxa de mortalidade	Descarga nasal	% médio de lesões pulmonares	Taxa de incidência de pelo menos um tecido positivo por IHQ para PCV2
1	12	vORF2 - 16 µg (1 dose)	8,3%	8,3%	0,40 ± 0,50%	16,7%
2	12	vORF2 - 8 µg (1 dose)	8,3%	8,3%	7,41 ± 20,2%	25,0%
3	12	vORF2 - 4 µg (1 dose)	0%	8,3%	9,20 ± 20,9%	66,7%
4	11	rORF2 - 16 µg (1 dose)	0%	18,2%	1,50 ± 4,74%	36,3%
5	12	rORF2 - 8 µg (1 dose)	0%	8,3%	0,68 ± 1,15%	16,7%
6	11	rORF2 - 4 µg (1 dose)	9,1%	9,1%	2,95 ± 5,12%	36,4%
7	12	KV (2 doses)	16,7%	41,7%	7,27 ± 22,9%	41,7%
8	10	Controles de Provação	10%	80%	9,88 ± 29,2%	90,0%

continuaação

Grupo	N	Tratamento	Taxa de mortalidade	Descarga nasal	% médio de lesões pulmonares	Taxa de incidência de pelo menos um tecido positivo por IHQ para PCV2
9	11	Estrito Controle Negativo	0%	63,6%	0/11 (0%)	90,9%

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

Os resultados deste estudo indicam que todos os esforços posteriores referentes à vacina devem ser concentrados em uma vacina contendo rORF2. No geral, a descarga nasal de PCV2 foi detectada após provocação, e a vacinação com uma vacina contra PCV2 resultou em redução de
5 descarga. A imuno-histoquímica de tecidos linfóides selecionados serviu também como um bom parâmetro para eficácia de vacinas, enquanto que diferenças grandes em GMDP, sintomas clínicos e em lesões macroscópicas não foram detectadas entre os grupos. Este estudo foi complicado pelo fato de que PCV2 exógeno foi introduzido em algum momento durante o estudo,
10 conforme evidenciado por descarga nasal de PCV2, soroconversão para PCV2 e tecidos positivos por IHQ no Grupo 9, o grupo de estrito controle negativo.

Discussão

Sete vacinas contra PCV2 foram avaliadas neste estudo, o qual
15 inclui três níveis diferentes de dose de antígeno de vORF2, administrados uma vez ao dia no Dia 0, três níveis diferentes de dose de antígeno de rORF2, administrados uma vez no Dia 0, e um nível de dose de vacina contendo célula completa de PCV2 morto, administrada no Dia 0 e Dia 14. No geral, o Grupo 5, que recebeu 1 dose de vacina contendo 8 µg de antígeno
20 de rORF2, apresentou os melhores resultados. O Grupo 5 exibiu o GMDP mais alto, a incidência mais baixa de comportamento anormal, a incidência mais baixa de respiração anormal, a segunda incidência mais baixa de tosse, a incidência mais baixa de sintomas clínicos no geral, a taxa de mortalidade mais baixa, a taxa mais baixa de descarga nasal de PCV2, a segunda
25 taxa mais baixa para % médio de lesões pulmonares e a taxa de incidência mais baixa para tecidos positivos por IHQ.

Curiosamente, o Grupo 4, que recebeu dose mais alta de antígeno de rORF2 do que o Grupo 5, não obteve desempenho tão bom ou melhor do que o do Grupo 5. O Grupo 4 apresentou GMDP ligeiramente mais
30 baixo, incidência mais alta de comportamento anormal, incidência mais alta de sintomas clínicos no geral, taxa mais alta de descarga nasal de PCV2, % médio mais alto de lesões pulmonares e taxa mais alta para tecidos positivos

por IHQ do que o Grupo 5. A análise estatística, que pode ter indicado que as diferenças entre estes dois grupos não eram estatisticamente significativas, não foi conduzida sobre estes dados, porém foi observada uma tendência de que o desempenho do Grupo 4 não foi tão bom quanto o do Grupo 5.

5 Após vacinação, 6 porcos morreram no primeiro centro do estudo. Quatro dos seis porcos eram do Grupo 8 ou Grupo 9, que não receberam vacina. Nenhum dos seis porcos exibiu lesões compatíveis com PMWS, não foram relatados eventos adversos e, no geral, todas as sete vacinas aparentaram ser seguras quando administradas a porcos com aproximadamente 10 11 dias de vida. Durante a fase pós-vacinação do estudo, porcos que receberam qualquer um dos três níveis de dose da vacina contendo vORF2 ou de vacina celular completa morta apresentaram os níveis mais altos de IFAT, enquanto que o Grupo 5 apresentou os níveis mais baixos de IFAT, um pouco antes da provocação, dos grupos das vacinas.

15 Embora não comprovada formalmente, acredita-se que a via predominante de transmissão de PCV2 para suínos jovens um pouco depois de desmame seja por contato direto oro-nasal, portanto uma vacina eficaz que reduza descarga nasal de PCV2, em ambiente de produção, ajudaria a controlar a disseminação da infecção. Grupos que receberam um dos três 20 níveis de antígeno de vORF2 e o grupo que recebeu 8 µg de rORF2 apresentaram a taxa de incidência mais baixa de descarga nasal de PCV2 (8,3%). Conforme previsto, o grupo de controle de provocação apresentou a taxa de incidência mais alta de descarga nasal (80%).

25 Lesões macroscópicas em porcos portadores de PMWS, secundária à infecção por PCV2, consistem tipicamente em linfadenopatia generalizada, acompanhada por um ou por vários dos seguintes: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, 30 etc. Na necropsia, hepatite, nefrite e úlceras gástricas não foram observadas em quaisquer grupos e linfadenopatia não foi especificadamente examinada. As pontuações de % médio de lesões pulmonares variaram entre grupos.

O grupo que recebeu 16 μg de antígeno de vORF2 apresentou o % médio mais baixo de pontuação de lesões pulmonares ($0,40 \pm 0,50\%$), seguido pelo grupo que recebeu 8 μg de rORF2 ($0,68 \pm 1,15\%$). Conforme esperado, o grupo de controle de provocação exibiu o % médio mais alto de pontuação de lesões pulmonares ($9,88 \pm 29,2\%$). Em todos os quatro grupos, o % médio de pontuações de lesões pulmonares foi alto porque havia um porco em cada um destes grupos com pontuações muito altas de lesões pulmonares muito altas. A maioria das lesões pulmonares foi descrita como vermelhas/púrpuras e consolidadas. Tipicamente, lesões pulmonares associadas com PMWS são descritas como lesões escuras e que não podem ser coladas, acompanhadas de edema interlobular. As lesões pulmonares anotadas neste estudo ou não foram associadas à infecção por PCV2 ou pode não haver presente agente infeccioso pulmonar secundário. No contexto deste estudo, o % de pontuações de lesões pulmonares provavelmente não reflete a verdadeira da extensão medida de infecção pulmonar, causada por PCV2.

Outros pesquisadores demonstraram uma correlação direta entre a presença de antígeno de PCV2, por IHQW, e histopatologia. A histopatologia em tecidos selecionados não foi conduzida neste estudo. O Grupo 1 (16 μg de vORF2) e o Grupo 5 (8 μg de rORF2) apresentaram a taxa de incidência mais baixa de porcos positivos para antígeno de PCV2 (8,3%), enquanto que o Grupo 9 (o grupo de estrito controle negativo – 90,9%) e o Grupo 8 (o grupo de controle de provocação – 90,0%) apresentaram as taxas de incidência mais altas para porcos positivos para antígeno de PCV2. Por causa da natureza não subjetiva deste teste, os resultados de IHQ são provavelmente um dos melhores parâmetros para julgar a eficácia de vacinas sobre o mesmo. Dessa forma, em uma característica da presente invenção, foi determinada a Dosagem Mínima Protetora (MPD) de um produto recombinante de 1ml/1 dose com antígeno extraído de ORF2 do PCV2 (rORF2), no modelo de porco CDCD em face de provocação por PCV2. Dos três grupos que receberam níveis variados de antígeno de rORF2, o Grupo 5 (8 μg de antígeno de rORF2) exibiu claramente o nível mais alto de prote-

ção. O Grupo 5 obteve os melhores resultados ou foi ligado aos melhores resultados favoráveis com relação a todos os parâmetros examinados. Quando o Grupo 5 foi comparado aos outros seis grupos de vacina, após provocação, o Grupo 5 apresentou o GMDP mais alto ($0,94 \pm 0,22$ libra/dia), a incidência mais baixa de comportamento anormal (0%), a segunda incidência mais baixa de tosse (8,3%), a incidência mais baixa de sintomas clínicos no geral (8,3%), a taxa de mortalidade mais baixa (0%), a taxa mais baixa de descarga nasal de PCV2 (8,3%), a segunda taxa mais baixa de % médio de lesões pulmonares ($0,68 \pm 1,15\%$) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos positivos por IHC (16,7%).

Em outra característica da presente invenção, foi determinada a MPD de um produto convencional de 1 ml/1 dose de antígeno de ORF2 de PCV2 (vORF2) parcialmente purificado no modelo de porco CDCD, em face de provocação por PCV2. Dos três grupos que receberam níveis variados de antígeno de vORF2, o Grupo 1 (16 μ g de vORF2) apresentou o nível mais alto de proteção. O Grupo 1 obteve desempenho superior aos dos Grupos 2 e 3, quanto a GMDP, % médio de lesões pulmonares e IHQ. Os Grupos 1 e 2 (8 μ g de antígeno de vORF2) exibiu desempenho igual, a respeito de incidência geral de sintomas clínicas, o Grupo 3 (4 μ g de antígeno de vORF2) exibiu a taxa mais baixa de mortalidade, e todos os três grupos obtiveram desempenhos iguais em relação à descarga nasal. No geral, vacinas contendo vORF não obtiveram desempenhos tão bons quanto os de vacinas com rORF.

