



DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH**

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Alemania

Departamento o Estado

Dirección

*Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH
Bayerstrasse 103*

Ciudad

D-55216 Ingelheim am Rhein

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio

Carrera 4 No. 72-35

Ciudad

Bogotá, Colombia.

Teléfono: 3-47-36-11

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

1- Dr. Knut ELBERS

2- Dr. Gregor MEYERS

Identificación

1- Brahmsstrasse 4, 55218 Ingelheim, Alemania.

Dirección

2- Albstrasse 1, 72141 Walddorfhaeslach, Alemania.

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

**VIRUS ATENUADOS E INOCUOS DE LA DIARREA
VÍRICA BOVINA PARA USO EN VACAS GESTANTES**

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País

(32) Fecha

(31) No. Solicitud

EP.

30 de Noviembre de 1999 ✓

99 123 767.8 ✓

Convención de París.

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo: 04484-801-007-8 RCB/mrm-ID.59

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

C12N 1/02

*AGIL 39/12
C12N 15/40
C07K 3/04*

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de virus BVD (diarrea vírica bovina) vivos y específicamente atenuados, para la preparación de una vacuna para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor, vacas gestantes y para la protección fetal en vacas gestantes.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|--|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☒ |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC | ☒ |
| Recibo de la tasa respectiva <i>por v/r de \$ 608.000.-</i> | ☒ |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Andina: | |
| Copia de la primera solicitud | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Unionista: | |
| Copia certificada de la primera solicitud: <i>Europa No. 99123 767.8</i> | ☒ |
| Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior | |
| Traducción simple | ☒ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios | ☐ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietario según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☒ |
| Extracto para publicación según formato | ☒ |
| Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms | ☐ |
| Otros Documentos | ☐ |

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE EMILIO FERRERO

438.019 de Usaquén

T.P.No. 81.929

***Virus atenuados e inocuos de la diarrea vírica bovina
para uso en vacas gestantes***

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de virus de la diarrea vírica bovina, BVD (del inglés Bovine Viral Diarrhea) vivos y específicamente atenuados para la preparación de una vacuna para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones por virus de la diarrea vírica bovina, BVDV (del inglés, Bovine Viral Diarrhea Virus) en ganado vacuno reproductor, vacas gestantes y para la protección fetal en vacas gestantes.

La invención también se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de infecciones BVDV en el grupo referido anteriormente de ganado vacuno.

15

Antecedentes de la invención

El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) es al agente causante de BVD y de la enfermedad de las mucosas en el ganado vacuno (Baker, 1987; Moennig y Plageman, 1992; Thiel y col., 1996). La infección fetal durante la gestación puede dar como resultado la resorción del feto, abortos así como el nacimiento de terneros inmunotolerantes que se infectan pertinazmente con BVDV. Estos terneros carecen de títulos de anticuerpos neutralizantes o los tienen en muy bajo nivel y están esparciendo continuamente altas cantidades de virus. Junto con los toros con infección aguda o pertinaz, estos terneros son la principal fuente para la propagación del virus y, por lo tanto, tienen una importancia fundamental en la epidemiología de esta enfermedad. El principal impacto económico de la BVD procede del alto porcentaje de abortos y elevado índice de mortinatalidad, resorción fetal, momificación, malformaciones congénitas y nacimiento de terneros débiles y con un peso inferior al normal. Para un análisis detallado de la patogénesis se hace aquí referencia al artículo de Moennig y Liess de 1995 en toda su extensión.

30

Se han descrito dos grupos antigénicos principales de BVDV (tipo I y II) (Becher y col., 1999) que exhiben reacciones cruzadas limitadas con anticuerpos neutralizantes (Ridpath y col., 1994).

BVDV y otros pestivirus tienen en común su capacidad para atravesar la

placenta de los animales hospedantes en estado de gestación. Las actuales vacunas BVDV vivas atenuadas también atraviesan la placenta de las novillas seronegativas y dan como resultado síntomas clínicos de las infecciones BVDV de tipo silvestre (véase Moennig y Liess, Orban y col., 1983; Liess y col., 1984).

- 5 Las actuales vacunas para la prevención y el tratamiento de infecciones BVDV poseen todavía inconvenientes (Oirschot y col., 1999).

Las vacunas muertas (virus enteros inactivados) o las vacunas subunitarias (proteínas víricas purificadas convencionalmente o proteínas víricas purificadas y expresadas heterológamente) son en su mayor parte inferiores a las vacunas vivas en
10 lo que se refiere a eficacia para producir una respuesta inmunológica protectora completa, incluso en presencia de coadyuvantes.

Con mucha frecuencia, las vacunas BVDV vivas, aunque atenuadas, están asociadas a graves problemas de seguridad. Como se ha mencionado anteriormente, atraviesan la placenta de las vacas gestantes y producen manifestaciones clínicas en
15 el feto y/o la inducción de terneros pertinazmente infectados. Por lo tanto, no pueden aplicarse a manadas reproductoras en las que hay vacas gestantes. Las vacas gestantes deben permanecer aisladas del ganado vacunado para proteger a los fetos y no pueden ser vacunadas en ese estado. Más aún, los BVDV vivos atenuados que experimentan reversión plantean una seria amenaza para el ganado vacuno. Para virus
20 atenuados obtenidos convencionalmente, en los que la atenuación es producida por múltiples pases convencionales, el origen molecular así como la estabilidad genética permanece desconocida y el estallido de virus que reversionan es impredecible.

Ciertas vacunas vivas con mutaciones definidas como base para su atenuación permitirían evitar las desventajas de la presente generación de vacunas
25 atenuadas. Una ventaja adicional de dichas mutaciones atenuantes radica en su exclusividad molecular que permite utilizarlas como marcadores característicos para pestivirus atenuados y distinguirlos de los pestivirus del campo.

En la Solicitud PCT N° PCT/EP 99/03642, se describen pestivirus de este tipo, vivos y específicamente atenuados, con un alto potencial para inducir inmunidad
30 así como una base definida de atenuación que también puede distinguirse de los pestivirus patógenos. En esta solicitud se ha demostrado que los pestivirus pueden ser atenuados específicamente por inactivación de la actividad RNasa que reside en la glicoproteína E^{RNS}. Los autores de la invención describen que este principio de atenuación es universal para todos los pestivirus y particularmente adecuado para

BVDV.

Esta solicitud describe una vacuna viva atenuada que es superior a las vacunas subunitarias y muertas en lo que se refiere a su eficacia de inducción de inmunidad, además de ser superior a las vacunas convencionalmente atenuadas, que
5 no están definidas molecularmente, no están marcadas y son impredecibles con respecto a sus mutantes. A partir de la técnica anterior, un experto asociaría de modo natural el riesgo de infección BVDV fetal cuando se vacunan con un virus vivo atenuado vacas gestantes o ganado vacuno en una relación de vecindad con las vacas gestantes. Esto sigue siendo un grave inconveniente que limita el uso de una vacuna
10 de esta clase.

Por lo tanto, el problema técnico que es la razón fundamental de esta invención era proporcionar vacunas BVDV vivas y atenuadas inocuamente que puedan utilizarse para la preparación de una vacuna viva para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV de vacas gestantes, o de ganado vacuno en
15 presencia de vacas gestantes.

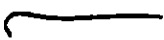
Descripción de la invención

La solución del problema técnico anterior se encuentra en esta descripción y en las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

20 Se ha encontrado de modo sorprendente que BVDV (virus de la diarrea vírica bovina) vivos, en los que la actividad RNasa que reside en su glicoproteína E^{RNS} está inactivada, no producen transmisión placentaria al feto cuando las vacas gestantes se vacunan con dicho virus. No son apreciables signos clínicos de ninguna clase en los terneros cuando se utiliza una cepa de BVDV con dicha característica para
25 exponer vacas gestantes a dicha cepa..

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso inesperado de un BVDV vivo, en el que la actividad RNasa que reside en su glicoproteína E^{RNS} está inactivada, para la preparación de una vacuna viva para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor.

30 De modo todavía más inesperado, las propias vacas gestantes pueden ser vacunadas con dicho BVDV específicamente atenuado. En consecuencia, en una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de dicho BVDV para la preparación de una vacuna viva para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en vacas gestantes.



Esto permite, por primera vez, prevenir y proteger al propio feto contra las infecciones BVDV empleando una vacuna viva. En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de dicho BVDV para la preparación de una vacuna viva para inducir protección fetal contra infecciones BVDV en vacas gestantes.

5 El término "vacuna", en el sentido utilizado aquí, se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un componente inmunológicamente activo que induce una respuesta inmunológica en un animal y posiblemente, aunque no es necesario, uno o más componentes adicionales que intensifican la actividad inmunológica de dicho componente activo. Una vacuna puede comprender adicional-
10 mente otros componentes típicos de las composiciones farmacéuticas. El componente inmunológicamente activo de una vacuna puede comprender organismos vivos completos, ya sea en su forma original o como organismos atenuados en lo que se conoce como una vacuna viva modificada (MLV, del inglés Modified Live Vaccine) u organismos inactivados por métodos apropiados en lo que se conoce como una
15 vacuna muerta (KV, del inglés Killed Vaccine). En otra forma, el componente inmunológicamente activo de una vacuna puede comprender elementos apropiados de dichos organismos (vacunas subunitarias), siendo generados estos elementos, o bien por destrucción del organismo entero o de los cultivos de crecimiento de estos organismos y subsiguientes etapas de purificación que producen la o las estructura(s)
20 deseada(s), o bien por procedimientos de síntesis inducidos por una manipulación apropiada de un sistema adecuado tal como, pero sin limitarse a ellos, bacterias, insectos, mamíferos u otras especies, además de procedimientos subsiguientes de aislamiento y purificación o por inducción de dichos procedimientos de síntesis en el animal que necesita una vacuna por incorporación directa de material genético
25 utilizando composiciones farmacéuticas adecuadas (vacunación con polinucleótidos). Una vacuna puede comprender uno o simultáneamente más de uno de los elementos descritos anteriormente.

Los componentes adicionales que intensifican la respuesta inmunológica son constituyentes normalmente conocidos como coadyuvantes, como por ejemplo
30 hidróxido de aluminio, aceites minerales o de otra clase o moléculas auxiliares añadidas a la vacuna o generadas por el cuerpo después de la inducción respectiva por los componentes adicionales de ese tipo, tales como, pero sin limitarse a ellos, interferones, interleuquinas o factores de crecimiento.

Una "composición farmacéutica" está constituida esencialmente por uno o

más ingredientes capaces de modificar las funciones fisiológicas, por ejemplo inmunológicas, del organismo al que se administra, o de los organismos que viven en su interior o en su superficie, tales como, pero sin limitarse a ellos, antibióticos o antiparasitarios, así como otros constituyentes que se le añaden con objeto de producir otros objetivos determinados como, pero sin limitarse a ellos, características de procesamiento, esterilidad, estabilidad, posibilidad de administrar la composición por rutas entéricas o parenterales tales como ruta oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica u otra ruta adecuada, tolerancia después de la administración, o propiedades de liberación controlada.

10 Una vacuna de la invención se refiere a una vacuna como se ha definido anteriormente, en la que un componente inmunológicamente activo es un BVDV vivo, en el que la actividad RNasa en su proteína E^{RNS} está inactivada.

La expresión "vacuna viva" se refiere a una vacuna que comprende un componente activo vivo, en particular un componente activo vírico vivo.

15 El término "BVDV" como se utiliza aquí, se refiere a todos los virus que pertenecen a las especies BVDV 1 y BVDV 2 del género pestivirus dentro de la familia Flaviviridae (Becher y col., 1999).

Las cepas más clásicas de BVDV de tipo I y las cepas más reconocidas recientemente de BVDV de tipo II exhiben algunas diferencias limitadas pero
20 características en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Estas diferencias son inmunológicamente distinguibles por los anticuerpos monoclonales. El principio de atenuación de inactivar la actividad RNasa en la proteína E^{RNS} como se ha descrito en la Solicitud Internacional citada anteriormente es universalmente aplicable y se mantiene verdadero para BVDV tanto de tipo I como de tipo II. La característica
25 sorprendente de que estos BVDV atenuados de esa manera no atraviesan la barrera placentaria y no conducen a manifestaciones clínicas de infecciones BVDV en el feto, se aplica a todos los tipos de BVDV. Por lo tanto, en una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de dicho BVDV para la preparación de una vacuna viva para el tratamiento y/o la prevención de infección fetal, vacas
30 gestantes y ganado vacuno reproductor.