Em ainda uma outra característica da presente invenção, foi determinada a eficácia da dose máxima de 2 ml/2 doses de vacinas com PCV2 Morto Convencional, no modelo de porco CDCD, face à provocação por PCV2. Das sete vacinas avaliadas neste estudo, a vacina com célula completa de PCV2 morto teve o pior desempenho. Leitões que receberam duas doses da vacina com célula completa de PCV2 morto tiveram o pior desempenho. Leitões que receberam duas doses de célula completa de PCV2 morto apresentaram o GMDP mais baixo, a segunda taxa mais alta de comportamento anormal (58,3%), a segunda incidência geral mais alta de sintomas

clínicos (58,3%), a taxa de mortalidade mais alta (16,7%), a segunda incidência mais alta de descarga nasal (41,7%), o % médio mais alto de lesões pulmonares ($9,88 \pm 29,2\%$), incidência alta de lesões pulmonares anotada (75%) e taxa moderada de incidência de IHC em tecidos (41,7%). No entanto, elas foram ainda eficazes em provocar resposta imune.

Em ainda uma outra característica da presente invenção, a descarga nasal de PCV2 foi avaliada como parâmetro de eficácia e os parâmetros anteriores de eficácia contra PCV2 de estudos anteriores foram confirmados. Os resultados deste estudo indicam que a descarga nasal de PCV2 ocorre após provocação intra-nasal e que vacinas contra PCV2 reduzem a descarga nasal de PCV2 após provocação. Além disso, os resultados deste estudo e relatos na literatura indicam que a IHC deve continuar a ser também avaliada em estudos futuros de vacina contra PCV2.

Algumas conclusões adicionais surgidas deste estudo indicam que linfadenopatia é um dos marcos de PMWS. Um outro marco da PMWS é a depleção linfóide e histiócitos multinucleados/gigantes. Adicionalmente, não foram observados eventos adversos ou reações no local da injeção para quaisquer das 7 vacinas contra PCV2, e todas estas 7 vacinas contra PCV2 aparentaram ser seguras quando administradas a porcos jovens.

Exemplo 5

Este exemplo testa a eficácia de oito possíveis vacinas contra PCV2 e confirma parâmetros de provocação com PCV2, obtidos de estudos anteriores de provocação, depois de exposição a uma cepa virulenta de PCV2. Cento e cinquenta (150) leitões nascidos de cesariana e privados de colostro (CDCD) com 6-16 dias de vida foram bloqueados por peso e divididos aleatoriamente em 10 grupos de mesmo tamanho. A Tabela 16 apresenta o Desenho Geral do Estudo para este Exemplo.

Tabela 16. Desenho geral do estudo

Grupo	Nº de porcos	Tratamento	Dia de tratamento	KLH/ICFA no Dia 22 e Dia 28	Provocação com PCV2 virulento no Dia 25	PRRSV MLV no Dia 46	Necropsia no Dia 50
1	15	Vacina 1 contra PCV2 - 16 µg de rORF2 – IMS 1314	0 e 14	+	+	+	+
2	15	Vacina 2 contra PCV2 - 16 µg de vORF2 – Carbopol	0 e 14	+	+	+	+
3	15	Vacina 2 contra PCV2 - 16 µg de rORF2 – Carbopol	0 e 14	+	+	+	+
4	15	Vacina 2 contra PCV2 - 16 µg de vORF2 – Carbopol	0	+	+	+	+
5	15	Vacina 2 contra PCV2 - 4 µg de rORF2 – Carbopol	0 e 14	+	+	+	+

continuação

6	15	Vacina 3 contra PVC2 - 1 µg de rORF2 – Carbo-pol	0 e 14	+	+	+	+	+	+
7	15	PVC2 Vaccine 3 0.25 µg rORF2 – Carbo-pol	0 e 14	+	+	+	+	+	+
8	15	Vacina 4 contra PVC2 – 4 de KV > 8,0 log – Carbopol	0 e 14	+	+	+	+	+	+
9	15	Controles de provocação	N/A	+	+	+	+	+	+
10	15	Nenhum – Grupo de Estrito Controle Negativo Grupo	N/A	+	-	+	+	+	+

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto =

Vírus de PVC2 cultivado em cultura de célula adequada

As fórmulas das vacinas fornecidas a cada grupo foram as seguintes: a Vacina nº 1 contra PCV2, administrada em 1 x dose de 2 ml para o Grupo 1, foi uma dose alta (16 µg/dose de 2 ml) de antígeno de ORF2 recombinante inativado, com adjuvante IMS 1314 (16 µg de rORF2 – IMS 1314). A Vacina nº 2 contra PCV2, administrada em 1 x dose de 2 ml para o Grupo 2, foi uma dose alta (16 µg/dose de 2 ml) de antígeno de ORF2 do PCV2 gerado de VIDO R-1 parcialmente purificado, com Carbopol como adjuvante (16 µg de vORF2 – Carbopol). A vacina nº 3 contra PCV2, administrada em 1 x dose de 2 ml para o Grupo 3, foi uma dose alta (16 µg/dose de 2 ml) de antígeno de ORF2 recombinante inativada com Carbopol como adjuvante (16 µg de rORF2 – Carbopol). A vacina nº 4 contra PCV2, administrada em 1 x dose de 1 ml para o Grupo 4, foi uma dose alta (16 µg /dose de 1 ml) de antígeno de ORF2 de PCV2 gerado de VIDO R-1 parcialmente purificado, com Carbopol como adjuvante (16 µg de vORF2 – Carbopol). A vacina nº 5, administrada em 1 x dose de 2 ml para o Grupo 5, foi uma dose de 4 µg/dose de 2 ml de antígeno ORF2 recombinante inativado com Carbopol como adjuvante (4 µg de rORF2 – Carbopol). A vacina nº 6 contra PCV2, administrada em 1 x dose de 2 ml para o Grupo 6, foi uma dose de 1 µg/2 ml de antígeno de ORF2 recombinante inativado com Carbopol como adjuvante (1 µg de rORF2 – Carbopol). A vacina nº 7 contra PCV2, administrada em 1 x dose de 2 ml para o Grupo 7, foi uma dose baixa (0,25 µg/dose de 2 ml) de antígeno de ORF2 recombinante inativado com Carbopol como adjuvante (0.25 µg de rORF2 – Carbopol). A vacina nº 8 contra PCV2, administrada em 1 x dose de 2 ml para o Grupo 8, foi uma dose alta (título pré-inativação > 8,0 log/dose de 2 ml) de antígeno Struve de PCV2 gerado por VIDO-R2 morto inativado convencional com Carbopol como adjuvante (>8,0 log de KV – Carbopol). No Dia 0, os Grupos 1-8 foram tratados com as suas vacinas designadas. Os Grupos 1-3 e 5-8 receberam inoculações de suas respectivas vacinas mais uma vez no Dia 14. A efetividade de uma dose única de 16 µg de vORF2 – Carbopol foi testada no Grupo 4 que não recebeu inoculação no Dia 14. Os leitões foram observados quanto a eventos adversos e reações no local da injeção, após ambas vacinas. No Dia 21, os leitões foram transfe-

ridos para um segundo centro do estudo, no qual os Grupos 1-9 foram abrigados em grupos em um prédio, e o Grupo 10 foi abrigado em um prédio separado. Todos os porcos receberam hemocianina do molusco *keyhole limpet*, emulsificada com adjuvante incompleto de Freund (KLH/ICFA), no
5 Dias 22 e 28. No Dia 25, os Grupos 1-9 foram provocados com aproximadamente 4 logs de vírus PCV2 virulento. Até o Dia 46, havia ocorrido um número muito pequeno de mortes no grupo de controle da provocação. Em uma tentativa para estimular imunologicamente os porcos e para aumentar a virulência do material de provocação contendo o PVC2, todos os Grupos
10 foram tratados com INGELVAC® PRRSV MLV (Vacina contra Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína com Vírus Vivo Modificado), no Dia 46.

Foram coletadas amostras de sangue pré e pós-provocação para sorologia do PCV2. Foram coletados dados pós-provocação de peso corporal, para determinação de ganho médio diário de peso (GMDP) e observa-
15 ções de sinais clínicos. No Dia 50, todos os porcos sobreviventes foram necropsiados, lesões macroscópicas foram registradas, pulmões foram classificados quanto à patologia e tecidos selecionados foram preservados em formalina para exame por Imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de antígeno de PCV2 em data posterior.

20 Materiais e Métodos

Este foi um estudo parcialmente cego de viabilidade de vacinação-provocação, conduzido em porcos CDCD com 6 a 16 dias de vida, no Dia 0. Para serem incluídas no estudo, títulos de PCV2 por IFA de porcas foram $\leq 1:1000$. Adicionalmente, o status sorológico de porcas eram de ma-
25 nada conhecida negativa para PRRS. Dezesesseis (16) porcas foram testadas para status sorológico de PCV2, e todas as dezesesseis (16) apresentaram título de PCV2 ≤ 1000 , sendo transferidas para o primeiro centro do estudo. Foi efetuado o parto de cento e cinquenta (150) por cirurgias com corte de cesariana e estes foram disponibilizados para este estudo no Dia -3. No Dia
30 -3, 150 porcos CDCD foram pesados no primeiro centro do estudo, identificados com etiquetas nas orelhas, bloqueados por peso e designados aleatoriamente para 1 dos 10 grupos, conforme expostos na Tabela 16 acima. Fo-

ram coletadas amostras de sangue de todos os porcos. Em relação a animais em teste que atenderam aos critérios de inclusão e foram incluídos no estudo, porém, excluídos mais tarde por qualquer motivo, o Investigador e Monitor efetuaram consultas para determinar o uso dos dados coletados do animal na análise final. Os dados destes animais incluídos foram excluídos e o motivo para exclusão foi documentado. Não foram excluídas porcas que atenderam aos critérios de inclusão, selecionadas para este estudo e transportadas para o primeiro centro do estudo. Nenhum leitão foi excluído do estudo e nenhum animal em teste foi retirado do estudo antes de seu término. A Tabela 17 descreve o cronograma para as principais atividades deste Exemplo.

Tabela 17. Atividades do estudo

Dia do estudo	Datas reais	Atividade do estudo
-3	04-04-03	Pesagem de porcos; exame de saúde; randomização para grupos; coleta de amostras de sangue
-3, 0-21	04-04-03 07-04-03 a 27-05-03	Observação quanto saúde geral e eventos adversos pós-vacinação
0	07-04-03	Administração de IVPs respectivas para os Grupos 1-8
0-7	07-04-03 a 14-04-03	Observação de porcos quanto a reações no local da injeção
14	21-04-03	Inoculação dos Grupos 1-3, 5-8 com respectivas IVPs; coleta de amostras de sangue de todos os porcos
14-21	21-04-03 a 28-04-03	Observação de porcos quanto a reações no local da injeção
19-21	26-04-03 a 28-04-03	Tratamento de todos os porcos com antibióticos
21	28-04-03	Transporte de porcos do Struve Labs, Inc. para Veterinary Resources, Inc.(VRI)
22-50	28-04-03 a 27-05-03	Observação de porcos quanto a sinais clínicos pós-provocação
22	29-04-03	Tratamento dos Grupos 1-10 com KLH/ICFA

25	02-05-03	Coleta de amostras de sangue de todos os porcos; pesagem de todos os porcos; Grupos 1-9 provocados com material de provocação contendo PCV2.
28	05-05-03	Tratamento dos Grupos 1-10 com KLH/ICFA
32	09-05-03	Coleta de amostras de sangue de todos os porcos
46	23-05-03	Administração de INGELVAC® PRRS MLV para todos os grupos
50	27-05-03	Coleta de amostras de sangue, pesagem e necropsia de todos os porcos; registro de lesões macroscópicas; avaliação de pulmões quanto a lesões; amostras conservadas de tecido fresco e fixado em formalina; conclusão da fase em vida do estudo

Depois de concluída a fase em vida do estudo, tecidos fixados em formalina foram examinados por Imuno-histoquímica (IHC) para detecção de antígeno de PCV2 por um patologista, amostras de sangue foram avaliadas quanto à sorologia para PCV2 e o ganho médio diário de peso corporal (GMDP) foi determinado desde o Dia 25 ao Dia 50.

Animais foram abrigados no primeiro centro do estudo em jaulas individuais em sete salas, desde o nascimento até aproximadamente 11 dias de vida (aproximadamente Dia 0 do estudo). Cada sala tinha disposição idêntica e consistiu em pilhas de jaulas de aço inoxidável com ar aquecido e filtrado, suprido separadamente para cada unidade de isolamento. Cada sala tinha aquecimento e ventilação separados e, pelo menos, foi impedida contaminação cruzada de ar entre as salas. Os animais foram abrigados em dois prédios diferentes, no segundo centro do estudo. O Grupo 10 (o grupo de estrito controle negativo) foi abrigado separadamente em um prédio de acabamento convertido, e os Grupos 1-9, em um prédio de viveiro convertido. Cada grupo foi abrigado em cercado separado (14-15 porcos por cercado), e em cada cercado fornecido com aproximadamente 0,21 m² (2,3 pés quadrados) por porco. Os Grupos 2, 4 e 8 foram cercados em três cercados adjacentes em um lado da passagem, e os Grupos 1, 3, 5, 6, 7 e 9 foram cercados em seis cercados adjacentes no outro lado da passagem. A sepa-

ração dos grupos foi decorrente da preocupação pelo Monitor do Estudo de que vacinas administradas aos Grupos 2, 4, e 8 não tinham sido inteiramente inativadas. Cada cercado estava sobre um deque elevado com piso feito de plástico. Um fosso abaixo dos cercados serviu como tanque para conter excrementos e resíduos. Cada prédio possuía os seus próprios sistemas separados de aquecimento e ventilação, com pouca possibilidade de contaminação cruzada entre os prédios.

No primeiro centro do estudo, os leitões foram alimentados com ração de leite especialmente formulada desde o nascimento até aproximadamente 3 semanas de vida. Próximo ao Dia 21, todos os leitões estavam consumindo ração sólida misturada especial (aproximadamente com 4 semanas e ½ de vida). No segundo centro do estudo, todos os leitões foram alimentados com ração mista adaptada comercial de prescrição livre, própria para a sua idade e peso, *ad libitum*. Em ambos os centros, foi fornecida água *ad libitum*.

Todos os porcos em teste foram tratados com 1,0 ml de NAXCEL® IM, em patas alternadas nos Dias 19, 20 e 21. Além disso, o Porco nº 11 (Grupo 1) foi tratado 0,5 ml de NAXCEL® IM no Dia 10, o Porco nº 13 (Grupo 10) foi tratado com 1 ml de Penicilina e 1 ml de PREDEF®, 2X no Dia 10, o Porco nº 4 (Grupo 9) foi tratado com 1,0 ml de NAXCEL® no Dia 11 e os Porcos nº 1 (Grupo 1), 4 e 11 foram tratados com 1,0 ml de NAXCEL® no Dia 14, por vários motivos de saúde..

Enquanto estiveram em ambos os centros de estudo, os porcos ficam sob cuidado veterinário. Foram conduzidos exames de saúde nos animais no Dia -3, e registrados na Ficha de Registro de Exame de Saúde. Antes da vacinação, todos os animais apresentavam boa saúde e estado nutricional, conforme determinados por observação no Dia 0. Foi observado que todos os animais em teste apresentavam boa saúde e estado nutricional antes de ser conduzida a provocação. As carcaças e tecidos foram dispostos por apresentação. A disposição final dos animais do estudo foi registrada no Registro de Disposição do Animal.

Nos Dias 0 e 14, porcos designados para os Grupos 1-3 e 5-8 receberam 2,0 ml de Vacinas 1-4 contra PCV2, respectivamente, IM na região direita e esquerda do pescoço, respectivamente, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x ½". Porcos designados para o Grupo 4 receberam 1,0 ml de Vacina nº 2 contra PCV2, IM na região direita do pescoço, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x ½" somente no Dia 0.

No Dia 22, todos os porcos em teste receberam 2,0 ml de K-LH/ICFA IM, na região esquerda do pescoço, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x 1". No Dia 22, todos os porcos em teste receberam 2,0 ml de KLH/ICFA IM, na pata direita, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x 1".

No Dia 25, porcos designados para os 1-9 receberam 1,0 ml de material de provocação ISUVDL de PCV2 (3,98 log₁₀ TCID₅₀/ml) IM, na região direita do pescoço, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x 1". 1,0 ml adicional do mesmo material foi administrado IN para cada porco (0,5 ml por narina), empregando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e cânula nasal.

No Dia 46, todos os porcos em teste receberam 2,0 ml de IN-GELVAC® PRRS MLV, IM, na região direita do pescoço, utilizando seringa estéril de 3,0 ml com bico do tipo Luer lock e agulha estéril de 20 g x 1". O PRRSV MLV foi administrado para tentar-se aumentar a virulência do material de provocação contendo PCV2.

Os porcos em testes foram observados diariamente quanto a saúde geral e eventos adversos, no Dia -3 e a partir do Dia 0 ao Dia 21. Cada porco foi classificado quanto a comportamento normal e anormal, respiração ou tosse. As observações foram registradas no Registro de Observação Clínica. Todos os porcos em testes foram observados do Dia 0 ao Dia 7, e o Grupo 7 foi observado ainda do Dia 14 ao 21, quanto às reações no local da injeção. O ganho médio diário de peso foi determinado por pesagem de cada porco em balança calibrada nos Dias -3, 25 e 50, ou no dia em que um porco

era encontrado morto após provocação. Os pesos corporais foram registrados na Ficha de Peso Corporal. O peso corporal do Dia -3 foi utilizado para bloquear a inclusão de porcos antes de randomização. Os dados de peso do Dia 25 e Dia 50 foram utilizados para determinar o ganho médio diário de peso (GMDP), de cada porco, durante estes intervalos de tempo. Para porcos que morreram após provocação e antes do Dia 50, o GMDP foi ajustado para representar o GMDP do Dia 25 até o dia da morte.

A fim de determinar a sorologia para PCV2, foi coletado sangue venoso total de cada leitão do seio venoso orbital, nos Dias -3 e 14. De cada leitão, foi coletado sangue do seio venoso orbital por inserção de tubo capilar estéril no canto médio de um dos olhos e drenagem de aproximadamente 3,0 ml de sangue total, em Tubo Separador de Soro de 4,0 ml (SST). Nos Dias 25, 32 e 50, foi coletado sangue venoso total de cada porco da veia cava anterior, utilizando agulha Vacutainer® estéril de 18 g x 1 ½" (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey), um suporte de agulha Vacutainer® e um SST de 13 ml. As coletas de sangue em cada intervalo de tempo foram registradas no Registro de Coleta de Sangue. Depois de ter sido permitido que o sangue, contido em cada SST, coagulasse, cada SST foi virado para baixo e o soro, recolhido. O soro recolhido foi transferido para um tubo estéril de pressão negativa e armazenado a $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$ até ser testado em data posterior. Amostras de soro foram testadas quanto à presença de anticorpos contra PCV2 pelo pessoal do departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da BIVI.

Os porcos foram observados uma vez diariamente do Dia 22 ao Dia 50 para sintomas clínicos e, classificados quanto comportamento normal ou anormal, respiração ou tosse. As observações clínicas foram registradas na Ficha de Observação Clínica.

Os Porcos N^{os} 46 (Grupo 1) e 98 (Grupos 9) morreram no primeiro centro do estudo. As duas mortes foram classificadas como mortes por hemorragia, não sendo conduzida necropsia nestes dois porcos. No segundo centro do estudo, os porcos que morreram após provocação e antes do Dia 50 e porcos sacrificados no Dia 50 foram necropsiados. Lesões macros-

cópicas observadas e os percentuais de lobos pulmonares com lesões foram registrados na Ficha de Relatório de Necropsia.