La expresión "actividad RNasa" como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad de la glicoproteína E^{RNS}, que es una proteína inherente a todos los pestivirus naturales tales como BVDV, para hidrolizar el ARN.

Hay que señalar que la expresión "glicoproteína EO" se utiliza frecuentemente

como sinónimo de la expresión glicoproteína E^{RNS} en algunas publicaciones.

La expresión "inactivación de la actividad RNasa que reside en dicha glicoproteína" se refiere a la incapacidad o capacidad reducida de una glicoproteína E^{RNS} modificada para hidrolizar ARN, en comparación con el tipo silvestre no
5 modificado de dicha glicoproteína E^{RNS}.

La inactivación de la actividad RNasa que reside en la glicoproteína E^{RNS} se puede producir mediante delecciones y/o mutaciones de al menos un aminoácido de dicha glicoproteína, como se demuestra en la Solicitud Internacional PCT/EP99/03642 y por Hulst y col., (1998). Por lo tanto, en una realización muy preferida, la
10 presente invención se refiere al uso de BVDV vivo, donde dicha actividad RNasa está inactivada por delecciones y/o mutaciones de al menos un aminoácido de dicha glicoproteína.

La secuencia de aminoácidos para la cepa CP7 de BVDV está disponible, con fines de referencia, en el banco de datos GenBank/EMBL (número de acceso
15 U63479). Dos regiones de aminoácidos están altamente conservadas en la glicoproteína E^{RNS} así como en algunas proteínas RNasa activas de plantas y hongos (Schneider y col., 1993). Estas dos regiones son de particular importancia para la actividad enzimática RNasa. La primera región está constituida por la región de los aminoácidos entre la posición 298 y 310 y la segunda región está constituida por los
20 aminoácidos situados en las posiciones 341 a 360 de dicha poliproteína vírica como se ilustra para la cepa CP7 de BVDV (numerando de acuerdo con la secuencia deducida de aminoácidos de la cepa CP7; véase la Figura 1 para conocer la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína E^{RNS} de CP7). Los aminoácidos de particular importancia para la actividad RNasa, como se ha mencionado anteriormente, no se
25 limitan en absoluto a la posición exacta que se ha definido para la cepa CP7 de BVDV sino que simplemente se utilizan de manera ilustrativa para señalar los aminoácidos preferidos que están en esa posición o que corresponden a esa posición en cepas BVDV ya que están altamente conservados. Para pestivirus BVDV diferentes, la numeración de las posiciones de los aminoácidos preferidos podría ser diferente pero
30 cualquier experto en el campo de la biología molecular de los pestivirus identificaría fácilmente estos aminoácidos preferidos por su posición relativa a los aminoácidos altamente conservados de dicha glicoproteína.

En consecuencia, la presente invención se refiere, en una realización más preferida, al uso de BVDV de acuerdo con la invención, donde dichas delecciones y/o

mutaciones inactivantes están situadas en los aminoácidos de las posiciones 298 a 310 y/o de las posiciones 341 a 360 de dicha glicoproteína, como se describe para la cepa CP7 de BVDV de una manera ilustrativa, y en posiciones correspondientes a ellas en otras cepas de BVDV.

5 En una realización muy preferida, la presente invención describe el uso de un virus BVD vivo de acuerdo con la invención, donde dicha actividad RNasa es inactivada por la delección del resto de histidina en la posición 349 como se describe para la cepa CP7 de BVDV de manera ilustrativa o correspondiente a ella en otras cepas de BVDV, de dicha glicoproteína.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor, caracterizado porque una composición farmacéutica que comprende un virus BVD vivo, donde la actividad RNasa que reside en su glicoproteína E^{RNS} está inactivada, se aplica a un animal con necesidad de dicha profilaxis o tratamiento.

15 Para poner en práctica la invención es necesario preparar un BVDV de acuerdo con la invención. Esto puede hacerse con cualquier BVDV disponible que sea adecuado para efectuar sobre él una modificación recombinante. Un ejemplo de cómo obtener un virus de esta clase de acuerdo con la invención se da más adelante en el Ejemplo 2. El ejemplo demuestra la preparación de un virus para un uso de acuerdo
20 con la invención de una manera ilustrativa y de ningún modo es limitante. Un experto en el campo de la virología o de la biología molecular puede conseguir esto por métodos clásicos que están abundantemente descritos en la técnica.

 La aplicación de los virus vivos preferidos de acuerdo con la solicitud al grupo preferido de animales es idéntica a los métodos de aplicación que son asequibles y
25 se practican para otros virus atenuados vivos en la técnica.

Referencias

1. Baker, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea virus: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190: 1449-1458.
- 30 2. Becher, P., Orlich, M., Kosmidou A., König, M., Baroth M., Thiel H.J., 1999. Genetic Diversity of Pestivirus: Identification of Novel Groups and Implications for Classification. Virology 262: 64-71.
3. Fuerst T.R. et al. 1986. Eukaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase.

Proc. Nat. Acad. Sci. 83: 8122-8126.

4. Huist, M.M., F.E. Panoto, A. Hoekmann, H.G.P. van Gennip., and Moormann, R.J.M. 1998. Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{nm} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus, *J. Virol.* 72: 151-157.
- 5 5. Kunkel, T. A., J. D. Roberts, and R. A. Zakour. 1987. Rapid and efficient sitespecific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154:367-392.
6. Meyer, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J., & Kümmerer, B.M. 1996b. Recovery of citopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses
10 from cDNA constructs. *J. Virol.*, 70: 8606-8613.
7. Meyers, G., Thiel, H.-J., and Rüménapf, T. 1996a. Classical swine fever virus: Recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic swine fever virus. *J. Virol.* 67:7088-709526.
8. Moennig, V. and Plagemann, J. 1992. The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 41: 53-
15 91.
9. Moennig, V. and Liess, B. 1995. Pathogenesis of Intrauterine Infections with Bovine Viral Diarrhea Virus. 11: (3), 477-487.
10. Oirschot van, J.T., Bruschke, C.J.M., Rijn van, P.A., 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 64: 169-183.
- 20 11. Sandvik, T., Paton D.J., Lowings P.J. 1997. Detection and Identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions. *J. Virol Methods* 64: (1) 43-56.
12. Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer, and H.-J. Thiel. 1993. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease.
25 *Science* 261: 1169-1171.
13. Thiel., H.-J., Plagemann, G.W., & Moennig, V. 1996. The pestiviruses. In *Fields Virology*, eds. Fields. B.N. Knipe, D.M., & Howiev. P.M. (Lippincott-Raven, Philadelphia), págs. 1059-1073.
14. Weiland, E., Thiel, H.-J., Hess, G., and Weiland, F. (1989). Development of
30 monoclonal neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea virus after pretreatment of mice with normal bovine cells and cyclophosphamide. *J. Virol. Methods* 24: 237-244.

Ejemplos

Ejemplo 1 Estudio de exposición fetal a BVDV

Diseño experimental

5 Se seleccionaron seis novillas en estado de gestación a partir de una manada no infectada por BVDV. En la prueba, se incluyeron dos grupos de 3 novillas cada uno. Los animales de los grupos se mantuvieron aislados, asegurando por tanto la ausencia de infección cruzada y externa.

Tabla 1

10

Grupo Nº	Nº de animales	Virus	Ruta de aplicación	Dosis por ruta TCID ₅₀
1	3	NCP7	i.m.; i.n.; i.t.; s.c.;	1,2 x 10 ⁵
2	3	B-349-d	i.m.; i.n.; i.t.; s.c.;	1,2 x 10 ⁵

15 Las novillas de los grupos 1 a 2 fueron inoculadas con una TCID₅₀ de al menos 10⁵ BVDV en un volumen de 3 ml por ruta. Las rutas de aplicación fueron intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.), intranasal (i.n.) (1,5 ml por orificio nasal) e intratraqueal (i.t.).

20 Se tomaron muestras de sangre de los animales para realizar los análisis serológicos y virológicos. Las novillas fueron vigiladas regularmente para determinar la presencia de signos clínicos de infección BVDV durante el período de observación. El experimento se dio por terminado después del nacimiento de los terneros mediante un análisis para detectar infección por BVDV. Los principales parámetros de la evaluación fueron el número de abortos relacionados con BVDV y el número de
25 terneros nacidos virémicos o que tenían anticuerpos frente a BVDV.

Preparaciones de capas leucocitarias

30 Se recogió sangre en recipientes estériles adecuados precargados con solución de heparina (heparina sódica para inyección. 5.000 UI/ml; Gedeon Richter RT; Budapest, Hungría) asegurándose de que hubiera al menos 20 UI de heparina por ml de sangre en la muestra de sangre.

Se centrifugó sangre durante 10 min a 750 g a 4°C. Los eritrocitos sedimentaron en la mitad inferior del tubo mientras que el plasma constituía el sobrenadante en la mitad superior del tubo. Encima de la cabeza de los eritrocitos, la

llamada interfase, estaban situados los leucocitos. Esta capa fina de glóbulos blancos se recogió con una pipeta estéril y después se resuspendió muy cuidadosamente en el nuevo tubo cargado con tampón de Gay (NH_4Cl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 6,5 mM, KH_2PO_4 1,5 mM). La suspensión se mantuvo sobre hielo durante 10 minutos.

- 5 Las células se centrifugaron nuevamente (10 min, 750 g, 4°C) y el sobrenadante se desechó. El tratamiento con tampón de Gay se se repitió hasta que no se observó ninguna cantidad sustancial de eritrocitos en la suspensión. Entonces las células se lavaron dos veces en RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein, Alemania) con FCS al 5% (suero vacuno fetal, aproximadamente 20 ml) y seguidamente se centrifugaron. Las
- 10 capas leucocitarias obtenidas se resuspendieron en un pequeño volumen (2 ml) de RPMI 1640, FCS al 5% y se congelaron a -70°C en dos alícuotas de 1 ml. Las capas leucocitarias se utilizaron para la determinación de BVDV asociado a las células hemáticas.

Ensayo ELISA de anticuerpos frente a BVDV

- 15 Se recogieron al menos 10 ml de sangre reciente en cada momento de muestreo a partir de cada animal. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y se separó por centrifugación. Cada muestra de suero se ensayó para determinar la presencia de anticuerpos frente a BVDV utilizando un ensayo ELISA adecuado y validado (Svanovir® ensayo de anticuerpos BVDV N° de catálogo 10 2200-10). El
- 20 ensayo fue validado y realizado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las muestras positivas se diluyeron de acuerdo con la escala $\log_2$ para determinar títulos de anticuerpos frente a BVDV.

Virus para la exposición a la infección fetal

- Se aplicó la cepa B349-d al grupo 2. Esta cepa es casi idéntica a la NCP7
- 25 que se aplicó al grupo 1, excepto en una sola delección de la histidina en la posición 349 de su secuencia de aminoácidos. La cepa B349-d se preparó de acuerdo con el procedimiento enunciado más abajo.

Detección de BVDV a partir de muestras de capa leucocitaria o tejido por el procedimiento de aislamiento del virus seguido por un ensayo de inmunofluorescencia

- 30 indirecto (IFT)

Para el aislamiento del virus, se utilizó una suspensión al 20% de tejidos. suero o capa leucocitaria.

Una cantidad de 1 g de material orgánico se homogeneizó utilizando un mortero y un almirez. se diluyó hasta 5 ml con solución salina tamponada con fosfato

(PBS) y se centrifugó a 1.500 * g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se filtró en condiciones estériles utilizando soportes de filtros de 0,45 µm, Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania, y se utilizó para el aislamiento del virus.

Se efectuó la propagación del virus en células de riñón bovino Marbin Darby (MDBK) en forma de monocapa en placas de 24 pocillos con medio EMEM, que contenía 10% de suero vacuno fetal, 1% de aminoácidos no esenciales y 0,15% de antibióticos. Antes de empezar, las células se ensayaron para determinar su contaminación con BVDV por RT-nPCR como se describe más abajo, y por un ensayo de inmunofluorescencia (IFA).

Después de su división, las células se infectaron todas ellas simultáneamente con 100 µl de suspensión, suero o capa leucocitaria por duplicado. Al cabo de 5 días, una alícuota de los cultivos de células se congeló y descongeló.

Dos alícuotas de 100 µl del lisado de células se pasaron dos veces a suspensiones de células MDBK. Una alícuota se fijó con etanol y se guardó a -20°C para la detección del virus por ensayo de inmunofluorescencia (IFA).