De cada um dos porcos necropsiados no segundo centro do estudo, uma amostra de tecido de narina, pulmão, coração, fígado, linfonodo mesentérico, rim e de linfonodo inguinal foram colocadas em um único recipiente com formalina a 10% tamponada, enquanto que uma outra amostra de tecido dos mesmos órgãos foi colocada em saco plástico Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, Reino Unido) e cada Whirl-pak® foi colocado em gelo. Cada recipiente foi devidamente identificado. Coletas de amostras foram registradas na Ficha de Relatório de Necropsia. Posteriormente, amostras de tecidos fixadas em formalina e uma Ficha de Solicitação De Diagnóstico foram submetidas para testes de IHQ. Os testes de IHQ foram conduzidos de acordo com os procedimentos laboratoriais padrão para amostras recebidas, preparo de amostra e slide e técnicas de coloração. Tecidos frescos em Whirl-paks® foram enviados em sacos de gelo para o Monitor do Estudo para armazenamento ($-70^{\circ} \pm 10^{\circ}\text{C}$) e possível uso futuro. Tecidos fixados em formalina foram examinados por um patologista para detecção de PCV2 por IHQ e classificados utilizando o seguinte sistema de pontuação: 0 = Nenhuma; 1 = Escassa coloração positiva, poucos sítios; 2 = Coloração positiva moderada, múltiplos sítios; e 3 = Coloração positiva abundante difusa em todo o tecido. Para finalidades analíticas, pontuação de 0 foi considerada "negativa", e pontuação acima de 0 foi considerada "positiva".

Resultados

Os resultados para este exemplo são fornecidos abaixo. Segundo anotações, os Porcos nºs 46 e 98 morreram no 14º e 25º dia, respectivamente. Essas mortes foram classificadas como mortes por hemorragia. O Porco nº 11 (Grupo 1) estava ofegante com respiração rápida no Dia 15. De outra forma, todos os porcos eram normais quanto a comportamento, respiração e tosse durante esse período de observação e nenhum evento adverso sistêmico foi observado em quaisquer grupos. Não foi anotada reação no local da injeção, após a vacina no Dia 0. Após vacinação no Dia 14,

sete (7) de quatorze (14) porcos do Grupo 1 (50,0%) apresentaram edema com pontuação "2" no Dia 15. Quatro (4) dos quatorze(14) do Grupo 1 (28,6%) ainda apresentavam edema de pontuação "2" no Dia 16. Nenhum dos outros grupos apresentou reações no local da injeção após cada vacinação.

Os resultados de ganho médio diário de peso (GMDP) são apresentados abaixo na Tabela 18. Os Porcos N^{os} 46 e 98 que morreram de hemorragia foram excluídos dos resultados dos grupos. O Grupo 4, que recebeu uma dose de 16 µg de vORF2 – Carbopol, apresentou o GMDP mais alto [0,52 ± 0,12 ks/dia (1,16 ± 0,26 libra/dia)], seguido pelos Grupos 1, 2, 3, 5, 6 e 10, cujos GMDPs variaram de 0,49 ± 0,10 ks/dia (1,07 ± 0,23 libra/dia) a 0,50 ± 0,12 ks/dia (1,11 ± 0,26 libra/dia). O Grupo 9 apresentou o GMDP mais baixo [0,40 ± 0,13 (0,88 ± 0,29 libra/dia)], seguido pelos Grupos 8 e 7, cujos GMDPs foram de 0,42 ± 0,15 kg/dia (0,93 ± 0,33 libra/dia e 0,99 ± 0,44 libra)/dia, respectivamente.

Tabela 18. Resumo de Ganhos Médios Diários de Peso (GMDP) dos Grupos

Grupo	Tratamento	N	GMDP – libras/dia (Dia 25 a Dia 50) ou ajustado para porcos mortos antes do Dia 50
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 - 2 doses	14	0,49 ± 0,14 ks/dia (1,08 ± 0,30 libra/dia)
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol - 2 doses	15	0,50 ± 0,07 ks/dia (1,11 ± 0,16 libra/dia)
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol - 2 doses	15	0,48 ± 0,10 ks/dia (1,07 ± 0,21 libra/dia)
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol - 1 dose	15	0,53 ± 0,12 ks/dia (1,16 ± 0,26 libra/dia)
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol - 1 dose	15	0,48 ± 0,12 ks/dia (1,07 ± 0,26 libra/dia)
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol - 2 doses	15	0,50 ± 0,12 ks/dia (1,11 ± 0,26 libra/dia)
7	rORF2 – 0.25 µg – Carbopol - 2 doses	15	0,45 ± 0,20 ks/dia (0,99 ± 0,44 libra/dia)
8	KV > 8,0 log – Carbopol - 2 doses	15	0,42 ± 0,15 ks/dia (0,93 ± 0,33 libra/dia)

9	Controles de provocação	14	0,40 ± 0,13 ks/dia (0,88 ± 0,29 libra/dia)
10	Estrito controle negativo	15	0,49 ± 0,10 ks/dia (1,07 ± 0,23 libra/dia)

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

5 Os resultados de sorologia para PVC2 são apresentados abaixo na Tabela 19. Todos os dez (10) grupos foram soronegativos para PCV2 no Dia -3. No Dia 14, os títulos de PCV2 permaneceram baixos para todos os dez (10) grupos (variação de 50-113). No Dia 25, o Grupo 8, que recebeu vacina com célula completa de vírus morto, apresentou o título mais alto de PCV2 (4617), seguido pelo Grupo 2, que recebeu 16 µg de vORF2 – Carbopol, o Grupo 4, que recebeu 16 µg de vORF2 – Carbopol, em dose única, e o Grupo 3, que recebeu 16 µg de rORF2 – Carbopol, cujos títulos foram de 2507, 1920 e 1503 respectivamente. No Dia 32 (uma semana após provocação), os títulos dos Grupos 1-6 e Grupo 8 variaram de 2360 a 7619; enquanto que os Grupos 7 (0,25 µg de rORF2 – Carbopol), 9 (Controle de Provocação) e 10 (Estrito controle negativo) apresentaram títulos de 382, 129 e 78 respectivamente. No Dia 50 (dia da necropsia), todos dez (10) grupos exibiram títulos altos de PCV2 (≥ 1257).

20 Nos Dias 25, 32 e 50, o Grupo 3, que recebeu duas doses de 16 µg de rORF2 – Carbopol, apresentou títulos de anticorpo mais altos do que os do Grupo 1 que recebeu duas doses de 16 µg de rORF2 – IMS 1314. Nos Dias 25, 32 e 50, o Grupo 2, que recebeu duas doses de 16 µg de vORF2 apresentou títulos mais altos do que o Grupo 4 que recebeu somente uma dose da mesma vacina. Os Grupos 3, 5, 6, 7, que receberam níveis decrescentes de rORF2 – Carbopol, de 16, 4, 1 e 0,25 µg respectivamente, 25 exibiram títulos de anticorpos correspondentemente decrescentes nos Dias 25 and 32.

Tabela 19. Resumo de Títulos de PCV2 por IFA dos Grupos

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

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

- 5 *Para fins de cálculo, título ≤ 100 de IFA foi designado título de "50"; título de IFA ≥ 6400 foi designado como título de "12.800".

**Dia de Provocação

***Dia de Necropsia

- 10 Os resultados de observações clínicas pós-provocação são apresentados abaixo. A Tabela 20 inclui observados de Comportamento Anormal, Respiração Anormal, Tosse e Diarréia. A Tabela 21 inclui os resultados do Resumo de Incidência Geral dos Grupos de Sintomas Clínicas, e a Tabela 22 inclui resultados do Resumo de Taxas de Mortalidade Pós-Provocação dos Grupos. A incidência de comportamento anormal, respira-

ção anormal e tosse pós-provocação foi baixa em porcos que receberam 16 µg de rORF2-IMS 1314 (Grupo 1), 16 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 3), 1 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 6), 0,25 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 7) e em porcos no Grupo de Controle de Provocação (Grupo 9). A incidência de
5 comportamento anormal, respiração anormal e tosse pós-provocação foi zero em porcos que receberam 16 µg de vORF2-Carbopol (Grupo 2), uma dose única de 16 µg de vORF2-Carbopol (Grupo 4), 4 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 5), >8 log KV-Carbopol (Grupo 8) e em porcos no grupo de estrito controle negativo (Grupo 10).

10 A incidência geral de sintomas clínicos variaram entre os grupos. Porcos que receberam 16 µg de vORF2-Carbopol (Grupo 2), uma dose única de 16 µg de vORF2-Carbopol (Grupo 4) e porcos no grupo de estrito controle negativo (Grupo 10) apresentaram taxas de incidência de 0%; as taxas de incidência de porcos que receberam 16 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 3)
15 e 1 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 6) foram de 6,7%; porcos que receberam 16 µg de rORF2-IMS 1314 (Grupo 1) apresentaram taxa de incidência geral de 7,1%; as taxas de incidência de porcos que receberam 4 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 5), 0,25 µg de rORF2-Carbopol (Grupo 7) e que receberam vacina de KV >8 log KV foram de 13,3%; e porcos no Grupo de Controle de
20 Provocação (Grupo 9) apresentou taxa de incidência de 14,3%.

As taxas gerais de mortalidade entre grupos variaram também. O Grupo 8, que recebeu 2 doses de vacina de KV apresentou a taxa de mortalidade mais alta de 20,0%; seguido pelo Grupo 9, o grupo de controle de provocação, e o Grupo 7, que recebeu 0,25 µg de rORF2-Carbopol, cujas
25 taxas de mortalidade foram de 14,3% e 13,3%, respectivamente. O Grupo 4, que recebeu uma dose de 16 µg de vORF2-Carbopol apresentou taxa de mortalidade de 6,7%. Todos os outros Grupos, 1, 2, 3, 5, 6 e 10, apresentaram taxa de mortalidade de 0%.

Tabela 20. Resumo de Observações dos Grupos para Comportamento Anormal, Respiração Anormal e Tosse Pós-Provocação

Grupo	Tratamento	N	Comportamento Anormal ¹	Respiração Anormal ²	Tosse ³
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 - 2 doses	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7,1%)
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol - 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol - 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol - 1 dose	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol - 1 dose	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol - 2 doses	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol - 2 doses	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)
8	KV > 8,0 log – Car- bopol - 2 doses	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
9	Controles de provo- cação	14	1/14 (7,1%)	1/14 (7,1%)	2/14 (14/3%)
10	Estrito controle ne- gativo	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

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

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

³Número total de porcos em cada grupo que exibiu tosse por, pelo menos, um dia

Tabela 21. Resumo de Incidência Geral de Sintomas Clínicos dos Grupos

Grupo	Tratamento	N	Incidência de porcos com Sintomas Clínicos ¹	Taxa de incidência
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 - 2 doses	14	1	7,1%
2	vORF2 – 16 µg – Carbopol - 2 doses	15	0	0,0%
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol - 2 doses	15	1	6,7%
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol - 1 dose	15	0	0,0%
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol - 1 dose	15	2	13,3%
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol - 2 doses	15	1	6,7%
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbo- pol - 2 doses	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log – Carbopol - 2 doses	15	2	13,3%
9	Controles de provocação	14	2	14,3%
10	Estrito controle negativo	15	0	0,0%

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

- 5 ¹Número total de porcos em cada grupo que apresentou qualquer sintoma clínico por, pelo menos, um dia

Tabela 22. Resumo de Taxas de Mortalidade Pós-Provocação dos Grupos

Grupo	Tratamento	N	Mortos após provocação	Taxa de mortalidade
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 - 2 doses	14	0	0,0%
2	vORF2 – 16 µg – Carbo- pol - 2 doses	15	0	0,0%
3	rORF2 – 16 µg – Carbo- pol - 2 doses	15	0	0,0%
4	vORF2 - 16 µg – Carbo- pol - 1 dose	15	1	6,7%
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol - 1 dose	15	0	0,0%
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol - 2 doses	15	0	0,0%
7	rORF2 – 0,25 µg – Car- bopol - 2 doses	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log – Carbopol - 2 doses	15	3	20,0%
9	Controles de provocação	14	2	14,3%
10	Estrito controle negativo	15	0	0,0%

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

- 5 O Resumo de Percentual Médio de Lesões Pulmonares dos Grupos e Possíveis Diagnósticos é fornecido abaixo na Tabela 23. O Grupo 9, o grupo de controle de provocação, apresentou o percentual mais alto de lesões pulmonares com média de $10,81 \pm 23,27\%$, seguido pelo Grupo 7, que recebeu 0,25 µg de rORF2–Carbopol e média de $6,57 \pm 24,74\%$, o Grupo 5, que recebeu 4 µg de rORF2–Carbopol e média de $2,88 \pm 8,88\%$ e o Grupo 8 que recebeu a vacina com KV e apresentou média de $2,01 \pm 4,98\%$.
- 10 Os demais seis (6) grupos apresentaram percentual médio mais baixo de lesões pulmonares, o qual variou de $0,11 \pm 0,38\%$ a $0,90 \pm 0,15\%$.

Possíveis diagnósticos de pneumonia variou entre os grupos. O Grupo 3 que recebeu duas doses de 16 µg de rORF2–Carbopol, apresentou o possível diagnóstico mais baixo de pneumonia, com 13,3%. O Grupo 9, o grupo de controle de provocação, teve 50% do grupo diagnosticado possivelmente com pneumonia, seguido pelo Grupo 10, o grupo de estrito controle negativo, e o Grupo 2 que recebeu duas doses of 16 µg de vORF2–Carbopol, com 46,7% e 40%, respectivamente, possivelmente diagnosticados com pneumonia.

Os Grupos 1, 2, 3, 5, 9 e 10 tiveram 0% do grupo possivelmente diagnosticados com infecção por PCV2; enquanto que o Grupo 8, que recebeu duas doses de vacina com KV apresentou a taxa mais alta entre os grupos de possível diagnóstico de infecção por PCV2 de 20%. O Grupo 7 que recebeu duas doses de 0,25 µg de rORF2–Carbopol e o Grupo 4, que recebeu uma dose de 16 µg de vORF2–Carbopol teve como possíveis diagnósticos dos grupos e infecção por PCV2 de 13,3% e 6,7% de cada grupo, respectivamente.

Úlceras gástricas foram diagnosticadas somente em um porco no Grupo 7 (6,7%); enquanto que os outros 9 grupos permaneceram livres de úlceras gástricas.

20 Tabela 23. Resumo de % Médio dos Grupos de Lesão Pulmonar e Possível Diagnóstico

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que apresentou descarga por, pelo menos, um dia	Taxa de incidência
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 - 2 doses	15	0	0%
2	vORF2 – 16 µg – Carbo- pol - 2 doses	15	1	6,7%
3	rORF2 – 16 µg – Carbopol - 2 doses	15	3	20,0%
4	vORF2 - 16 µg – Carbopol - 1 dose	15	2	13,3%
5	rORF2 - 4 µg – Carbopol - 1 dose	15	3	20,0%

6	rORF2 - 1 µg – Carbopol - 2 doses	15	6	40,0%
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbo- pol - 2 doses	15	7	46,7%
8	KV > 8,0 log – Carbopol - 2 doses	15	12	80%
9	Controles de provocação	14	14	100,0%
10	Estrito controle negativo	15	14	93,3%

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

- O Resumo de Incidência de Resultados Positivos de IHQ dos Grupos é apresentado abaixo na Tabela 24. O Grupo 1 (16 µg de rORF2 – IMS 1314) apresentou a taxa mais baixa dos grupos de resultados positivos de IHQ com 0% dos porcos positivos para PCV2, seguido pelo Grupo 2 (16 µg de vORF2 – Carbopol) e Grupo 4 (dose única de 16 µg de vORF2 – Carbopol), cujas taxas de IHQ do grupo foi de 6,7% e 13,3%, respectivamente.
- O Grupo 9, o grupo de controle de provocação, apresentou a taxa de incidência positiva para IHQ mais alta, com 100% dos porcos positivos para PCV2; seguido pelo Grupo 10, o grupo de estrito controle negativo, e o Grupo 8 (vacina de KV), com 93,3% e 80% dos porcos positivos para PCV2, respectivamente.

15 Tabela 24. Resumo de Taxa de Incidência de IHQ positiva dos Grupos

Grupo	Tratamento	N	Nº de porcos que apresentou descarga por, pelo menos, um dia	Taxa de incidência
1	rORF2 - 16 µg – IMS 1314 - 2 doses	15	0	0%
2	vORF2 – 16 µg – Car- bopol - 2 doses	15	1	6,7%
3	rORF2 – 16 µg – Car- bopol - 2 doses	15	3	20,0%
4	vORF2 - 16 µg – Car- bopol - 1 dose	15	2	13,3%

5	rORF2 - 4 µg – Carbopol - 1 dose	15	3	20,0%
6	rORF2 - 1 µg – Carbopol - 2 doses	15	6	40,0%
7	rORF2 – 0,25 µg – Carbopol - 2 doses	15	7	46,7%
8	KV > 8,0 log – Carbopol - 2 doses	15	12	80%
9	Controles de provoca- ção	14	14	100,0%
10	Estrito controle negati- vo	15	14	93,3%

vORF2 = isolado de ORF2 viral; rORF2 = ORF2 expressa por baculovírus recombinante; KV ou célula completa de vírus morto = Vírus de PCV2 cultivado em cultura de célula adequada

Discussão

5 Sete vacinas contra PCV2 foram avaliadas neste exemplo, as
quais incluíram uma dose alta (16 µg) de antígeno de rORF2, tendo como
adjuvante IMS 1314, administrada duas vezes, uma dose alta (16 µg) de an-
tígeno de vORF2, tendo como adjuvante Carbopol, administrada uma vez
10 para um grupo de porcos e duas vezes para um segundo grupo de porcos,
uma dose alta (16 µg) de antígeno de rORF2, tendo como adjuvante Carbo-
pol, administrada duas vezes, uma dose de 4 µg dose ode antígeno de
rORF2, tendo como adjuvante Carbopol, administrada duas vezes, uma do-
se de 1 µg dose de antígeno de rORF2, tendo como adjuvante Carbopol,
administrada duas vezes, uma dose baixa (0,25 µg) de antígeno de rORF2,
15 tendo como adjuvante Carbopol, administrada duas vezes, e uma dose alta
(> 8 log) de vacina de célula completa de PCV2 morto, tendo adjuvante Car-
bopol. No geral, o Grupo 1 que recebeu duas doses de 16 µg rORF2 – IMS
1314, apresentou desempenho ligeiramente melhor do que o dos Grupos 2 a
7, os quais receberam vacinas contendo vários níveis de antígeno de vORF2
20 ou rORF2, tendo como adjuvante Carbopol, e muito melhor do que o do
Grupo 8, que recebeu duas doses de vacina de célula completa de PCV2
morto. O Grupo 1 que apresentou o terceiro GMDP mais alto ($1,80 \pm 0,30$

libras/dia), a taxa de incidência mais baixa de comportamento anormal (0%), a taxa de incidência mais baixa de respiração anormal (0%), incidência baixa de tosse (7,1%), incidência baixa de sintomas clínicos em geral (7,1%), foi ligado a três outros grupos com a taxa de mortalidade mais baixa (0%), a segunda taxa mais baixa para % médio de lesões pulmonares ($0,15 \pm 0,34\%$), a segunda taxa mais baixa para pneumonia (21,4%) e a taxa de incidência mais baixa para tecidos positivos por IHQ (0%). O Grupo 1 foi, no entanto, o único grupo em que foram anotadas reações no local da injeção, incluindo 50% dos vacinados 1 dia após a segunda vacina. As outras vacinas administradas aos Grupos 2 a 7 apresentaram desempenho melhor do que o da vacina de vírus morto e, praticamente, tão bom quanto, o da vacina administrada ao Grupo 1.