Los cultivos de células infectadas se ensayaron por IFA. Las células se fijaron por incubación con etanol frío a -20°C. Las placas de 24 pocillos fijadas se lavaron dos veces con PBS. A continuación los pocillos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con mezcla αBVDV-mAb (Weiland y col, 1989). La mezcla αBVD-mAb se diluyó 1:10 en PBS. Después de lavar tres veces con PBS, se añadió antisuero conjugado FITC de ratón-rab.α (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA 19390, EE.UU.) en una solución de 1:150 en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, se añadió glicerol-PBS (1:1) y los cultivos de células teñidas fueron investigados por microscopia de inmunofluorescencia.

Detección de BVDV a partir de suero, capa leucocitaria y muestras de tejido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se extrajo ARN por cromatografía en columna utilizando un equipo "QIAamp Viral Mini Kit" para muestras de suero y un equipo "RNeasy Mini Kit" para material orgánico y capa leucocitaria, de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Ambos equipos son obtenibles a partir de Qiagen LTD, Hilden, Alemania.

RT-nPCR

Se utilizaron pares de cebadores para la detección de pestivirus por RT-nPCR, como ha sido descrito previamente por Sandvik y col. (1997). Las secuencias de los

cebadores externos son:

(P103F) '5-TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC T-3'

(P365R) '5- TGT GCC ATG TAC AGC AGA GAT T -3'

Los cebadores externos generaron un fragmento de ADN de 280-284 pares
5 de bases de longitud.

Las secuencias de los cebadores internos fueron las siguientes:

(B145F) '5-AAC AGT GGT GAG TTC GTT GGA T-3'

(B314F) '5-CAC CCT ATC AGG CTG TAT TCG T-3'

Los cebadores internos generaron un fragmento de ADN de 191 pares de
10 bases de longitud.

Se utilizó un volumen de ARN total de 5 µl (1 µg - 1 pg) para la multiplicación por RT-PCR, utilizando el equipo "Titan One Tube Kit", Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, la RT-PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl, que contenía 1 *RT-PCR, dNTPs 0,1 mM, 20 pmol de cebador sentido y antisentido,
15 ditiotreitól 5 mM, cloruro de magnesio 1 mM, 2,5-5 unidades de RNasina, Promega Ltd., 1-2,5 unidades de mezcla de enzimas, AMV-RT y Taq polimerasa, y 25 µl de agua destilada, que contenía 0,1% de pirocarbonato de dietilo.

Las condiciones para los ciclos de RT-PCR fueron las siguientes:

42°C durante 1 hora, 95°C durante 5 min y 35 ciclos de 94°C durante 1 min,
20 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, finalmente prolongación durante 10 min.

Se utilizó 1 µl de producto PCR como molde para la PCR anidada, utilizando Qiagen Taq (Qiagen LTD, Hilden, Alemania).

La nPCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl, que contenía tampón 1 *PCR, cloruro de magnesio 3,5 mM, dNTPs 0,1 mM cada uno, 20 pmol de cada uno
25 de los cebadores y 2,5 unidades de Taq. El perfil de temperatura de la PCR anidada para 30 ciclos fue 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, seguido por una última multiplicación prolongada. Un volumen de 5 µl de producto de nPCR fue analizado por electroforesis en tampón de tris-acetato EDTA, utilizando 1 % de agarosa y una tinción con 1 µg/ml de bromuro de etidio. El producto amplificado
30 se identificó por comparación de tamaños con una escala normalizada de 100 pares de bases (pb) de peso molecular (Gibco BRL, Eggenstein, Alemania), y la especificidad de los productos PCR se verificó por análisis de secuencia.

Para realizar PCRs sin contaminación cruzada, se utilizó el RoboAmp 4200 (MWG Biotech. Ebersberg, Alemania) para el pipeteo automatizado. El termociclo se

gestación. La necropsia del feto reveló una inflamación serofibrinosa aguda del corión que fue la causa de un suministro insuficiente de oxígeno del feto y posterior asfixia. Los dos animales restantes tuvieron, respectivamente, un ternero después de 278 días de gestación (n° 13178) y después de 296 días de gestación (n° 11093).

Detección del virus a partir de muestras clínicas obtenidas de abortos o de terneros recién nacidos

En el caso de un aborto, se investigaron muestras de diferentes órganos tales como cerebro, bazo o riñón por PCR y/o IFT para BVDV. Todas las muestras clínicas obtenidas a partir del feto abortado de la vaca 11736 en el grupo 1 fueron negativos en BVDV. Las muestras de capa leucocitaria de terneros nacidos de las vacas 11093 y 13178 fueron positivos en BVDV, como se confirmó por IFT y PCR. En cambio, las muestras de capa leucocitaria y suero de los terneros nacidos de las vacas 10565, 110606 y 12031 del grupo 2 fueron todas negativas en BVDV, lo que se confirmó por los métodos mencionados anteriormente. Los datos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Evaluación de la transmisión fetal						
Grupo	Animal N°	Virus de exposición	Ternero N°	Aborto/ vivo	Conclusión a partir de los datos de detección del virus	Porcentaje de transmisión placentaria del grupo
1	11093	NCP7	11093 c	vivo	pos	66%
	11736		11736 c	aborto	neg	
	13178		13178 c	vivo	pos	
2	10565	B349-d	10565 c	vivo	neg	0%
	11060		11060 c	vivo	neg	
	12031		12031 c	vivo	neg	

Datos serológicos a partir de ganado vacuno en gestación

Al seleccionarlas y el día de la infección, las vacas gestantes no estaban infectadas por BVDV. Las muestras de suero de todos los animales participantes en la prueba que se recogieron un mes después de la infección eran seropositivas en BVDV. El carácter positivo del suero se confirmó para BVDV en toda la prueba reinvestigando muestras de suero obtenidas en una base mensual a partir de todos los animales. Los datos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

DATOS DE ELISA PARA ANTICUERPOS

10

Vaca Nº	Grupo	Anticuerpos específicos para BVDV en sueros tomados en el momento de									
		la selec- cción	la infec- cción	meses PI						Al terminar	
				1	2	3	4	5	6	vaca	ternero*
11093	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
13178	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
11738	1	-	-	+	+	+	+	Ab.*	NA	NA	NA
11060	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
10565	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
12031	2	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

15

PI = después de la infección; *antes de la primera ingesta de calostro; NA = no aplicable;
° después del aborto las vacas se retiraron del estudio, Ab. = aborto

20

Discusión y conclusiones

25

Como 2 de cada 3 terneros nacidos en el grupo 1 que fueron infectados con NCP7 eran virémicos para BVDV al nacer mientras que ningún ternero nacido en el grupo 2 que había sido infectado con B-349-d lo era, estos datos proporcionan una clara evidencia de que la modificación genómica introducida en B-349-d suprime la capacidad del virus padre NCP7 de inducir infección fetal.

Ejemplo 2 Generación de mutantes de BVDV negativos en RNasa

30

Partiendo de los clones Pa/BVDV de ADNc de longitud completa (Meyer y col., 1996b), a partir de los cuales se puede obtener ARNc infeccioso por transcripción *in vitro*, se generaron subclones. Un fragmento XhoI BclII de pA/BVDV se clonó en el plásmido pCITE-2C, cortado con las mismas enzimas. Se produjo ADN

plasmídico monocatenario a partir de estas construcciones de acuerdo con el método de Kunkel (Kunkel y col., 1987) utilizando células de E. coli CJ 236 (BioRad) y el fago monocatenario VCMS (Stratagene). El ADN monocatenario se convirtió en bicatenario utilizando el estuche de mutagénesis *in vitro* Phagemid (BioRad). Un oligonucleótido
5 sintético que se utilizó como cebador para generar el mutante de BVDV deseado es el expresado a continuación a modo ilustrativo:

B-349-d: CATGAATGGAACAAAGGTTGGTGCAACTGG

El ADN plasmídico bicatenario se utilizó para la transformación de células E. coli XL 1-Blue (Stratagene). Las colonias bacterianas que albergaban plásmidos fueron
10 aisladas vía selección con ampicilina. Se preparó ADN plasmídico y posteriormente se analizó por secuenciación de nucleótidos utilizando el estuche de secuenciación de polimerasa de T7 (Pharmacia). Los plásmidos que contenían las mutaciones deseadas y ningún cambio en segundos sitios fueron utilizados para la construcción de clones de ANDc de longitud completa. Para obtener el mutante CP7 de BVDV, un fragmento
15 Xol/BglII que contenía la delección fue insertado en pA/BVDV cortado con XhoI y NcoI junto con un fragmento BglII/NcoI aislado a partir de pA/BVDV/Ins-. A partir de la construcción pA/BVDV/Ins-, se transcribió un ARNc que da lugar a un BVDV no citopatógeno tras su transfección en células adecuadas (Meyers y col., 1996b).

Se amplificaron los diferentes clones de longitud completa y se aislaron los
20 plásmidos. La presencia de las mutaciones deseadas fue demostrada por secuenciación de ADN. Después de linearizar con SmaI, el ARNc se transcribió como se ha descrito previamente (Meyers y col., 1996ab). El ARN se purificó por filtración en gel y extracción en fenol/cloroformo y se utilizó para transfección de células de riñón bovino (clon B2 de MDBK). Las transfecciones fueron analizadas por inmunofluores-
25 cencia con antisueros específicos frente al virus. El mutante deseado pudo ser recuperado (como se confirmó por inmunofluorescencia). El virus fue amplificado por pase en la misma línea celular utilizada para los experimentos de transfección.

El análisis adicional del mutante incluía la determinación de curvas de crecimiento en una etapa y caracterización de ARN vírico por transferencia Northern
30 con sondas de ADNc específicas para el virus así como una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y secuenciación subsiguiente de los fragmentos PCR para verificar la presencia de las mutaciones deseadas en el genoma vírico. Los virus recuperados crecieron tan bien como el virus resultante del plásmido que exhibía la secuencia de tipo silvestre, y produjeron cantidades similares de ARN.

La viabilidad del mutante de BVDV se demostró por transfección del ARNc respectivo y división de las células 3 días después. Parte de las células se sembraron en una placa de 3,5 cm de diámetro, se fijaron con acetona/metanol el día después y se analizaron por inmunofluorescencia con una mezcla de anticuerpos monoclonales
5 específicos para BVDV (Weiland y col., 1989). Se encontró que todas las células eran positivas mientras que un testigo de células transfectadas con ARN no infeccioso no dio ninguna señal. A partir de una porción de las células transfectadas con el ARNc respectivo, se produjo un extracto por un ciclo de congelación y descongelación. Se infectaron células recientes con este extracto de células y resultó ser positivo en
10 BVDV por inmunofluorescencia específica para BVDV 3 días después de la infección.

La Tabla 1 presenta los cambios introducidos en las secuencias conservadas de E^{RNS}, que representan el presunto sitio activo de la RNasa, que son codificadas por el mutante del virus.

Tabla 1

15	Nombre	Secuencia en el segmento de RNasa	Actividad RNasa	Viabilidad del mutam	
	pA/BVDV	... S L <u>H</u> G I W P E K I C ...	... R H E W N K <u>H</u> G W C N W ..	+	+
	B-349-d	... S L <u>H</u> G I W P E K I C ...	... R H E W N K _ G W C N W ..	-	+

Leyenda para la Tabla 1: El ensayo para determinar la actividad RNasa se hizo en un
20 ensayo transitorio. Se infectaron células BHK21 con el virus Vaccina vTF7-3 (Fuerst y col., 1986) y después se transfectaron con la respectiva construcción de ADNc (5 µg de ADN plasmídico, transfección utilizando Superfect según las recomendaciones del suministrado (Qiagen)). Después de 10 horas de incubación a 37°C en una incubadora de CO₂, las células transfectadas se lisaron y procesaron para determinar
25 la actividad RNasa como se describe más adelante. La viabilidad se determinó como se describe más adelante.

Ejemplo 2 Efecto de la mutación en la posición 349 de la cepa CP7 de BVDV sobre la actividad RNasa de E^{RNS}

30 Para evaluar el efecto de la delección en la posición 349 sobre la actividad RNasa de E^{RNS}, se infectaron células apropiadas con los virus mutantes.

Para el mutante de BVDV, la actividad RNasa se ensavó con material obtenido después de la transfección de ARN sin base de los virus recuperados. Las células transfectadas con el ARN apropiado se dividieron 72 h después de la

transfección y se sembraron en dos placas. 24 h después, se prepararon extractos celulares a partir de una placa y se analizaron para determinar su actividad RNasa. La infección con virus de tipo silvestre sirvió como un testigo positivo mientras que las células no infectadas se utilizaron como testigo negativo. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se lisaron en 0,4 ml de tampón de lisis (Tris/HCl 20 mM; NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 2 mg/ml de albúmina de suero bovino; 1% de Triton X100; 0,1% de ácido desoxicólico; 0,1% de dodecil-sulfato sódico). El lisado se puso en tubos de reacción de 1,5 ml, se sonicó (sonicador Branson B12, 120 watos, 20 s en un baño de agua coniforme), se clarificó por centrifugación (5 min, 14.000 rpm, centrífuga Eppendorf, 4°C) y el sobrenadante se sometió a ultracentrifugación (ultracentrífuga de mesa Beckmann, 60 min a 4°C y 45.000 rpm en un rotor TLA 45). La determinación de la actividad RNasa se hizo en un volumen total de 200 µl que contenía 5 ó 50 µl del sobrenadante de la segunda etapa de centrifugación y 80 µg de Poli(rU)(Pharmacia) en tampón de ensayo RNasa (Tris-acetato 40 mM (pH 6,5), EDTA 0,5 mM, ditiotreitól 5 mM (DTT)). Después de la incubación de la mezcla de reacción a 37°C durante 1 hora, se añadieron 200 µl de ácido perclórico 1,2 M, LaSO₄ 20 mM. Después de 15 min de incubación sobre hielo, la mezcla se centrifugó durante 15 min a 4°C y 14.000 rpm en una centrífuga Eppendorf. Al sobrenadante, se añadieron 3 volúmenes de agua y una alícuota de la mezcla se analizó midiendo la densidad óptica a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 3000 (Pharmacia). La mutación introducida en el gen E^{RMS} suprimió completamente la actividad RNasa (Tabla 5).

Para probar la infección, las células de la segunda placa se analizaron por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos para BVDV (Weiland y col., 1989) y resultaron ser seropositivos al 100%

Tabla 5

	CP7	B-349-d	testigo
DO ₂₆₀	2,5	1,1	1,1

Descripción de la Tabla 5

CP7: virus recuperado de pA/BVDV/Ins-; B-349-d: virus recuperado de pA/B-349-d; testigo: extracto de células MDBK no infectadas.

Figura 1 Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína ETM de BVDV CP VII

1 ENITQWNLQDNGTEGIQRAMFQRGVNRLHGIWPEKICTGVPSHLATDTE
5 51 LKAIHGMMDASEKTNYTCCRLQRHEWNKHGWCNWNIEPWILLMNKTQAI
101 LTEGQPLRECAVTCRYDRDSDENNVTFGARDSPTPLTGCKKGNFSFAGIL
151 VQGPCNFEIAVSDVLFKEHDCTSVIQDTAHYLVDGMTNSLESARQG TAKL
10 201 TTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA

Las secuencias que contienen los restos conservados con respecto a las RNasas conocidas están subrayadas. Los dos restos de histidina que presuntamente están en el centro catalítico de la enzima se indican en caracteres en negrilla. La secuencia mostrada corresponde a los restos 271 a 497 de la poliproteína de CP 7.

REIVINDICACIONES

1. Un BVDV vivo (virus de la diarrea vírica bovina), en el que la actividad RNasa que reside en su glicoproteína E²⁰⁰ está inactivada, para la preparación de una vacuna viva para us en la prevención y/o tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor. *da.*
2. BVDV de acuerdo con la reivindicación 1, para ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en vacas gestantes.
3. BVDV de acuerdo con la reivindicación 1, para inducir protección fetal contra infecciones BVDV en vacas gestantes. *xujs*
4. BVDV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV de tipo I.
5. BVDV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV de tipo II.
6. BVDV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha actividad RNasa está inactivada por deleciones y/o mutaciones de al menos un aminoácido de dicha glicoproteína. *Cue?*
7. Virus BVD de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para ser utilizada en la prevención y/o tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor que comprende un pestivirus BVDV, en el que dicha actividad RNasa está inactivada por la delección del resto de histidina en la posición 349, como se describe en la Figura 1 para la cepa CP7 de una manera ilustrativa o correspondiente a ella en otras cepas BVDV, de dicha glicoproteína. *residuo*
da?
da.
Virus q' contiene un pestivirus
O una composición.

COLO: 04484-801-007-8

ID:58

R E S U M E N

Esta invención se refiere al uso de virus BVD (diarrea vírica bovina) vivos y
5 específicamente atenuados, para la preparación de una vacuna para uso en la
prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor,
vacas gestantes y para la protección fetal en vacas gestantes.

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, D. C. COLOMBIA

Für Patente, Modelle, Muster, Warenzeichen,
Dienstleistungsmarken, Handelsnamen und
Embleme.

Para patentes, modelos y dibujos; marcas de fábrica
y de servicios; nombres comerciales y enseñas.

REPRESENTACION Y PODER.

VERTRETUNG UND VOLLMACHT

4484
0569

ICH (wir) Unterzeichnende (r) / Yo (nosotros), abajo firmado (s)
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH ✓

wohnhaft in / domiciliado (s) en **D-55216 Ingelheim am Rhein**
Federal Republic of Germany

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el suplente tomará su lugar. Cuando causare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrá ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos;

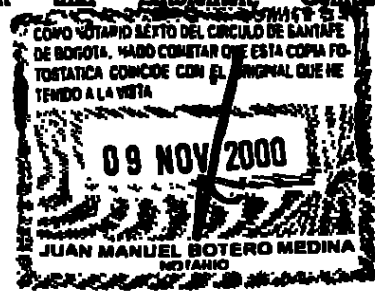
ernenne(n) hiermit in Übereinstimmung mit Abs. 1 des Artikels 543 des Handelsgesetzbuches GERMAN CAVELIER (Rechtsanwaltsausweis Nr. 832), GONZALO PERDOMO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 831), EMILIO FERRERO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 31929) und LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (Rechtsanwaltsausweis Nr. 23555), mit Geschäftssitz in Bogotá/Kolumbien, Carrera 4ª N° 72-35 zu meinen (unseren) Prozessbevollmächtigten (German CAVELIER zum Hauptbevollmächtigten, die anderen - in der genannten Reihenfolge - zu seinen Stellvertretern) in allen Angelegenheiten, die das Gewerbliche Eigentum betreffen. Sie sind befugt, Zustellungen entgegenzunehmen und Prozessbevollmächtigten und außergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter hat Herrn GERMAN CAVELIER bei dessen Abwesenheit oder im Falle einer vorübergehenden oder endgültigen Verhinderung zu vertreten. Dasselbe gilt, wenn der zweite Stellvertreter den ersten, oder aber der dritte den zweiten, zu vertreten hat. In diesen Fällen wird der Hauptvertreter, oder gegebenenfalls der erste oder zweite Stellvertreter, oder beide, in Form einer durch einen Notar (in Kolumbien) oder durch einen Notar oder sonstigen öffentlichen Beamten oder Konsul von Kolumbien (im Ausland) beglaubigten Erklärung seine Absicht, die Vertretung nicht auszuüben, zum Ausdruck bringen. Sollte eine Verhinderung der Grund dafür sein, ist die entsprechende Bescheinigung beizufügen. Sollte einer der Ernannten endgültig ausscheiden, nimmt der Nachfolgende seine Stelle ein. Bei Beendigung der Abwesenheit oder Verhinderung des Hauptvertreters oder seines ersten oder zweiten Stellvertreters, können GERMAN CAVELIER oder aber - je nach Fall die entsprechenden Stellvertreter, die Vertretung ohne weiteres wieder übernehmen und die jeweilige Stellvertretung gilt als aufgehoben.

Außerdem erteile ich (erteilen wir) den oben genannten Rechtsanwälten die Vollmacht, den Schutz meines (unseres) Gewerblichen Eigentums und bei Unlauterem Wettbewerb zu erlangen. Zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten zur Vertretung vor sämtlichen Stellen oder Personen, gleichgültig ob diese rechtsprechende Gewalt ausüben oder nicht, vor allem vor den Verwaltungsbehörden, vor der Verwaltungsgerichtsbarkeit und Gerichten, als auch vor den Schiedsgerichten und zwar in allen Fragen, die sich auf folgende Angelegenheiten beziehen: a) Erlangung von Patenten für Erfindungen, Gebrauchsmustern, Industriezeichnungen, die Eintragung von Warenzeichen, Verbandszeichen, Defensivmarken, Dienstleistungsmarken, Werbeslogans, Handelsnamen und Emblemen, Geschäftsarten und

A la vuelta →

Weiter →

CAVELIER ABOGADOS
W/PODERE-11 (MINUT/N° 12.1.14.1a)



acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Herkunftsbezeichnungen, ihre Erneuerung, Übertragung, Änderung des Namens, oder des Geschäftssitzes, der freiwilligen Verzicht und die Eintragung von Nutzungslizenzen für diese Rechte; b) Klagen wegen Unlauterem Wettbewerb, Verbraucherschutz, Widersprüchen und Einsprüchen, Verwaltungsrechtlicher und gerichtlicher Löschung, Nichtigkeit, einstweiligen Verfügungen Konzessionen Lizenzen, der "tutela" und allgemein für zivil-, straf-, verwaltungsrechtlichen und verwaltungsgerichtlichen Prozessen, die mit diesen Rechten in Verbindung stehen und die wir betreiben oder die gegen uns anhängig gemacht werden. Wir ermächtigen sie ebenfalls dazu, in allen, oben genannten Angelegenheiten einen Unterbeauftragten einzusetzen, Vergleiche abzuschließen, zu schlichten, Prozessschverhalte anzuerkennen, zurückzutreten, zu quittieren, in Empfang zu nehmen, Verzicht zu erklären und die Rechtsgeschäfte nicht bevollmächtigter Personen, zu genehmigen.

Geschehen und unterzeichnet am/Dado y firmado hoy August 2, 1996

Ingelheim am Rhein

In/en

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

ppa.

Unterschrift

Firma

Reinhold Fleschhut

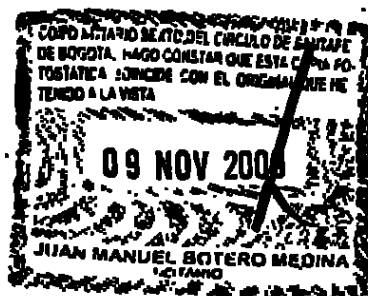
Dr. Dieter Laudien

Managing Director
LEGALIZACION

Director of Corporate Patent Department
BEGLAUBIGUNG

Es necesaria la legalización con certificado consular sobre la existencia legal de la compañía, que éste ejerce su objeto social y que la persona que otorga el poder está autorizada para ello. A este efecto les solicitamos que muestren al Cónsul las pruebas que acreditan estos hechos.

Es wird eine Beglaubigung und eine Konsularbescheinigung darüber benötigt, daß die Gesellschaft rechtlich besteht, daß sie ihren Gesellschaftszweck erfüllt und daß die Person, die die Vollmacht erteilt, dazu rechtlich befugt ist. Zu diesem Zweck bitten wir Sie höflich, dem Konsul die entsprechenden Nachweise vorlegen zu wollen.



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

Umseitige, vor mir gefertigte Namensunterschriften von:

1. Herrn (Dr.) Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,
2. Herrn Dr. Dieter L a u d i e n, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,

- mir vorgestellt durch die Sekretärin Frau Ingrid May, dienstansässig bei der Firma Boehringer Ingelheim GmbH, die sich durch Vorlage ihres Führerscheines ausgewiesen hat -

beglaubige ich hiermit.

Aufgrund meiner heutigen Einsicht in das Handelsregister des Amtsgerichts Bingen bescheinige ich hiermit:

Die Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH mit Sitz in Ingelheim am Rhein wurde am 12. Juni 1978 im Handelsregister unter HR B 1491 eingetragen und die Herren (Dr.) Reinhold Fleschhut und Dr. Dieter Laudien sind gemeinsam zur Vertretung der Gesellschaft berechtigt.

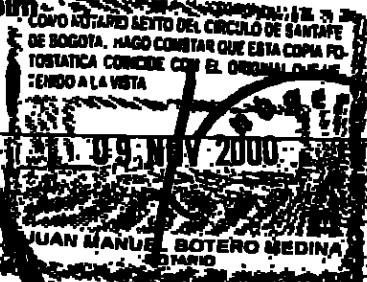
Weiter bescheinige ich, daß die Gesellschaft ihren Sitz in Ingelheim am Rhein hat.