O Grupo 8 que recebeu duas doses de vacina de PCV2 morto, tendo adjuvante Carbopol, exibiu o pior conjunto de resultados de qualquer grupo de vacina. O Grupo 8 que apresentou o GMDP mais baixo ($0,93 \pm 0,33$ libras/dia), a segunda taxa mais alta de comportamento anormal (6,7%), a taxa mais alta de respiração anormal (6,7%), foi ligado a três outros grupos para incidência geral mais alta de sintomas clínicos (13,3%), exibiu a taxa de mortalidade mais alta de todos os grupos (20%) e a taxa mais alta de IHQ positiva (80%) de qualquer grupo de vacina. Houve a preocupação de que a vacina de célula completa de PVC2 morto talvez não tivesse sido completamente inativada, antes de ser administrada para o Grupo 8, fato que pode explicar os maus resultados deste grupo. Infelizmente, não há dados disponíveis definitivos para confirmar esta preocupação. No geral, no contexto deste exemplo, uma vacina Convencional de PCV2 Morto não ajudou a reduzir a doença associada a PCV2.

Conforme mencionado anteriormente, não foram associados eventos adversos as vacinas em teste, com exceção da vacina com o adjuvante IMS 1314. Reações no local da injeção foram anotadas em 50,0% dos porcos 1 dia após a segunda vacinação com vacina formulada com IMS 1314, e em 28,6% dos porcos 2 dias após a segunda vacinação. Nenhuma reação foi anotada em quaisquer porcos que receberam vacinas cujo adju-

vante foi Carbopol. Quaisquer estudos posteriores que incluem porcos vacinados com vacinas contendo IMS 1314 como adjuvante deve continuar a monitorar cuidadosamente os porcos quanto a reações no local da injeção.

5 Todos os porcos foram soronegativos para PCV2 no Dia -3, e somente o Grupo 2 apresentou título acima de 100 no Dia 14. No Dia 25 (dia de provocação), o Grupo 8 exibiu o título de anticorpos mais alto contra PCV2 (4619), seguido pelo Grupo 2 (2507). Com exceção dos Grupos 7, 9 e 10, todos os grupos exibiram forte resposta de anticorpos próximo ao Dia 32. No Dia 50, todos os grupos, incluindo os Grupos 7, 9 e 10, exibiram forte
10 resposta de anticorpos.

Um dos marcos da fase tardia da infecção por PCV2 e desenvolvimento subsequente de PMWS, é o retardo de crescimento em porcos desmamados e, em casos graves, a perda de peso é observada. O ganho médio diário de peso dos grupos é um método quantitativo que demonstra
15 retardo de desenvolvimento ou de perda de peso. Neste exemplo, não houve diferença grande em GMDP entre os grupos. O Grupo 8 apresentou o GMDP mais baixo de $0,40 \pm 0,13$ ks/dia ($0,88 \pm 0,29$ libras/dia), enquanto que o Grupo 4 exibiu o mais alto GMDP de $0,52 \pm 0,13$ kg/dia ($1,16 \pm 0,26$ libra/dia). No contexto deste estudo, não houve diferença suficiente entre os
20 grupos para fundamentar a eficácia de vacinas futuras em GMDP.

Além de perda de peso – dispnéia, letargia, palidez cutânea e, algumas vezes, icterícia, são sintomas clínicos associados com PMWS. Neste exemplo, comportamento anormal e respiração anormal e tosse não foram observados freqüentemente para cada grupo. Conforme demonstrado neste
25 estudo, este modelo de provocação e de cepa de provocação não resulta em sintomas clínicos surpreendentes e este não é um parâmetro forte para fundamentar a eficácia de vacinas.

No geral, taxas de mortalidade não foram altas neste exemplo, e a ausência de uma taxa de mortalidade alta no grupo de controle de provocação limita este parâmetro para fundamentar a eficácia de vacinas. Antes
30 do Dia 46, houve uma morte em quinze porcos no Grupos 4 e no 7, no Grupo 9, dois entre quatorze porcos morreram e no Grupo 8, três entre quinze

porcos. Visto o Grupo 9, o grupo de controle de provocação, não ter demonstrado sintomas clínicos provocados por PCV2 e ter havido somente duas mortes neste grupo até o Dia 46, a vacina MLV contra Vírus de Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRSV) foi administrada a todos os porcos no Dia 46. Estudos anteriores empregaram INGELVAC® PRRS MLV como agente imunoestimulador para provocar doença com PMWS associada a PCV2 e as taxas de mortalidade foram mais altas nestes estudos anteriores. Ocorreram duas mortes um pouco depois de ser administrada a vacina contra PRRS no Dia 46 – no Grupo 4 houve uma morte no Dia 46 e, no Grupo 7, uma morte no Dia 47 – as quais provavelmente não foram associadas à administração da vacina contra PRRS. Até o Dia 50, o Grupo 8, que recebeu duas doses de vacina com vírus morto, apresentou a taxa de mortalidade mais alta (20%), seguido pelo Grupo 9 (controle de provocação) e Grupo 7 (0,25 µg de rORF2 – Carbopol), com taxas de mortalidade de 14,3% e 13,3%, respectivamente. No geral, a administração de vacina contra PRRS para o modelo de provocação tardia na fase de observação pós-provocação deste exemplo não aumentou significativamente as taxas de mortalidade.

Lesões macroscópicas em porcos portadores de PMWS, secundária à infecção por PCV2, consistem tipicamente em linfadenopatia generalizada, combinada a um ou mais dos seguintes: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios reprodutivos, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc. Na necropsia (Dia 50), icterícia, hepatite e nefrite não foram anotadas em quaisquer grupos. Foi observada úlcera gástrica em um porco do Grupo 7, porém linfadenopatia não foi especificamente examinada. Com base na presença de lesões, compatíveis com infecção por PCV2, três grupos apresentaram, pelo menos, um porco possivelmente diagnosticado com PCV2 (PMWS). O Grupo 8, que recebeu duas doses de vacina com vírus morto, apresentou 20% possivelmente diagnosticados com PCV2, enquanto que o Grupo 7 e Grupo 4 apresentaram 13,3% e 6,7%, respectivamente, com possível diag-

nóstico de PCV2. O % médio de pontuações de lesões pulmonares variou entre os grupos na necropsia. Os Grupos 1, 2, 3, 4, 6 e 10 exibiram % baixo de pontuações de lesões pulmonares, os quais variaram de $0,11 \pm 0,38\%$ a $0,90 \pm 0,15\%$. Conforme esperado, o Grupo 9, o grupo de controle de provocação, apresentou o % médio mais alto de pontuação de lesão pulmonar (10,81 \pm 23,27%). Nos quatro grupos, o % médio de pontuações de lesão pulmonar foram elevados em decorrência de um a três porcos, em cada um destes grupos, ter apresentado pontuações altas de lesão pulmonar. As lesões pulmonares eram vermelhas/púrpuras e consolidadas. Tipicamente, lesões pulmonares associadas com PMWS são descritas como escuras, não podem ser colabadas e são acompanhadas de edema interlobular. As lesões pulmonares observadas neste estudo, ou não eram associadas com infecção pulmonar ou talvez um agente infeccioso pulmonar secundário possa ter estado presente. No contexto deste estudo, o % de pontuações de lesão pulmonar provavelmente não reflete uma medida verdadeira da quantidade de infecção pulmonar causada pelo PCV2. Da mesma forma, o possível diagnóstico de pneumonia pode ter sido utilizado em demasia também. Quaisquer porcos com lesões pulmonares, algumas tão pequenas quanto 0,10% foram listadas como um possível diagnóstico de pneumonia. Neste exemplo, não houve diferença suficiente, a respeito de lesões macroscópicas e % de lesões pulmonares sobre os quais possa ser fundamentada a eficácia de vacinas.

Os resultados de IHQ exibiram as maiores diferenças entre os grupos. O Grupo 1 (16 μ g de rORF2 – IMS 1314) apresentou os resultados positivos mais baixos de IHQ para antígeno de PCV2 (0%); enquanto que os Grupos 9 e 10 apresentaram os resultados positivos mais altos de IHQ com taxas de incidência de 100% e 93,3%, respectivamente. Os Grupos 3, 5, 6 e 7, que receberam 16, 4, 1 ou 0,25 μ g de antígeno de rORF2, respectivamente, com Carbopol como adjuvante, apresentaram taxas de IHQ positivo de 20%, 20%, 40% e 46,7%, respectivamente. O Grupo 2, que recebeu duas doses de 16 μ g de vORF2 com Carbopol como adjuvante, apresentou taxa positiva de IHQ de 6,7%, enquanto que o Grupo 4 que recebeu somente

uma dose da mesma vacina, apresentou taxa positiva de IHQ de 13,3%. Devido à natureza objetiva deste teste e o fato de que os resultados de IHQ correlacionaram-se com resultados esperados, os testes de IHQ são provavelmente um dos melhores parâmetros sobre os quais baseia-se a eficácia da vacina.

5 Dessa forma, em uma característica da presente invenção, é determinada a Dosagem Mínima Protetora (MPD) de antígeno de rORF2 de PCV2, com Carbopol como adjuvante, no modelo de porco CDCD, em face de provocação por PVC2. Os Grupos 3, 5, 6 e 7 receberam, cada um, duas doses de antígeno de rORF2, com Carbopol como adjuvante, porém o nível do antígeno de rORF2 variou para cada grupo. Os Grupos 3, 5, 6 e 7 receberam, cada, 16, 4, 1 ou 0.25 µg de antígeno de rORF2, respectivamente. Em geral, diminuindo-se o nível do antígeno de rORF2, os títulos de anticorpos contra PCV2 diminuíram e a taxa de mortalidade, o % médio de lesões pulmonares e a incidência de tecidos positivos por IHQ aumentaram. Dos quatro grupos que receberam níveis variados de rORF2 – Carbopol, os Grupos 3 e 5, que receberam duas doses de 16 ou de 4 µg de antígeno de rORF2, respectivamente, obtiveram, cada um, taxa positiva por IHQ de somente 20%, além de cada um apresentar títulos de anticorpos semelhantes. No geral, com base em resultados de IHQ positiva, a dosagem mínima protetora de antígeno de rORF2, administrado duas vezes, é de aproximadamente 4 µg.