Gegenstand des Unternehmens ist die Entwicklung, die Herstellung und der Vertrieb von veterinärmedizinischen Präparaten und anderen Produkten zur Gesunderhaltung von Tieren.

Ingelheim am Rhein, den 02. August 1996/hün



Notarassessor als amtlich bestellter Vertreter
des Notarassessors Dr. Peter Wirth als amtlich
bestellter Notariatsverweser anstelle von
Notar Justizrat Prof. Weirich in Ingelheim





- 910 E 1 -

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des Notarassessors
Dr. Scholl als amtlich bestellter Vertreter des Notarassessors
Dr. Peter Wirth - Notariatsverweser anstelle des Notars Prof.
Dr. Weirich in Ingelheim und die Echtheit des beigedruckten
Dienst-stempels-siegels werden hierdurch bestätigt. Zugleich
wird bescheinigt, daß der Vorgenannte zur Vornahme der Amts-
handlung gesetzlich befugt war.

Kostenberechnung:

Gebühr für Legalisa-
tion

(Wert: DM 1000,-)

JVKostO. v. 28.7.1957

BGBI. I 8. 861

DM 1000,-

Mainz, den 8. AUG 1958

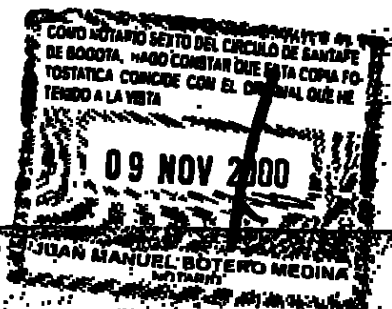
Amtsinspektor



Mainz, den neunten August neunzehn-
hundertsechszundneunzig
Der Präsident des Landgerichts

Dr. Hanns Paul Töttenberg
(Dr. Hanns Paul Töttenberg)

CAVITA
100-4-15





CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

MUNICH

Nr. 131

El suscrito Cónsul General de Colombia

CERTIFICA:

Que el señor(a) Dr. HAS PAUL TÜTTENBERG, quién autentica la firma del signatario en el presente documento, ejercía en la fecha allí indicada las funciones de Presidente del Tribunal Regional de Mainz.

Que la firma BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH está registrada en el Registro Mercantil del Juzgado Municipal 653 de Bingen / Rhein, bajo el número HR B 1491 y que está constituida y ejerce su objeto social de conformidad con las Leyes de la República de Alemania.

Que el señor Dr. DIETER LAUDIN y el Señor REINHOLD FLESCHHUT, quién(es) firma(n) el presente documento tiene(n) facultad legal y suficiente para representar a la mencionada firma y otorgar poderes en su nombre.

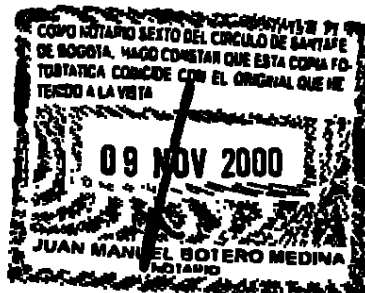
Que ha tenido a la vista la documentación que prueba lo anterior.

Munich, a 23 de agosto de 1996


RICARDO MOSQUERA MESA
Cónsul General de Colombia

Derechos para la Nación	US \$ 6.-
Fondo Rotatorio	US \$ 100.-
Tasa Consular	US \$ 1,00 - DM 1.60 - DM 169.60

PAGADO





NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD

1446 SET 21

JEFE DE LOCALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

205408

CUYA FIRMA ATUECE
DOCUMENTO DESEMPEN
LAS FUNCIONES INDICADAS

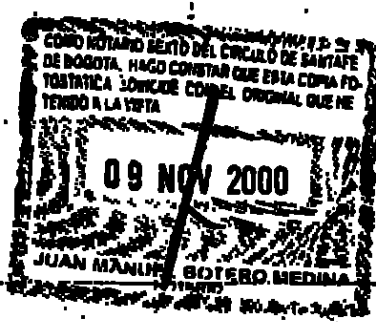
CUYA FIRMA ATUECE
DOCUMENTO DESEMPEN
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

ALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA

1-5 P 16

ALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA



TRADUCCION OFICIAL No. 5446

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

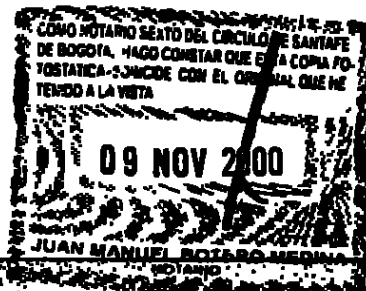
(A continuación de la representación y el poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO tpa, 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia, por la BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH, domiciliada en D-55216 Ingelheim am Rhein, RFA, a través de sus representantes los Srs. Reinhold Fleischhut y Dr. Dieter Laudien:)

Legalización

Protocolo notarial No. 1656/96 V

Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puestas ante mí por los señores:

1. Reinhold Fleischhut, Dipl.Chem. domiciliado en 55216 Ingelheim, Am Mühlborn 16,
2. Dr. Dieter Laudien, Dipl. Chim., domiciliado en 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,



-presentados por la secretaria señora Ingrid May, con domicilio comercial en la Boehringer Ingelheim GmbH, quien a su vez se identificó con su licencia de conducción-.

Iguualmente certifico, por haber examinado en la fecha el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen:

Que la firma Boehringer Vetmedica Ingelheim GmbH, domiciliada en Ingelheim am Rhein, fue inscrita bajo el No. HR B 1491 el 12 de junio de 1978 en el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen y que los señores Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien, están facultados para representar conjuntamente a la sociedad. Además certifico que el domicilio de la sociedad es Ingelheim am Rhein.

El objeto social es el desarrollo, producción y venta de preparados médico-veterinarios y otros productos para la salud animal.

Ingelheim am Rhein, 2 de agosto de 1996/hün

Fdo.: firma ilegible

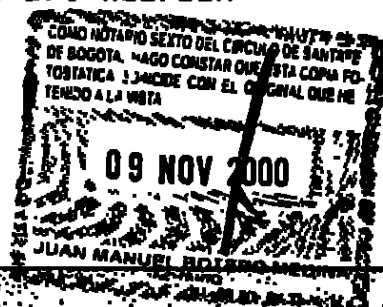
(Hilo y oblea roja en relieve)

El notario suplente

El notario suplente - Ingelheim

del notario de Ingelheim

Prof. Dr. Weirich



(dos sellos redondos en tinta del Tribunal Regional de Mainz y en
hojita adjunta)

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del Dr.
Scholl como notari suplente del Dr. Peter Wirth, notario suplente
del Prof. Dr. Weirich, notario de Ingelheim, y la del sello
oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el
mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto
oficial.

Mainz, nueve de agosto de mil novecientos
noventa y seis

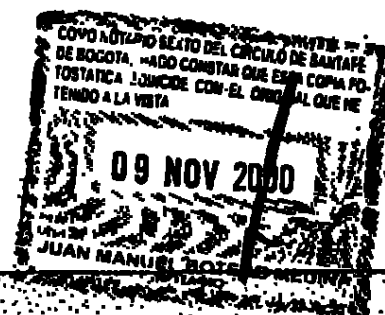
El Presidente del Tribunal Regional

(E) Fdo.: firma ilegible

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)

Costas

Derechos de legalización
(Valor: DM 5.000,-)
JVKostD del 26 de julio 1957
Gacetas Oficial I Pag. 861
DM 20,--
Mainz, 13 de diciembre de 1995
Fdo.: firma ilegible
Inspector



EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas antecedentes por el Consulado de Colombia en Munich (Certificación) bajo el No. 131 del 23 de agosto de 1996, y por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el No. 205408 del 6 de septiembre de 1996.

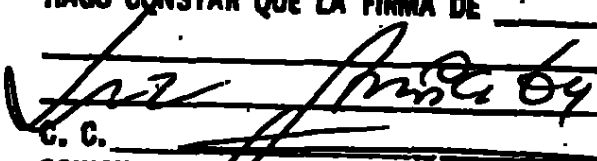
Pagados derechos y Fondo Rotatorio US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Santafé de Bogotá, 10 de septiembre de 1996.

LUZ ARRIBAS DE HEREDIA
BARRIOS Y SOTOMAYOR C
Resolución No. 554 de 1996

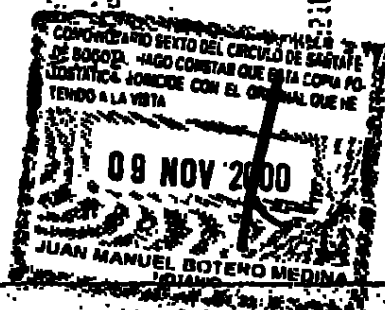
COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE


C. C.

COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLOS)
EN ESTA NOTARIA..

16 SET. 1996

SANTAFE DE BOGOTA, D.C.



EN ESPERA DE LA RESPUESTA DEL SEÑOR DELEGADO DEL CÍRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ, SE LE INFORMA QUE LA FIRMA DE LA COPIA FOTOSTÁTICA DE LA ACTA DE CONSTITUCIÓN DEL CÍRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ, SE ENVIÓ AL SEÑOR DELEGADO DEL CÍRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ, EL DÍA 13 DE OCTUBRE DE 1999.

SE LE INFORMA QUE LA FIRMA DE LA COPIA FOTOSTÁTICA DE LA ACTA DE CONSTITUCIÓN DEL CÍRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ, SE ENVIÓ AL SEÑOR DELEGADO DEL CÍRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ, EL DÍA 13 DE OCTUBRE DE 1999.

SE LE INFORMA QUE LA FIRMA DE LA COPIA FOTOSTÁTICA DE LA ACTA DE CONSTITUCIÓN DEL CÍRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ, SE ENVIÓ AL SEÑOR DELEGADO DEL CÍRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ, EL DÍA 13 DE OCTUBRE DE 1999.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1446 SET 13 1999 14 32

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA LE

EN ESTE NOTARIO
COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA LE

13 SET 1999

SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

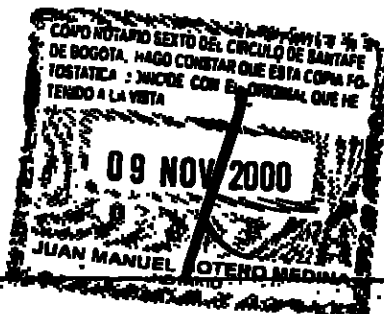
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

23 de mayo

208896

Dr. H. G. G. G.

COPIA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESENTA
LAS FUNCIONES INDICADAS



CAVELIER

ABOGADOS

TELEFAX: (57) (1) 2358880
CABLES CAVELEYES
TELEX: 48478

EDIFICIO SISKI
CARRERA 41, No. 72-38
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE
TELEFONO: (57) (1) 2120100

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Poder conferido el: 02-08-96

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

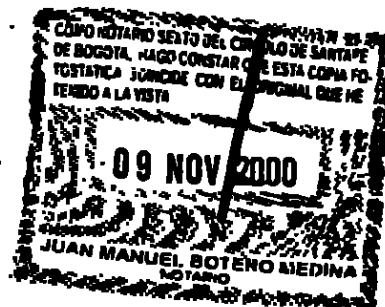
Acepto:...



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



ze-780-2

cto: 04484-801-004-5

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y REPRESENTACION PERSONAL

Sentado de Bogotá D. C. 08 SET 2000

Ante mí **JUAN MANUEL BOTERO MEDINA**

NOTARIO SEXTO DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ

Comparecieron personalmente, [Firma]

[Firma]

[Firma]

quien(es) exhibió(eron) la(s) C. C.

438019

y la(s) Libreta(s) Militar(es): 2877924

77832 7721924

de la(s) en Bogotá, y declaró(aron) que la(s) firma(s) que

a. suscribe(s) pertenece(n) a(es) la(s) suya(s) y que

el contenido del documento es(son) la(s) suya(s) y que

En consecuencia se hizo esta diligencia.