25 Em uma outra característica da presente invenção, foi avaliada a antigenicidade dos antígenos de PCV2 recombinante (rORF2) e de VIDO R-1 (vORF2). O Grupo 2 recebeu duas doses de 16 µg de vORF2 e o Grupo 3 recebeu duas doses de 16 µg de rORF2. Em ambas as vacinas, o adjuvante utilizado foi o Carbopol. Foi constatado que ambas as vacinas eram seguras e as duas exibiram taxa de mortalidade de 0%. O Grupo 2 apresentou título de anticorpo contra PCV2 de 2507 no Dia 25, enquanto que no Grupo 3, o título de anticorpo contra PCV2 foi de 1503. O Grupo 3 apresentou pontuação mais baixa do % médio de lesões pulmonares do que o Grupo 2 ($0,11 \pm 0,38\%$ versus $0,90 \pm 0,15\%$), porém, o Grupo 2 apresentou uma taxa de in-

cidência de IHQ positiva menor do que o Grupo 3 (6,7% *versus* 20%). No geral, ambas as vacinas exibiram antigenicidade semelhante, porém, vORF2 foi associada a resultados ligeiramente melhores de IHQ.

5 Em ainda uma outra característica da presente invenção, foi determinada a adequação de dois adjuvantes diferentes (Carbopol e IMS 1314). Os Grupos 1 e 3 receberam duas doses de vacina contendo 16 µg de antígeno de rORF2, porém o Grupo 1 recebeu o antígeno acompanhado pelo adjuvante IMS 1314, enquanto que o Grupo 3 recebeu o antígeno tendo como adjuvante o Carbopol. Ambos os grupos apresentaram essencialmente
10 o mesmo GMDP, essencialmente a mesma incidência de sinais clínicos após provocação, a mesma taxa de mortalidade e, essencialmente, o mesmo % médio de lesões pulmonares; porém, o Grupo 1 apresentou taxa positiva de IHQ de 20%. No entanto, o Grupo 3 que recebeu a vacina com o adjuvante Carbopol apresentou títulos de PCV2 por IFAT mais altos, nos Dias 25,
15 32, e 50, do que o Grupo 1 que recebeu a vacina com o adjuvante IMS 1314. No geral, embora a vacina contra PCV2, associada ao adjuvante IMS 1314, tivesse realmente fornecido resultados melhores de IHQ, ela não ofereceu proteção notadamente melhor contra infecção por PCV2 e induziu reação no local da injeção. Enquanto que a vacina contra PCV2 com o adjuvante Car-
20 bopol teve um desempenho praticamente tão bom quanto o da vacina com o adjuvante IMS 1314, não sendo, porém, associada a quaisquer eventos adversos.

Em ainda outra característica da presente invenção, foi determinada a viabilidade da ORF2 do PCV2 sob a forma de um produto contendo 1
25 dose de 1 ml. Os Grupos 2 e 4 receberam 16 µg de vacina contendo vORF2, tendo como adjuvante o Carbopol, no Dia 0, porém, o Grupo 2 recebeu uma segunda dose no Dia 14. O Grupo 4 apresentou GMDP ligeiramente mais alto e % médio menor de lesões pulmonares do que o Grupo 2, no entanto, o Grupo 2 apresentou títulos de PCV2 por IFAT mais altos, nos Dias 25, 32 e
30 50, e uma taxa de incidência ligeiramente mais baixa de tecidos com IHQ positiva. Todos os outros resultados, para estes dois grupos, foram semelhantes. No geral, uma dose de vORF2, tendo como adjuvante o Carbopol,

exibiu desempenho semelhante ao de duas doses da mesma vacina.

REIVINDICAÇÕES

- 5 1. Método para redução ou diminuição da gravidade de sintomas clínicos associados com infecção por PCV2, diminuição da carga total de circovírus suíno de um animal e/ou redução do efeito imunossupressor da infecção por circovírus suíno em porcos, compreendendo a administração de um antígeno do circovírus suíno tipo 2 para um porco.
- 10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o referido antígeno compreende uma proteína codificada por seqüência de DNA com, pelo menos, 80% de identidade de seqüência com a ORF2 de um vírus do circovírus suíno tipo 2.
3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, em que o referido antígeno do circovírus suíno tipo 2 é um antígeno de ORF2, expresso por baculovírus recombinante.
- 15 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, em que o referido antígeno do circovírus suíno tipo 2 é formulado e administrado em um (1) ml por dose.
- 20 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que os referidos sintomas clínicos são selecionados do grupo constituído por linfadenopatia, depleção linfóide e histiócitos multinucleados ou gigantes.
- 25 6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a referida linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados ou gigantes estão presentes em combinação com outro sintoma selecionado do grupo constituído por pneumonia intersticial com edema interlobular, palidez cutânea ou icterícia, fígado com lesões atróficas disseminadas, úlceras gástricas, nefrite, lesões semelhante a EPS e distúrbios reprodutivos.
- 30 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a referida administração ocorre em porcos com menos de 15 semanas de vida.
8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a referida administração ocorre em porcos com menos de 3 semanas de vida, de preferência, com menos de 2 semanas de vida.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a referida administração ocorre em aproximadamente 3 semanas da exposição a antígeno virulento de circovírus suíno tipo 2.

5 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a referida composição compreende ainda, pelo menos, um componente adicional, selecionado do grupo constituído por veículos veterinários aceitáveis, veículos farmacêuticos aceitáveis e agentes imunomoduladores.

10 11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a referida administração é selecionada do grupo constituído por via intradérmica, intratraqueal, intravaginal, intramuscular, intranasal, intravenosa, intravascular, intra-arterial, intraperitoneal, oral, intratecal, subcutânea, intracutânea, intracardiaca, intralobal, intramedular ou intrapulmonar.

15 12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a administração do referido antígeno do circovírus suíno tipo 2 não exibe eventos adversos ou reações no local da injeção.

13. Método para melhora do nível de resistência geral à doença de porcos, compreendendo a administração de um antígeno de circovírus suíno tipo 2 a um porco.

20 14. Processo para a produção de um medicamento para redução ou diminuição da gravidade de sintomas clínicos associados com infecção por PCV2, diminuição da carga total de circovírus suíno de um animal e/ou redução do efeito imunossupressor da infecção por circovírus suíno, o referido processo compreendendo as etapas de obtenção de um antígeno do circovírus suíno e combinação do referido antígeno com veículos veterinários
25 aceitáveis, veículos farmacêuticos aceitáveis e agentes imunomoduladores.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, em que o referido antígeno compreende um polipeptídeo codificado pela ORF2 do circovírus suíno tipo 2.

30 16. Uso de um antígeno do circovírus suíno tipo 2 para o preparo de um medicamento para redução ou diminuição da gravidade de sintomas clínicos associados com infecção por PCV2, diminuição da carga total de circovírus suíno de um animal e/ou redução do efeito imunossupressor da

infecção por circovírus suíno em porcos, em que o referido medicamento é administrado para um porco.

5 17. Uso de acordo com a reivindicação 16, em que o referido antígeno compreende uma proteína codificada por seqüência de DNA com, pelo menos, 80% de identidade de seqüência com a ORF2 de um vírus do circovírus suíno tipo 2.

18. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 e 17, em que o referido antígeno do circovírus suíno tipo 2 é um antígeno de ORF2, expresso por baculovírus recombinante.

10 19. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, em que o referido antígeno do circovírus suíno tipo 2 é formulado e administrado em um (1) ml por dose.

15 20. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, em que os referidos sintomas clínicos são selecionados do grupo constituído por linfadenopatia, depleção linfóide e histiócitos multinucleados ou gigantes.

20 21. Uso de acordo com a reivindicação 20, em que a referida linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados ou gigantes estão presentes em combinação com outro sintoma selecionado do grupo constituído por pneumonia intersticial com edema interlobular, palidez cutânea ou icterícia, fígado com lesões atróficas disseminadas, úlceras gástricas, nefrite, lesões semelhante a EPS e distúrbios reprodutivos.

25 22. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 21, em que a referida administração ocorre em porcos com menos de 15 semanas de vida.

23. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 22, em que a referida administração ocorre em porcos com menos de 3 semanas de vida, de preferência, com menos de 2 semanas de vida.

30 24. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 23, em que a referida administração ocorre em aproximadamente 3 semanas da exposição a antígeno virulento de circovírus suíno tipo 2.

25. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a

24, em que a referida composição compreende ainda, pelo menos, um componente adicional, selecionado do grupo constituído por veículos veterinários aceitáveis, veículos farmacêuticos aceitáveis e agentes imunomoduladores.

5 26. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 25, em que a referida administração é selecionada do grupo constituído por via intradérmica, intratraqueal, intravaginal, intramuscular, intranasal, intravenosa, intravascular, intra-arterial, intraperitoneal, oral, intratecal, subcutânea, intracutânea, intracardíaca, intralobal, intramedular ou intrapulmonar.

10 27. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 26, em que a administração do referido antígeno do circovírus suíno tipo 2 não exhibe eventos adversos ou reações no local da injeção.

28. Uso de acordo com um antígeno do circovírus suíno tipo 2 para o preparo de um medicamento para melhora do nível de resistência geral à doença de porcos.

FIG 1

Cepa de campo isolada de PCV2

Etapa de amplificação da ORF2 por PCR

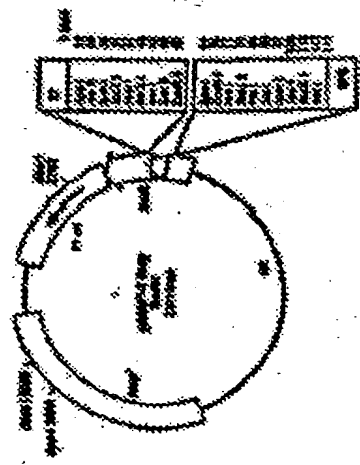
- Introdução de uma sequência consenso 5' de Kozak
- Introdução de um sítio 3' EcoR1

1

Gene da ORF2 (713 bp)

Clonagem no sítio de protusão do vetor pGEM T-Easy da Promega

2



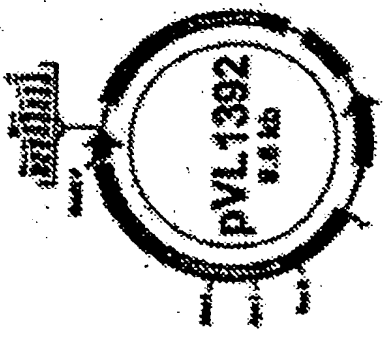
Excisão do pGEM T-Easy no sítio de restrição NotI

Gene da ORF2 (756 pb, incluindo algumas sequências do vetor pGEM)

3

Clonagem no vetor pVL 1392 da BD

4



Co-transfecção da nova construção (denominação: N47 064Y; tamanho total: 10.367 pb) com DNA de BaculoGold da BD em células Sf9

5

Baculovirus recombinante, que expressa a proteína da ORF2

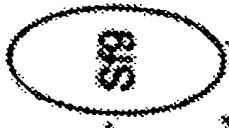


FIG 2(a)

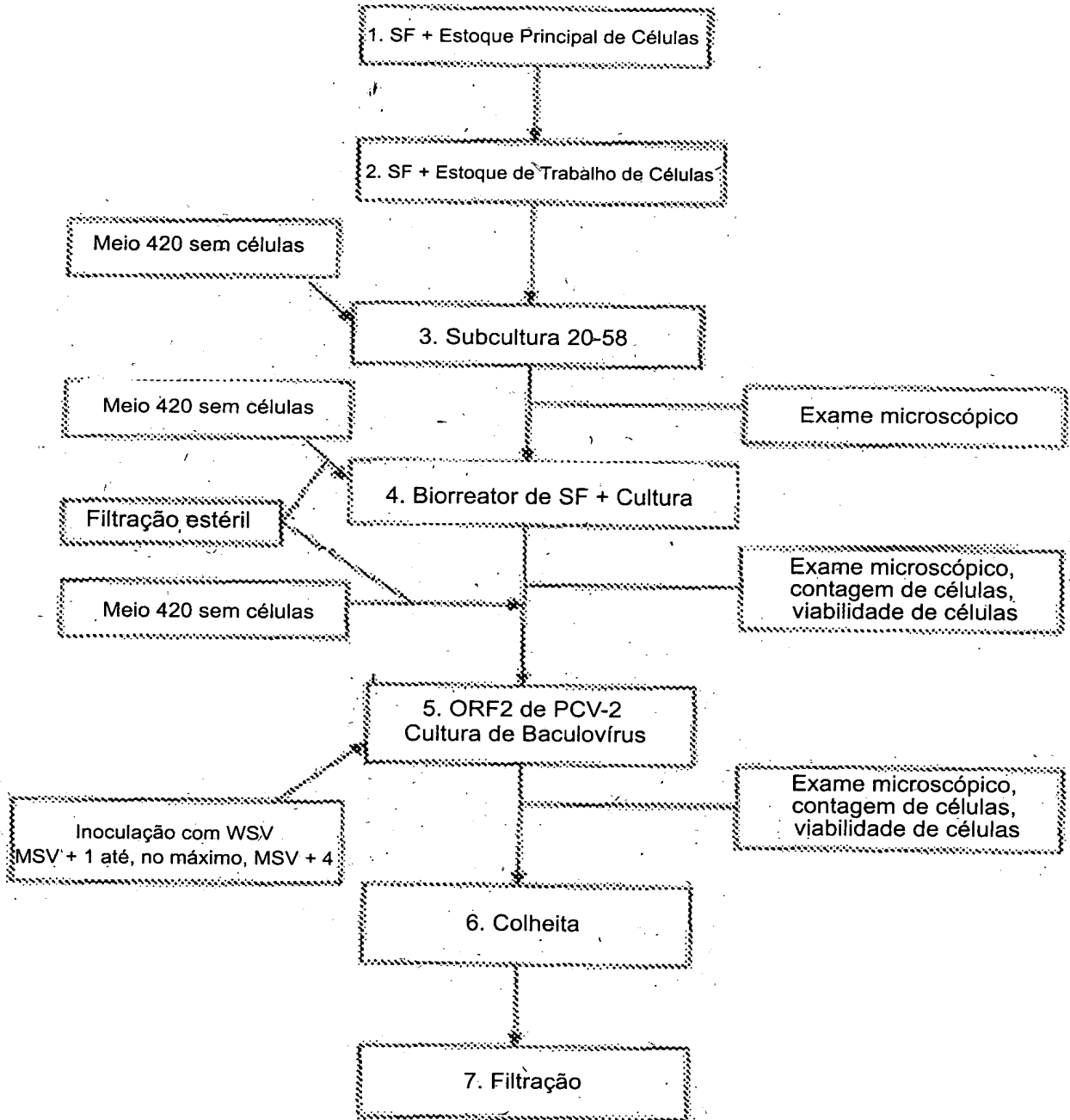
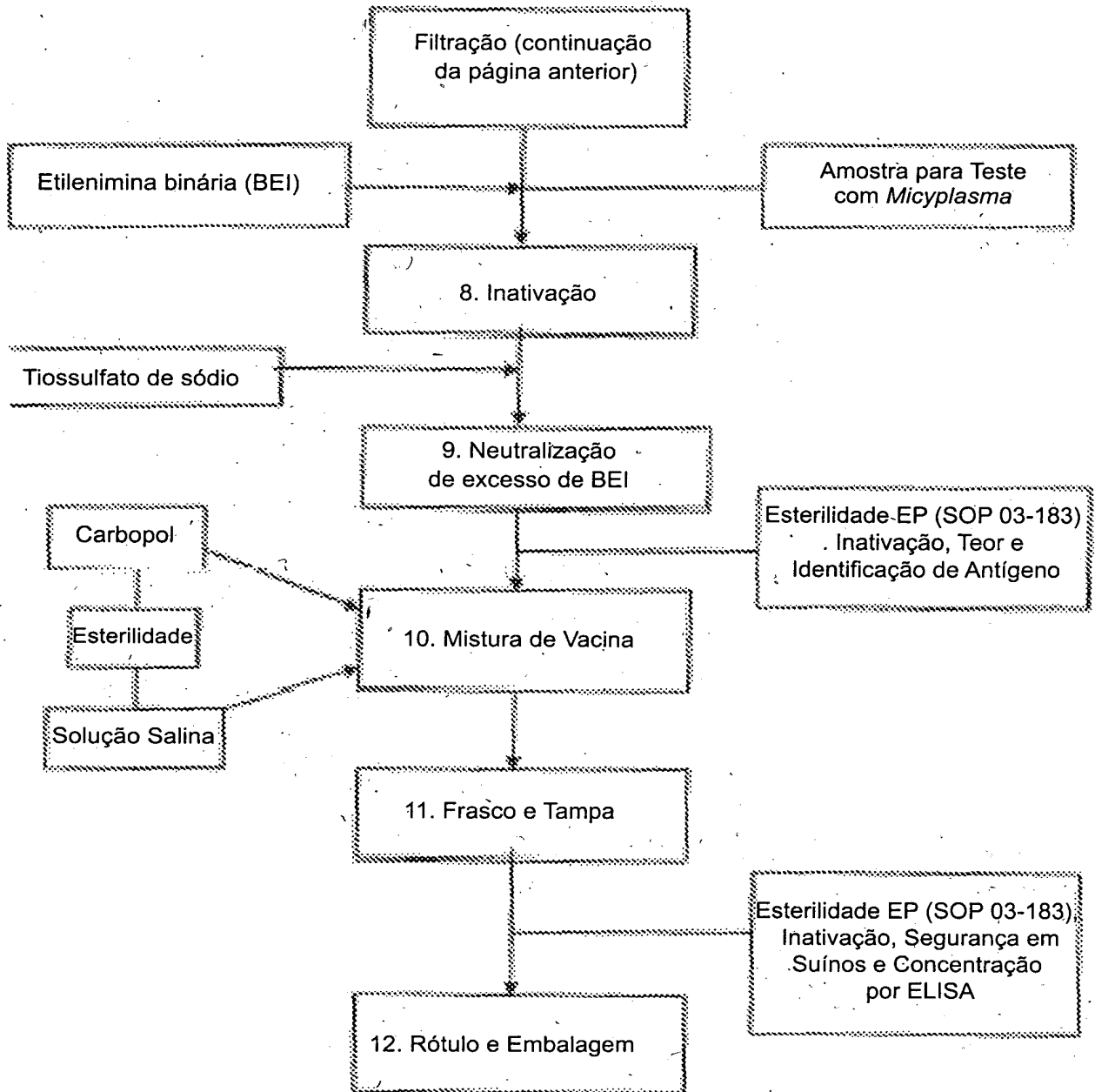


FIG 2(b)



RESUMO

Patente de Invenção: **"USO DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS CONTRA PCV2 PARA DIMINUIÇÃO DE SINTOMAS CLÍNICOS EM PORCOS"**.

A presente invenção refere-se ao uso de uma composição imunogênica, contendo um antígeno do circovírus suíno do tipo 2 (PCV2), para tratamento de várias manifestações clínicas (doenças). De preferência, as manifestações clínicas estão associadas à infecção por PCV2. De preferência, elas incluem linfadenopatia, depleção linfóide e/ou histiócitos multinucleados/gigantes. Além disso, os sintomas clínicos incluem linfadenopatia, combinada a um ou a vários dos seguintes sintomas, em porcos: (1) pneumonia intersticial com edema interlobular, (2) palidez cutânea ou icterícia, (3) fígado com lesões atróficas disseminadas, (4) úlceras gástricas, (5) nefrite e (6) distúrbios da reprodução, por exemplo, aborto, fetos natimortos, mumificados, etc. Ademais, os sintomas clínicos incluem lesões semelhantes as de EPS (Enteropatia Proliferativa Suína), normalmente associadas a infecções por *Lawsonia intracellularis*.