[Firma]

[Firma]





**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

3

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

99123767.8

**Der Präsident des Europäischen Patentamts:
Im Auftrag**

For the President of the European Patent Office

**Le Président de l'Office européen des brevets
p.d.**

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

**DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE**

08/11/00



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

**Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:
Application no.: 99123767.8 ✓
Demande n°:

Anmeldetag:
Date of filing: 30/11/99 ✓
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
55218 Ingelheim am Rhein
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Safe attenuated bovine viral diarrhoea viruses for use in pregnant cows

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Anmeldenummer:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:
A61K39/12, C07K14/18, A61P31/14, C12N15/40

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/EB/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LU/MC/NL/PT/SE/TR
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

Case 1-1114

99123767.8

34

**Safe attenuated bovine viral diarrhea viruses
for use in pregnant cows**

Field of the invention

5

The present invention relates to the use of specifically attenuated live BVD (Bovine Viral Diarrhea) viruses for the preparation of a vaccine for use in the prevention and/or treatment of BVDV infections in breeding stocks of cattle, pregnant cows and for fetal protection in pregnant cows.

10 The invention also relates to a method of treatment and/or prevention of BVDV infections in the above named group of cattle.

Background of the invention

15 Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is the causative agent of BVD and mucosal disease in cattle (Baker, 1987; Moennig and Plagemann, 1992; Thiel et al., 1996). Fetal infection during pregnancy can result in the resorption of the fetus, abortions as well as birth of immunotolerant calves which are persistently infected with BVDV. These calves lack or have very low neutralizing antibody titres and are continuously
20 shedding high amounts of virus. Next to acute or persistently infected bulls these calves are the major source for virus spreading and are therefore of primary importance in the epidemiology of this disease. The major economical impact of BVD results from high abortion rates, stillbirths, fetal resorption, mummification, congenital malformations, and birth of weak and undersized calves. For a detailed review of the pathogenesis it is hereby referred to the article of Moennig and Liese of 1995 in its
25 entirety.

Two major antigenic groups of BVDV (type I and II) have been described (Becher et al. 1990) which display limited cross neutralizing antibody reactions (Ridpath et al. 1994).

30 BVDV and other pestiviruses share the ability to cross the placenta of pregnant host animals. Present attenuated live BVDV vaccines also cross the placenta of seronegative heifers and result in clinical symptoms of wild type BVDV infections (see Moennig and Liese, Orban et al. 1983; Liese et al. 1984).

Present vaccines for the prevention and treatment of BVDV infections still have drawbacks (Oirschot et al. 1989).

Killed vaccines (inactivated whole virus) or subunit vaccines (conventionally purified or heterologously expressed purified viral proteins) are most often inferior to live vaccines in their efficacy to produce a full protective immune response even in the presence of adjuvants.

Live BVDV vaccines, although attenuated, are most often associated with serious safety problems. As mentioned above, they cross the placenta of pregnant cows and lead to clinical manifestations in the fetus and/or the induction of persistently infected calves. Therefore, they cannot be applied to breeding herds that comprise pregnant cows. Pregnant cows must to be kept isolated from vaccinated cattle to protect fetuses and may not be vaccinated themselves. Furthermore, revertants of attenuated live BVDV pose a serious threat to cattle. For conventionally derived attenuated viruses wherein the attenuation is attained by conventional multiple passaging, the molecular origin as well as the genetic stability remains unknown and the outbreak of revertants is unpredictable.

Live vaccines with defined mutations as a basis for attenuation would allow to avoid the disadvantages of the present generation of attenuated vaccines. A further advantage of said attenuating mutations lies in their molecular uniqueness which allows for use as distinctive labels for an attenuated pestiviruses and to distinguish them from pestiviruses from the field.

Such live and specifically attenuated pestiviruses with a high potential for induction of immunity as well as a defined basis of attenuation which can also be distinguished from pathogenic pestiviruses are described in the PCT-application PCT/EP 88/03642. In this application it has been demonstrated that pestiviruses can be specifically attenuated by the inactivation of the RNase activity residing in glycoprotein E^{RNS}. The inventors disclose that this attenuation principle is universal to all pestiviruses and particularly suitable for BVDV.

This application discloses an attenuated live vaccine that is superior in its efficacy of induction of immunity to subunit and killed vaccines as well as superior to conventionally attenuated vaccines which are molecularly undefined, unmarked and unpredictable with respect to mutants. From prior art an expert would naturally associate the risk of fetal BVDV infection when vaccinating pregnant cows or cattle in

the near vicinity of pregnant cows with an attenuated live virus. This remains a serious drawback limiting the use of such a vaccine.

Therefore, the technical problem underlying this invention was to provide safely attenuated and live BVDV vaccines that can be used for the preparation of a live vaccine for use in the prevention and/or treatment of BVDV infections of pregnant cows or cattle in the presence of pregnant cows.

Disclosure of the invention

The solution to the above technical problem is achieved by the description and the embodiments characterized in the claims.

It has surprisingly been found that live BVDV (bovine viral diarrhoea virus), wherein the RNase activity residing in its glycoprotein E^{non} is inactivated, does not result in placental transmission to the fetus when pregnant cows are vaccinated with said viruses. No clinical signs in the calves are observable when a BVDV strain of said characteristic is used to challenge pregnant cows.

Therefore, in one aspect, the present invention relates the unexpected use of a live BVDV (bovine viral diarrhoea virus), wherein the RNase activity residing in its glycoprotein E^{non} is inactivated, for the preparation of a live vaccine for use in the prevention and/or treatment of BVDV infections in breeding stocks of cattle.

Even more unexpected, pregnant cows themselves may be vaccinated with said specifically attenuated BVDV. Consequently, in a preferred embodiment, the present invention relates to the use of said BVDV for the preparation of a live vaccine for use in the prevention and/or treatment of BVDV infections in pregnant cows.

This allows for the first time ever to prevent and protect the fetus itself against BVDV infections with a live vaccine. In a more preferred embodiment, the present invention relates to the use of said BVDV for the preparation of a live vaccine for inducing fetal protection against BVDV infections in pregnant cows.

The term "vaccine" as used herein refers to a pharmaceutical composition comprising at least one immunologically active component that induces an immunological response in an animal and possibly but not necessarily one or more additional components that enhance the immunological activity of said active component. A vaccine may additionally comprise further components typical to

pharmaceutical compositions. The immunologically active component of a vaccine may comprise complete live organisms in either its original form or as attenuated organisms in a so called modified live vaccine (MLV) or organisms inactivated by appropriate methods in a so called killed vaccine (KV). In another form the

5 immunologically active component of a vaccine may comprise appropriate elements of said organisms (subunit vaccines) whereby these elements are generated either by destroying the whole organism or the growth cultures of such organisms and subsequent purification steps yielding in the desired structure(s), or by synthetic processes induced by an appropriate manipulation of a suitable system like, but not
10 restricted to bacteria, insects, mammalian or other species plus subsequent isolation and purification procedures or by induction of said synthetic processes in the animal needing a vaccine by direct incorporation of genetic material using suitable pharmaceutical compositions (polynucleotide vaccination). A vaccine may comprise one or simultaneously more than one of the elements described above.

15 Additional components to enhance the immune response are constituents commonly referred to as adjuvants, like e.g. aluminiumhydroxide, mineral or other oils or ancillary molecules added to the vaccine or generated by the body after the respective induction by such additional components, like but not restricted to interferons, interleukins or growth factors.

20 A "pharmaceutical composition" essentially consists of one or more ingredients capable of modifying physiological e.g. immunological functions of the organism it is administered to, or of organisms living in or on its surface like but not restricted to antibiotics or antiparasitics, as well as other constituents added to it in order to achieve certain other objectives like, but not limited to, processing traits, sterility,
25 stability, feasibility to administer the composition via enteral or parenteral routes such as oral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intradermal or other suitable route, tolerance after administration, controlled release properties.

A vaccine of the invention refers to a vaccine as defined above, wherein one immunologically active component is a live BVDV, wherein the RNase activity in its
30 protein E^{RNase} is inactivated.

The term "live vaccine" refers to a vaccine comprising a living, in particular, a living viral active component.

The term "BVDV" as used herein refers to all viruses belonging to species BVDV 1 and BVDV 2 in the genus pestivirus within the family Flaviviridae (Becher et al. 1988).

5 The more classical BVDV type I strains and the more recently recognized BVDV type II strains display some limited but distinctive differences in nucleotide and amino acid sequences. These differences are immunologically distinguishable by monoclonal antibodies. The attenuation principle of inactivating the RNase activity in the protein E^{RNase} as described in the above referenced international application is universally applicable and holds true for both type I and type II BVDV. The surprising feature of
10 BVDV which are attenuated in said manner that these viruses do not cross the placental barrier and do not lead to clinical manifestations of BVDV infections in the fetus applies to all types of BVDV. Therefore, in a further more preferred embodiment the present invention relates to the use of said BVDV for the preparation of a live vaccine for the treatment and or prevention of fetal infection,
15 pregnant cows and breeding stocks of cattle.

"RNase activity" as used herein refers to the ability of the glycoprotein E^{RNase} which is an inherent protein to all naturally occurring pestiviruses such as BVDV to hydrolyze RNA.

20 It should be noted that the term glycoprotein E0 is often used synonymously to glycoprotein E^{RNase} in publications.

The term "inactivation of the RNase activity residing in said glycoprotein" refers to the inability or reduced capability of a modified glycoprotein E^{RNase} to hydrolyze RNA as compared to the unmodified wild type of said glycoprotein E^{RNase} .

25 Inactivation of the RNase activity residing in glycoprotein E^{RNase} can be achieved by deletions and/or mutations of at least one amino acid of said glycoprotein as demonstrated in the international application PCT/EP88/03842 and by Hulst et al. (1988). Therefore, in a most preferred embodiment the present invention relates to the use of live BVDV, wherein said RNase activity is inactivated by deletions and/or mutations of at least one amino acid of said glycoprotein.

30 The amino acid sequence for the BVDV strain CP7 is accessible for reference purposes in the GenBank/EMBL data library (accession number U83479). Two regions of amino acids are highly conserved in glycoprotein E^{RNase} as well as in some plant and fungal RNase-active proteins (Schneider et al., 1983). These two regions are of particular importance to the RNase enzymatic activity. The first region consists

of the region at the amino acids at position 288 to 310 and the second region consists of the amino acids at position 341 to 360 of said viral polypeptide as exemplified for the CP7 strain of BVDV (numbering according to the deduced amino acid sequence of the CP7 strain; see Figure 1 for the amino acid sequence of the CP7 glycoprotein E^{ns}). The amino acids of particular importance to the RNase activity as mentioned above are by no means limited to the exact position as defined for the CP7 strain of BVDV but are simply used in an exemplary manner to point out the preferred amino acids being at that position or corresponding to that position in BVDV strains since they are highly conserved. For different BVDV pestiviruses the numbering of the positions of the preferred amino acids might be different but an expert in the field of the molecular biology of pestiviruses will easily identify these preferred amino acids by their position relative to the highly conserved amino acids of said glycoprotein.

As a consequence, the present invention relates in a more preferred embodiment to the use of BVDV according to the invention, wherein said inactivating deletions and/or mutations are located at the amino acids at position 288 to 310 and/or position 341 to 360, as described for the BVDV CP7 strain in an exemplary manner and corresponding thereto in other BVDV strains, of said glycoprotein.

In a most preferred embodiment the present invention discloses the use of a live BVD virus according to the invention wherein said RNase activity is inactivated by the deletion of the histidine residue at the position 349 as described for the CP7 strain of BVDV in an exemplary manner or corresponding thereto in other BVDV strains, of said glycoprotein.

In a further aspect the invention relates to a method for the prevention and/or treatment of BVDV infections in breeding stocks of cattle characterized in that a pharmaceutical composition comprising a live BVD virus, wherein the RNase activity residing in its glycoprotein E^{ns} is inactivated, is applied to an animal in need of such prophylaxis or treatment.

To practice the invention it is necessary to prepare a BVDV according to the invention. This can be done with any available BVDV that is suited for recombinant modification. One example how to obtain such a virus according to the invention is given below in example 2. The example demonstrates the preparation of a virus for a use according to the invention in an exemplary manner and is by no means limiting. An expert in the field of virology or molecular biology can achieve this by standard

methods which are abundantly provided in the art.

The application of the preferred live viruses according to the application to the preferred group of animals is identical to the application methods which are available and practiced for other live attenuated viruses in the art.

5

References

1. Baker, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea virus: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190: 1449-1458.
- 10 2. Becher, P., Orlich, M., Ksemidou A., König, M., Baroth M., Thiel H.-J., 1999. Genetic Diversity of Pestivirus: Identification of Novel Groups and Implications for Classification. Virology 262: 64-71.
- 15 3. Fuerst T.R. et al. 1986. Eukaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 8122-8126.
4. Hulst, M.-M., F.E. Panoto, A. Hoekmann, H.G.P. van Gennip, and Moormann, R.J.M. 1988. Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{ns} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. J. Virol. 72: 151-157.
- 20 5. Kunkel, T. A., J. D. Roberts, and R. A. Zakour. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Methods Enzymol. 154:367-382.
6. Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J., & Kümmerer, B.M. 1998b. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. J. Virol., 70: 8606-8613.
- 25 7. Meyers, G., Thiel, H.-J., and Rümenapf, T. 1998a. Classical swine fever virus: Recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic swine fever virus. J. Virol. 67:7088-709526.
8. Moennig, V. and Piagemann, J. 1992. The pestiviruses. Adv. Virus Res. 41: 53-30 91.

9. Moennig, V. and Lissa, B. 1995. Pathogenesis of Intrauterine Infections with Bovine Viral Diarrhea Virus. 11: (3), 477-487.
10. Olrchet van, J.T., Bruschke, C.J.M., Rijn van, P.A., 1989. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. Veterinary Microbiology, 64: 189-189.
- 5 11. Sandvik, T., Paton D.J., Lowings P.J. 1997. Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions. J Virol Methods 64: (1) 43-56.
12. Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer, and H.-J. Thiel. 1993. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. 10 Science 261: 1169-1171.
13. Thiel, H.-J., Plagemann, G.W., & Moennig, V. 1986. The pestiviruses. In *Fields Virology*, eds. Fields, B.N., Knipe, D.M., & Howley, P.M. (Lippincott-Raven, Philadelphia), pp.1058-1073.
14. Welland, E., Thiel, H.-J., Hess, G., and Welland, F. (1989). Development of 15 monoclonal neutralizing antibodies against bovine viral diarrhoea virus after pretreatment of mice with normal bovine cells and cyclophosphamide. J. Virol. Methods 24: 237-244.

Examples

20

Example 1 BVDV fetal challenge study

Experimental design

25 Six pregnant heifers were selected from a BVDV negative herd. Two groups of 3 heifers each were included in the trial. The animals in the groups were kept isolated, thereby insuring the absence of cross and outside infection.

30

Group No	No. of animals	Virus	Application route	Dose per route TCID ₅₀
1	3	NCP7	i.m.; i.n.; i.t.; s.c.	$1,2 \times 10^6$
2	3	B-349-d	i.m.; i.n.; i.t.; s.c.	$1,2 \times 10^6$

Table 1

5 Heifers from groups 1 to 2 were inoculated with at least 10^5 TCID₅₀ BVDV in a volume of 3 ml per route. Application routes were intramuscular (i.m.), subcutaneous (s.c.), intranasal (i.n.) (1.5 ml per nostril) and intratracheal (i.t.).

10 Blood samples were collected from the animals for serology and virological examinations. Heifers were regularly monitored for the presence of clinical signs of BVDV infection during the observation period. The experiment was terminated after the birth of calves by examination for BVDV infection. Main evaluation parameters were the number of BVDV-related abortions and the number of calves born viraemic or comprising antibodies to BVDV.

Buffy coat preparations

15 Blood was collected in suitable sterile vessels pre-filled with heparin solution (Na-heparin for injection, 5 000 IU/ml; Gedeon Richter RT, Budapest, Hungary) assuring at least 20 IU heparin per ml blood in the blood sample.

20 Blood was centrifuged for 10 min at 750 g at 4 °C. Erythrocytes sedimented in the lower half of the tube while the plasma made up the supernatant in the upper half of the tube. On top of the erythrocyte phase, in the so called interface, the leukocytes were located. This thin layer of white blood cells was collected with a sterile pipette
25 and then resuspended very carefully in a new tube filled up with Gey's buffer (140mM NH₄Cl, 2,7mM KCl, 8,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄). The suspension was kept on ice for 10 minutes. Cells were centrifuged again (10 min, 750 g, 4 °C) and the supernatant discarded. Gey's buffer treatment was repeated until no substantial amount of erythrocytes was observed in the suspension. Then the cells

were washed twice in RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) with 5 % FCS (fetal calf serum, about 20 ml) and centrifuged thereafter. The obtained buffy coats were resuspended in a small volume (2 ml) of RPMI 1640 5 % FCS and frozen at -70 °C in two aliquots of 1 ml. Buffy coats were used for the determination of blood cell associated BVDV.

BVDV antibody ELISA-test

At least 10 ml fresh blood were collected at each sampling time point from each animal. Blood was allowed to clot at room temperature, and separated by centrifugation. Each serum sample was tested for the presence of BVDV-antibodies using a suitable and validated ELISA test (Svanovir™ BVDV antibody test Cat# 10 2200-10). The test was validated and performed according to the manufacturer's recommendations. Positive samples were diluted according to the log₂ scale to determine BVDV antibody titers.

Fetal infection challenge viruses

The strain B349-d was applied to group 2. It is almost identical to the NCP7 strain that was applied to group 1 except for one single deletion of the histidine in position 349 of its amino acid sequence. B349-d was prepared according to the procedure listed below.

Detection of BVDV from buffy coat or tissue samples by virus isolation procedure followed by an Indirect Immune Fluorescence Test (IFT)

For virus isolation a 20% suspension of tissues, serum or buffy coat were used. 1 g organ material was homogenized using a mortar and pestle, diluted up to 5 ml phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 1500 * g for 10 min at 4°C. The supernatant was filtrated sterily using 0,45 µm filter holders, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany, and used for virus isolation.

Virus propagation was performed on Marbin Darby Bovine Kidney cells (MDBK) as monolayer in 24 well plates with EMEM, containing 10% fetal calf serum, 1%

nonessential amino acids and 0,15 % antibiotics. Before starting the cells were tested for contamination with BVDV by RT-nPCR as described below, and by immunofluorescence assay (IFA).

After splitting, the cells were each infected simultaneously with 100 µl suspension, serum or buffy coat in duplicates. 5 days later, one aliquot of the cell cultures was frozen and thawed.

100µl of the cell lysate was passaged twice to MDBK cell suspensions. One aliquot was fixed with ethanol and stored at -20°C for virus detection by immune fluorescence assay(IFA).

Infected cell cultures were tested by IFA. Cells were fixed by incubation with cold ethanol at -20°C. Fixed 24 well plates were washed with PBS twice. Afterwards the wells were incubated for two hours at room temperature with αBVDV-mAb-mix (Welland et al. 1989). The αBVD-mAb-mix was diluted 1:10 in PBS. After washing three times with PBS rab.α-mouse FITC- conjugated antiserum (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA 19380, USA) was added in a solution of 1:150 in PBS (phosphate buffered saline) and incubated for 1 h at room temperature. After additional washing, glycerol-PBS (1:1) was added and stained cell cultures were investigated by immunofluorescence microscopy.

Detection of BVDV from serum, buffy coat and tissue samples by Polymerase chain reaction (PCR)

RNA was extracted by column chromatography using QIAamp Viral Mini Kit for serum samples and RNeasy Mini Kit for organ material and buffy coat, according to the manufacturers recommendations. Both kits are available from Qiagen LTD, Hilden, Germany.

RT-nPCR:

Primer pairs for the detection of pestiviruses by RT-nPCR were used as previously described by Sandvik et al. (1997). The sequences of the external primers are:

(P103F) '5-TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC T-3'

(P365R) '5- TGT GCC ATG TAC AGC AGA GAT T -3'

The external primers generated a DNA- fragment of 280-284 bp length.

The sequences of the internal primers were as follows:

(B146F) '5-AAC AGT GGT GAG TTC GTT GGA T-3'

(B314R) '5-CAC CCT ATC AGG CTG TAT TCG T-3'

6 The internal primers generated a DNA-fragment of 191 bp length.

A volume of 5 µl total RNA (1µg – 1pg) was used for RT-PCR amplification, using the Titan One Tube Kit, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany. RT-PCR was carried out in a total volume of 25µl, containing 1*RT-PCR, 0,1 mM dNTPs, 20 pmol of sense and antisense primer, 5 mM dithiothreitol, 1 mM magnesium chloride, 2,5 – 5 U RNasin, Promega Ltd, 1-2,5'U enzyme mixture, AMV-RT and Taq Polymerase, ad 25µl Aqua dest. including 0,1% diethylpyrocarbonat.'

RT-PCR-cycle conditions were as follows:

42°C for 1 hour, 95°C for 5 min and 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, finally prolongation for 10 min.

15 1 µl PCR product was used as template for the nested PCR, using Qiagen Taq (Qiagen LTD, Hilden, Germany).

nPCR was carried out in a total volume of 50µl, containing 1*PCR buffer, 3,5mM magnesium chloride, 0,1 mM dNTPs, 20 pmol of each primers and 2,5 U Taq.

The temperature profile of the nested PCR for 30 cycles was 84°C for 1 min, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by a prolonged last amplification.

A volume of 5 μ l nPCR product was analysed by horizontal agarose gel electrophoresis in tris-acetate EDTA buffer, using 1% agarose and a 1 μ g/ml ethidium bromide staining. The amplicate was identified by size comparison with a standard molecular weight 100 bp ladder (Gibco BRL, Eggenstein, Germany), the specificity of the PCR products was checked by sequence analysis.

To run non-crosscontaminating PCRs the RoboAmp 4200 (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) was used for automated pipetting. Thermocycling was performed in a DNA Thermal Cycler Primus 96 (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) or T3 (Biometra, Göttingen, Germany).

Results

Clinical observation

- 5 No BVD related clinical signs were observed in Group 2 heifers during the observation period.
- In Group 1, mostly increased salivation and nasal discharge were noticed for about a period of 8 days (between PI days 7 - 12). Two animals had diarrhea on day 14 PI. Results are summarized in table 2.

10

Table 2

Days PI	Ranking of heifer No. in					
	Group 1			Group 2		
	11093	13178	11738	12031	10585	11080
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	3	2	2	-	-	-
8	3	2	2	-	-	-
9	3	2	2	-	-	-
10	2	2	2	-	-	-
11	1	1	1	-	-	-
12	1	1	1	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	2	-	1	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-

Ranking: 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe

Pregnancy history

15

In Group 2, all heifers had a normal length of pregnancy (in a range of 270 - 277 days) and a pregnancy and parturition with no complication.

In Group 1, one animal (#11738) had abortion in the 8th month of pregnancy. Necropsy of the fetus revealed an acute sero-fibrinous inflammation of the chorion that led to an insufficient oxygen supply of the fetus and then to its

20

suffocation The remaining two animals gave birth to a calf after 278 (#13178) and 298 (#11093) days of pregnancy, respectively.

Virus detection from clinical samples obtained from aborted material or new born calves

In case of an abortion samples from different organs such as brain, spleen or kidney were investigated by PCR and/or IFT for BVDV. All clinical samples obtained from the aborted fetus of cow 11736 in group 1 were BVDV negative. Buffy coat samples from calves born from cows 11093 and 13178 were BVDV positive as confirmed by IFT and PCR. In contrast, buffy coats and serum samples from calves born from cows 10565, 11060 and 12031 of group 2 were all negative fro BVDV as confirmed by the above mentioned methods. The data is summarized in table 3.

Table 3

Fetal Transmission Evaluation						
group	Animal No.	chall. Virus	calf No.	abort/ life	conclusion from virus detection data	percentage placental transmission of group
1	11093	NCP7	11093 c	live	pos	68%
	11736		11736 c	aborted	neg	
	13178		13178 c	live	pos	
2	10565	B349-d	10565 c	live	neg	0%
	11060		11060 c	live	neg	
	12031		12031 c	live	neg	

Serological data from pregnant cattle

At selection and day of infection the pregnant cows were BVDV negative. Serum samples from all animals in the trial collected 1 month after infection were BVDV

seropositive. Serum positivity was confirmed for BVDV throughout the trial by reinvestigating serum samples obtained on a monthly basis from all animals. The data is summarized in table 4.

5 Table 4

ANTIBODY ELISA DATA

Cow No.	Group	BVDV specific antibodies in sera taken at									
		Sele- tion	Infec- tion	1	2	PI month				At termination	
11093	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
13178	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
11738	1	-	-	+	+	+	+	Ab.*	NA	NA	NA
11080	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
10565	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
12031	2	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

PI = Post infection; * before the first ingestion of colostrum;
NA = Not applicable;
* after abortion, cows were removed from the study, Ab.=abortion

Discussion and conclusion

As 2 of 3 calves born in group 1 which were infected with NCP7 were viraemic for BVDV at birth whereas no calf born from group 2 which had been infected with B-349-d this data provides clear evidence that the genomic modification introduced in B-349-d abrogates the ability of the parent virus NCP7 to induce fetal infection.

15 Example 2 Generation of RNase-negative BVDV mutants

Starting with the full length cDNA clones pA/BVDV (Meyers et al., 1986b), from which infectious cRNA can be obtained by in vitro transcription, subclones were generated. A XhoI/BglII fragment from pA/BVDV was cloned into plasmid pCITE-2C,

cut with the same enzymes. Single stranded plasmid DNA was produced from these constructs according to the method of Kunkel (Kunkel et al., 1987) using E. coli CJ 236 cells (BioRad) and the VCMS single strand phage (Stratagene). The single stranded DNA was converted to double strands using the 'Phagemid In vitro
5 Mutagenesis Kit' (BioRad). A synthetic oligonucleotide which was used as a primer for generating the desired BVDV mutant is listed below in an exemplary fashion:

B-349-d: CATGAATGGAACAAAGGTTGGTGCAACTGG

- 10 The double stranded plasmid DNA was used for transformation of E.coli XL1-Blue cells (Stratagene). Bacterial colonies harboring plasmids were isolated via ampicillin selection. Plasmid DNA was prepared and further analyzed by nucleotide sequencing using the T7 polymerase sequencing kit (Pharmacia). Plasmids containing the desired mutations and no second site changes were used for the
15 construction of full length cDNA clones. To obtain the BVDV CP7 mutant, a XhoI/BglII fragment containing the deletion was inserted into pABVDV cut with XhoI and NcoI together with a BglII/NcoI fragment isolated from pABVDV/Ins-. From construct pABVDV/Ins- a cRNA was transcribed that gives rise to a noncytopathogenic BVDV upon transfection in suitable cells (Meyers et al., 1996b).
- 20 The different full length clones were amplified, and the plasmids isolated. The presence of the desired mutations was proven by DNA sequencing. After linearization with SmaI cRNA was transcribed as described previously (Meyers et al., 1996ab). RNA was purified by gel filtration and phenol/chloroform extraction and used for transfection of bovine kidney (MDBK clone B2) cells. The transfections were
25 analyzed by immunofluorescence with virus specific antisera. The desired mutant could be recovered (as confirmed by immunofluorescence). The virus was amplified by passage on the same cell line used for the transfection experiments.
- 30 Further analysis of the mutant included determination of one step growth curves and characterization of viral RNA by Northern blot with virus specific cDNA probes as well as reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and subsequent sequencing of the PCR fragments to verify the presence of the desired mutations in the viral genome. The recovered viruses grew equally well and produced similar amounts of RNA just as the virus resulting from the plasmid displaying the wild type sequence.

The viability of the BVDV mutant was shown by transfection of the respective cRNA and splitting of the cells 3 days thereafter. Part of the cells was seeded into a 3.5 cm diameter dish, fixed with acetone/methanol at the day thereafter and analyzed by immunofluorescence with a mixture of BVDV-specific monoclonal antibodies (Welland et al., 1989). All cells were found positive whereas a control of cells transfected with noninfectious RNA showed no signal. From a part of the cells transfected with the respective cRNA, an extract was produced by one cycle of freezing and thawing. Fresh cells were infected with this cell extract and proved to be BVDV positive by BVDV specific immunofluorescence 3 days post infection.

Table 1 presents the changes introduced into the conserved sequences of E^{RNS} representing the putative active site of the RNase which are encoded by the virus mutant.

Table 1

Name	Sequence in RNase motif	RNase activity	Viability of mutant
pABVDV	...SLHGIWPEKIC... RHEWNKHGWGNW..	+	+
B-349-d	...SLHGIWPEKIC... RHEWNK_GWGNW..	-	+

Legend to Table 1: Test for RNase activity was done in a transient assay. BHK21 cells were infected with Vaccinia virus vTF7-3 (Fuerst et al, 1988) and then transfected with the respective cDNA construct (5 µg of plasmid DNA, transfection using Superfect as recommended by the supplier (Qiagen)). After 10 hours incubation at 37 °C in a CO₂ incubator, the transfected cells were lysed and processed for determination of RNase activity as described below). Viability was determined as described below.

Example 2 Effect of the mutation in position 349 of the BVDV strain CP7 on the RNase activity of E^{RNS}

To test the effect of the deletion in position 349 on the RNase activity of E^{RNS} appropriate cells were infected with the mutant viruses.

For the BVDV mutant RNase activity was tested with material obtained after RNA transfection without passage of the recovered viruses. Cells transfected with the appropriate RNA were split 72h post transfection and seeded in two dishes. 24h

later, from one dish, cell extracts were prepared and analyzed for RNase activity. Infection with wild type virus served as a positive control whereas noninfected cells were used as a negative control. Cells were washed twice with phosphate buffered saline and lysed in 0.4 ml of lysis buffer (20 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mg/ml bovine serum albumin; 1% Triton X100; 0.1% deoxycholic acid; 0.1% sodium dodecyl sulfate). The lysate was given into 1.5 ml reaction tubes, sonified (Branson sonifier B12, 120 Watt, 20 s in a cup horn water bath), cleared by centrifugation (5 min, 14,000 rpm, Eppendorf Centrifuge, 4°C) and the supernatant subjected to ultracentrifugation (Beckmann table top ultracentrifuge, 60 min at 4°C and 45,000 rpm in a TLA 45 rotor). Determination of RNase activity was done in a total volume of 200 µl containing 5 or 50 µl of supernatant of the second centrifugation step and 80 µg of Poly(rU)(Pharmacia) in RNase-assay buffer (40 mM Tris-acetate (pH 8.5), 0.5 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol (DTT)). After incubation of the reaction mixture at 37°C for 1 hour 200 µl of 1.2 M perchloric acid, 20 mM LaSO₄ was added. After 15 min incubation on ice the mixture was centrifuged for 15 min at 4°C and 14,000 rpm in an Eppendorf centrifuge. To the supernatant 3 volumes of water were added and an aliquot of the mixture was analyzed by measuring the optical density at 280 nm using an Ultrospec 3000 spectrophotometer (Pharmacia). The mutation introduced into the E^{ns} gene completely abrogated RNase activity (Table 5).

To prove infection, the cells of the second dish were analyzed by immunofluorescence with BVDV specific monoclonal antibodies (Welland et al., 1989) and found 100% positive.

Table 5

	CP7	B-349-d	control
OD ₂₈₀	2.5	1.1	1.1

Description of table 5

CP7: virus recovered from pA/BVDV/Ins-; B-349-d: virus recovered from pA/B-349-d; control; extract from noninfected MDBK cells.

Figure 1 Amino acid sequence of the glycoprotein E⁷⁰ of BVDV CP VII

5 1 ENITQWNLQDNGTEGIQRAMFQRGVNRSLHGIWEEKICTGVPSHLATDTE
 51 LKAHGMMDASEKTNITCCRLQRHEWNBKHGWGNWYNIEPWILLMNKTQAN
 101 LTEGQPLRECAVTCRYDRDSDLNVTQARDSPPTLTGCKKGKNFSFAGIL
 10 VQGPCNFEIAVSDVLFKEHDCTSVIQDTAHLVDGMTNSLEBARQGTAKL
 151
 201 TTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA

15 Sequences containing the residues conserved with regard to known RNases are underlined. The two histidine residues supposed to be in the catalytic centre of the enzyme are shown in bold characters. The shown sequence corresponds to residues 271 to 497 of the CP 7 polyprotein

20

25

30

35

Claims:

- 5 1. Use of a live BVDV (bovine viral diarrhea virus), wherein the RNase activity residing in its glycoprotein E^{gns} is inactivated for the preparation of a live vaccine for use in the prevention and/or treatment of BVDV infections in breeding stocks of cattle.
- 10 2. Use of a BVDV according to claim 1 for use in the prevention and/or treatment of BVDV infections in pregnant cows.
3. Use of a BVDV according to claim 1 for inducing fetal protection against BVDV infections in pregnant cows.
- 15 4. Use of a BVDV according to any one of claims 1 to 3 for use in the prevention and/or treatment of BVDV type I infections.
5. Use of a BVDV according to any one of claims 1 to 3 for use in the prevention and/or treatment of BVDV type II infections.
- 20 6. Use of a BVDV according to any one of claims 1 to 7, wherein said RNase activity is inactivated by deletions and/or mutations of at least one amino acid of said glycoprotein.
- 25 7. Use of a BVD virus according to any one of claims 1 to 8 comprising a BVDV pestivirus, wherein said RNase activity is inactivated by the deletion of the histidine residue at position 349, as described in figure 1 for the CP7 strain in an exemplary manner or corresponding thereto in other BVDV strains, of said glycoprotein.

ABSTRACT

5 This invention relates to the use of specifically attenuated live BVD (bovine viral
diarrhea) viruses for the preparation of a vaccine for use in the prevention and/or
treatment of BVDV infections in breeding stocks of cattle, pregnant cows and for fetal
protection in pregnant cows.

45

TRADUCCION: Se traduce la carátula y las reivindicaciones anexas a una copia de la solicitud de patente europea No. 99123767.8, escrita en inglés para el invento denominado :VIRUS ATENUADOS E INOCUOS DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA PARA USO EN VACAS GESTANTES.

A N E X O S

OFICINA DE PATENTES EUROPEA

Certificado

Los documentos adjuntos son copias exactas de la solicitud de patente europea descrita en la siguiente página, como fue presentada originalmente.

Solicitud de patente No. 99123767.8

Por el Presidente de la Oficina de Patentes Europea

(Firmado Ilegible)

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

La Haya, 08/11/00

REIVINDICACIONES

1. Un BVDV vivo (virus de la diarrea vírica bovina), en el que la actividad RNasa que reside en su glicoproteína E^g está inactivada, para la preparación de una vacuna viva para uso en la prevención y/o tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor.
2. BVDV de acuerdo con la reivindicación 1, para ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en vacas gestantes.
3. BVDV de acuerdo con la reivindicación 1, para inducir protección fetal contra infecciones BVDV en vacas gestantes.
4. BVDV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV de tipo I.
5. BVDV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV de tipo II.
6. BVDV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha actividad RNasa está inactivada por delecciones y/o mutaciones de al menos un aminoácido de dicha glicoproteína.
7. Virus BVD de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para ser utilizada en la prevención y/o tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor que comprende un pestivirus BVDV, en el que dicha actividad RNasa está inactivada por la delección del resto de histidina en la posición 349, como se describe en la Figura 1 para la cepa CP7 de una manera ilustrativa o correspondiente a ella en otras cepas BVDV, de dicha glicoproteína.

COLO: 04484-801-007-8

ID:58

Folios 47 y 48
tarjetas para archivar
temáticos y propietarios

folio 49.

47 50

NIT : 80017608

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00091439 00000000

Folios: 50

Fecha (AMD): 2000-11-29 17:52:05

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 69,138
FECHA : NOVIEMBRE 7 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2825222	24,845,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT. REENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
	TOTAL :	\$ 608,000.

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE NO.

610 04484-001-007-8

51
98

REQUISITOS MINIMOS PARA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 00091439 00000000

Folios: 50

Fecha (REC): 2000-11-29 17:52:05

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAR

Dependencia: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION []

- ~~Nombre e identificación del Solicitante~~ []
- ~~Nombre e identificación del Inventor~~ []
- ~~Título o nombre de la invención~~ []
- ~~Descripción~~ []
- ~~Reivindicaciones~~ 23 []
- ~~Resumen~~ 22 []
- ~~Comprobante de Pago~~ 50 []
- Poder, cuando proceda []
- Copia de la primera solicitud de patente, si reivindica prioridad, señalándola expresamente []
- ~~Firma del solicitante o apoderado~~ []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []
- Poder, cuando proceda []
- Firma del solicitante o apoderado []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia



99 52
Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO PERINTENDENCIA

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
EMILIO FERRERO
Apoderado

REFERENCIA:	Radicación No.	00091439
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	0302
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

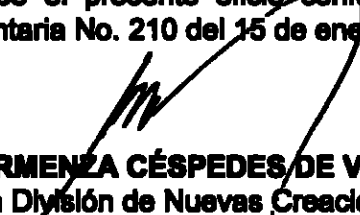
- Para efectos de entendimiento, y posterior digitalización de la solicitud es importante que los documentos aportados sean enteramente legibles, por lo tanto se sugiere aportar un nuevo capítulo descriptivo.

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000).

- El interesado debe informar la dirección del solicitante, debido a que en la solicitud no aparece la misma. (Art. 27-b, D 486/00).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 15 FEB 2001.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia