

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-068897 - 00000-0000

Fecha: 2011-06-02 16:53:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 118



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

INVENTARIO

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

11-688897

SOLICITUD DE PATENTE DE

INVENCION

TITULO: VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA CON UNA PROTEINA ERNS
MODIFICADA.

SOLICITANTE: PFIZER INC

DIRECCIÓN: 235 East 42nd Street, New York, NY 10017, E. U. A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 02 de Junio de 2011

P2011/000111

03-07-2011

As E.



No. 11-068897 - 00000-0000

Fecha: 2011-06-02 16:53:11
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 118

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2011/000111

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: PFIZER INC.Dirección: 235 East 42nd Street, New York,
New York 10017Nacionalidad o Domicilio: Estados UnidosLugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá,
ColombiaTeléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295INVENTOR (ES)
(72)Nombre: VER PAGINA ADJUNTADirección: VER PAGINA ADJUNTANacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2009/055291

Fecha

Noviembre 23, 2009Publicación Internacional No. WO 2010/064164

Fecha

Junio 10, 2010

6

Título (54) VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA CON UNA PROTEINA ERNS
MODIFICADA.Clasificación Internacional (51) C12N 7/04; C07K 14/18; C12N 15/86; A61K 39/12;
C07K 16/10; G01N 33/50.

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Diciembre 03, 2008

Abril 28, 2009

(31) Número de Solicitud

61/119.594

61/173.363

9

Comprobante de pago No. 11-Fecha Junio de 2011

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 09-081.255

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.G

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

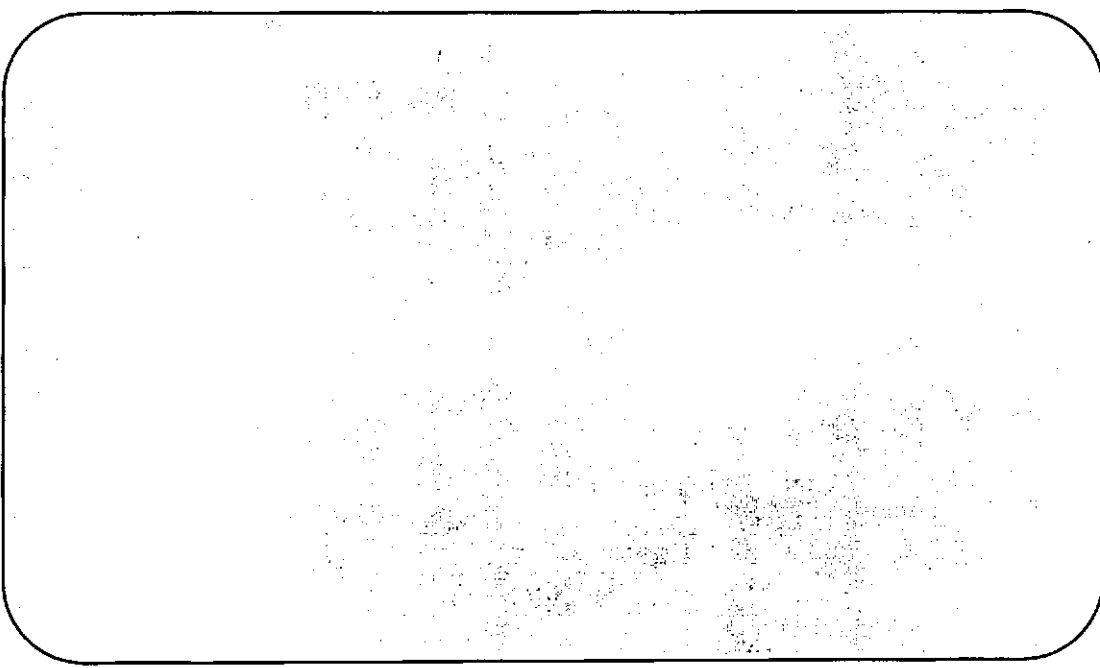
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2009/055291

Robert Gerard, ANKENBAUER

Pfizer Global Research and Development,
700 Portage Road, Kalamazoo,
Michigan, 49001, Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

Yugang, LUO

Pfizer Global Research and Development,
700 Portage Road, Kalamazoo,
Michigan, 49001, Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

Siao-Kun Wan, WELCH

Pfizer Global Research and Development,
9087 South 6th Street, Kalamazoo,
Michigan, 49009, Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

Ying, YUAN

Pfizer Global Research and Development,
700 Portage Road, Kalamazoo,
Michigan, 49001, Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0053304

Bogotá D.C., Junio 02 de 2011 - 16:27:42

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	444455550	02/06/2011	2.992.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-068897-00000-0000

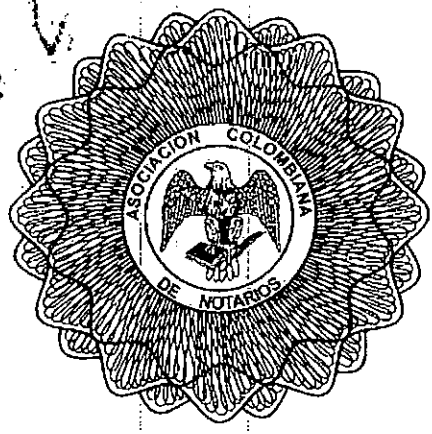
Fecha: 2011-06-02 16:53:11
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 118

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 2 de 2011 - 16:27:43



ESCRITURA PUBLICA NUMERO / - - - - -
TRESCIENTOS VEINTIUNO (321).- - - - -

En la ciudad de Bogotá, Distrito
Capital, República de Colombia, a los
Veintitres - - - (23) días del mes de /
Marzo - - - - - del año dos mil siete
(2007), ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE

Se Dio
3 Copias
29 MAR. 2007

URUETA - - - - - NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL
CIRCULO DE BOGOTA, - - -se otorgó la escritura pública que se
consigna en los siguientes términos: - - - - -

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION: - - - - -

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA - - - - -

C.C. No. 79.782.747.- - - - -

Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA mayor de
edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, obrando en su propio nombre y
dijo: - - - - -

PRIMERO.- Que presenta para su protocolización y custodia en
los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta
escritura corresponda, en seis (6) folios autenticados, el poder y
sus traducciones el cual del siguiente tenor: - - - - -

PODER GENERAL.- - - - -

El suscrito, PFIZER INC, domiciliado en 235 East 42nd Street,
New York, New York 10017, USA, nombramos por el presente
otorga a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World
Trade Center- Torre A, Calle 100 No. 8ª-37, piso 10, Bogotá D.C.
nuestros representantes legales con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales
en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para

NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urueta

representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado a intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvencciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la Ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento, y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.-----

Firma (ilegible) Gregg C. Benson, Assistant General Counsel -----

Fecha: 20 February 2007.-----

Ciudad, Groton, Connecticut 06340 USA.-----

CERTIFICACION NOTARIAL -----

En esta fecha, -----

el Notario Público suscrito certifica: -----

Que GREGG C. BENSON mayor y domiciliado PFIZER INC.,
EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA

NOTARIO PUBLICO
(HAY SELLO ADHERIDO)

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. PAIS: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- ESTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR **STEPHEN DAVID FINN**
3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE **NOTARIO PUBLIC**
4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO

CERTIFICADO

5. EN **LONDRES**
6. EL DIA **FEBRERO 27, 2007**
7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y DE LA COMUNIDAD.
8. NR. **H303068**
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMADO

O. WILLIAM
(HAY FIRMA)

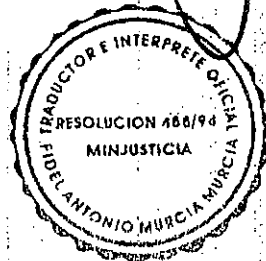
Si este documento va a ser usado en un país no miembro de la Convención de La Haya de Octubre 5, 1961, debe ser presentado ante la sección consular de la misión representante de ese país. Una apostilla o certificado de legalización solamente confirma que la firma, sello o estampilla en el documento es auténtica. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Oficina de Extranjería de la Comunidad apruebe el contenido.

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, anexo.

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA

Traductor e Interprete Oficial
Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia

Fidel Murcia



NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urzeta

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES
SECRETARIA DE
ESTADO
OFICINA DE
ASUNTOS EXTERIORES
Y DE LA COMUNIDAD
BOGOTA D.C.
2007 FEB 27 A 8:17
RESPONSABLE DEL TEXTO
HAY SELLO

BOGOTA DC. MARZO 12, 2007

TRADUCCIÓN OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER
(VERIFIQUE ANTES DE PROCEDER)

NOTA DE TRADUCCIÓN: SE TRATA DE UN PODER CONFERIDO POR **PFIZER INC** A **OLARTE RAISBECK & FRIERI LTD**, DE FECHA **FEB-20-2007**, SUSCRITO EN GROTON, CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, CON CERTIFICACIÓN NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y CASTELLANO; Y CERTIFICACIÓN NOTARIAL Y APOSTILLE IN IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE:

SE INFORMA QUE YO, **STEPHEN DAVID FINN** DE **31 AMERSHAM HILL DRIVE** **HIGH WYCOMBE BUCKINGHAMSHIRE**, REINO UNIDO, NOTARIO DEBIDAMENTE AUTORIZADO,

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE TITULADO,

PODER, firmado por **Gregg C Benson**

En este día ha sido presentado a mi por **Servicios Consulares Blair** en nombre de su cliente **Pfizer**, y que dichos **Servicios Consulares Blair** han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.

FIRMADO, y sellado en **31 Amersham Hill Drive** antes mencionado, el **23 de Febrero 2007**.

(HAY FIRMA)
STEPHEN FINN



BE IT KNOWN that I, STEPHEN DAVID FINN of 31 Amersham Hill Drive High Wycombe Buckinghamshire United Kingdom a duly authorised Notary Public

CERTIFY only that the document annexed hereto, namely:

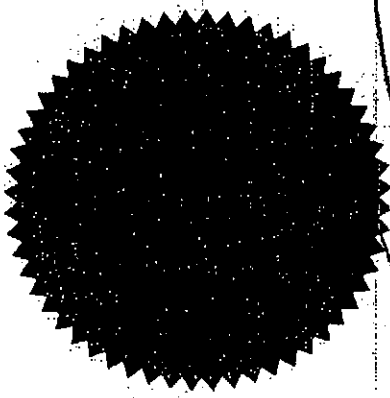
GENERAL POWER signed by Gregg C. Benson.

has this day been presented to me by Blair Consular Services on behalf of their client Pfizer, and that the said Blair Consular Services have represented to me by such presentation that their said client has represented to them that the annexed document is an authentic original document.

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 23rd February 2007.



Stephen Finn
Notary Public



NOTARIA VENTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urzua

104

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by Stephen David Finn
a été signé par

3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté

6. the/le 27 February 2007

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No

H303068

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: O Williams



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

General Power

The undersigned,

domiciled in

hereby appoint Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. with offices in the World Trade Center - Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

Signature/Firma:

Date/Fecha:

City/Country:

El suscrito,

PFIZER INC.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, New York 10017 USA

nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center - Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconveniones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias, llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Gregg C. Benson, Assistant General Counsel

20 February 2007

Groton, Connecticut 06340 USA

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Monte
Natalia Castro

Zayde Chahin
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas
Alexander Agudelo
Camilo A. Rodríguez

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Claparro
Cruz E. de Moncaleano

NOTARIA VENTISIEVE
María Eugenia Rojas de Urzeta

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date,
20 February 2007
The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

GREGG C. BENSON
PFIZER INC., EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as ASSISTANT GENERAL COUNSEL
OF PFIZER INC.

3. That Pfizer Inc.
having its principal place of business located in
235 East 42nd Street, New York, NY 10017
USA

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the General Power is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
General Power and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

Nancy M. George

NANCY M. GEORGE
Notary Public

My Commission Expires 30 June 2011



suscribió el documento que antecede. ---
 2- Que el otorgante ha suscrito el
 referido documento en su carácter de ----
 4. Que con sede principal ubicada en:-----
 está legalmente constituida, que tiene
 existencia legal vigente y que los
 propósitos para los cuales se otorga el

poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4- Que el otorgante tiene la representación para suscribir el
 poder, y que ésta es legítima.-----

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos
 2, 3, y 4 fue la exhibición de (los) (del) siguiente(s) documento(s)
 auténtico(s): NANCY M. GEORGE Notary Public My commission
 Expires 30 June 2001.-----

BOGOTA, MARZO 12, 2007-----

TRADUCCION OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER-----

NOTA DE TRADUCCION: SE TRATA DE UN PODER
 CONFERIDO POR PFIZER INC A OLARTE RAISBECK & FRIER
 LTD DE FECHA FEB-20-2007, SUSCRITO EN GROTON
 CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES,
 CON CERTIFICACION NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y
 CASTELLANO; Y CERTIFICACION NOTARIAL Y APOSTILLE IN
 IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE:-----

SE INFORMA QUE YO, STEPHEN DAVID FINN DE 31
 AMERSHAM HILL DRIVE HIGH WYCOMBE
 BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO NOTARIO DEBIDAMENTE
 AUTORIZADO-----

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL
 PRESENTE TITUADO,-----

PODER, firmado por Gregg C Benson-----

En este día ha sido presentado a mi por Servicios Consulares Blair
 en nombre de su cliente Pfizer, y que dichos Servicios Consulares

NOTARIA VENTISIEVE
 María Eugenia Rojas de Uribe



Blair han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.-----

FIRMADO, y sellado en 31 Amersham Hill Drive antes mencionado, el 23 de Febrero 2007.-----

(HAY FIRMA) STEPHEN FINN NOTARIO PUBLICO (HAY SELLO ADHERIDO).-----

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte -----

ESTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: STEPHEN DAVID FINN-----

3. ACTUANDO EN CALIDAD DE NOTARIO PUBLIC-----

4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO -----

CERTIFICADO

5. EN LONDRES-----

6) EL DÍA FEBRERO 27, 2007 -----

7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y LA COMUNIDAD.-

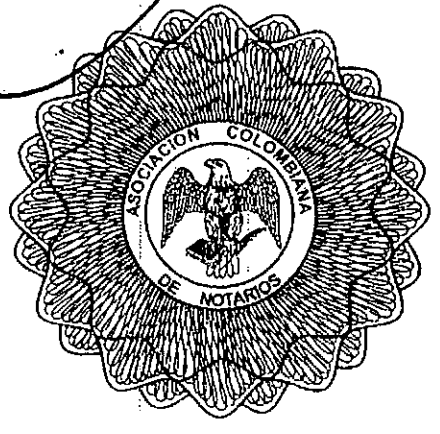
8 NR.H303068 -----

9. SELLO/ ESTAMPILLA: == -----

10. Firmado O. WILLIAM (HAY FIRMA)-----

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, anexo.-----

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA Traductor e Interprete Oficial Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia (fdo. Fidel Murcia)".-----



SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaria para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado cuidadosamente sus nombres completos, estado(s) civil(es), los número(s) de sus documentos de identidad; Declara(n) que todas las informaciones consignadas en el presente instrumento son correctas y, en consecuencia, asumen la responsabilidad que se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conocen la ley y saben que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Urzúa

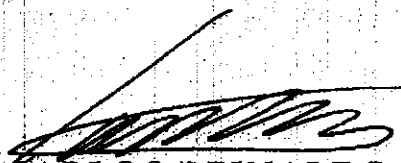
ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la (el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La (el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. -- Se utilizó en la totalidad del papel Notarial Nos:

WK 4682687, WK 4682689, WK 4682690.-----

DERECHOS LEGALES: \$ 38.110.00 /

RESOLUCION 7880 DE 2006

IVA \$ 12.078.00 /

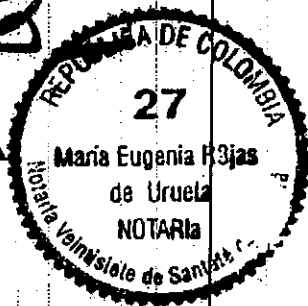

CARLOS REINALDO GARCIA

C.C.No. 79'782.747 BIA

TEL: 601-7700


MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTA



red b.

Es fiel y Sexta 169
fotocopia de la Escritura Pública No. 321
de fecha 23 de Marzo de 2007
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 22 MAYO 2007
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá.



PCT

Paper Copy (NOT for submission)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application PFIZER INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/119,594 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from ANKENBAUER, Robert Gerard to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-3-1(i v)		an assignment from LUO, Yugang to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-3-1(i v)		an assignment from WELCH, Siao-Kun Wan to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-3-1(i v)		an assignment from YUAN, Ying to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)

PCT

Paper Copy (NOT for submission)

VIII-3-2	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application PFIZER INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/173,363 by virtue of the following:
VIII-3-2(i v)		an assignment from ANKENBAUER, Robert Gerard to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-3-2(i v)		an assignment from LUO, Yugang to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-3-2(i v)		an assignment from WELCH, Siao-Kun Wan to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-3-2(i v)		an assignment from YUAN, Ying to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)

PCT

Paper Copy (NOT for submission)

VIII-1-1	Declaration: Identity of the Inventor Declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))	in relation to this international application
	Name (LAST, First) Address	ANKENBAUER, Robert Gerard of Pfizer Global Research and Development 7000 Portage Road Kalamazoo, Michigan 49001 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	LUO, Yugang of Pfizer Global Research and Development 7000 Portage Road Kalamazoo, Michigan 49001 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	WELCH, Siao-Kun Wan of 9087 South 6th Street Kalamazoo, Michigan 49009 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	YUAN, Ying of Pfizer Global Research and Development 7000 Portage Road Kalamazoo, Michigan 49001 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application

PCT

Paper Copy (NOT for submission)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application Pfizer Inc., 61/119594, 3 December 2008 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from ANKENBAUER, Robert Gerard to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-2-1(i v)		an assignment from LUO, Yugang to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-2-1(i v)		an assignment from WELCH, Siao-Kun Wan to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-2-1(i v)		an assignment from YUAN, Ying to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)

PCT

Paper Copy (NOT for submission)

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application Pfizer Inc., 61/173363, 28 April 2009 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i v)		an assignment from ANKENBAUER, Robert Gerard to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-2-2(i v)		an assignment from LUO, Yugang to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-2-2(i v)		an assignment from WELCH, Siao-Kun Wan to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)
VIII-2-2(i v)		an assignment from YUAN, Ying to PFIZER INC., dated 10 November 2009 (10.11.2009)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 June 2010 (10.06.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/064164 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 7/04 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01) C07K 16/10 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2009/055291

(22) International Filing Date:

23 November 2009 (23.11.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/119,594 3 December 2008 (03.12.2008) US
61/173,363 28 April 2009 (28.04.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ANKENBAUER, Robert Gerard** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **LUO, Yugang** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **WELCH, Siao-Kun Wan** [US/US]; 9087 South 6th Street, Kalamazoo, Michigan 49009 (US). **YUAN, Ying** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US).

(74) Agent: **KLEIMAN, Gabriel L.**; Pfizer Inc., 150 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS WITH A MODIFIED ERNS PROTEIN

(57) Abstract: The present invention relates to chimeric pestiviruses having utility as immunogenic compositions and vaccines wherein said chimeric pestivirus comprises a bovine viral diarrhea virus which does not express its homologous Erns protein, further wherein said chimeric pestivirus expresses a heterologous Erns protein derived from another pestivirus, or a natural, synthetic or genetic variant of said heterologous Erns protein. Also described herein are methods and kits for treating or preventing the spread of bovine viral diarrhea virus infection, as well as methods and kits for differentiating between vaccinated and wild-type infected animals.

WO 2010/064164 A1

BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS WITH A MODIFIED ERNS PROTEIN**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to novel chimeric pestiviruses and their use in immunogenic compositions and vaccines. It also relates to methods and kits for treating or preventing the spread of bovine viral diarrhea virus infection. The present invention further relates to the use of the chimeric pestiviruses in methods and kits for differentiating between vaccinated animals and animals infected with a wild-type virus.

BACKGROUND

Pestiviruses, including bovine viral diarrhea virus (BVD virus, or BVDV), have been isolated from several species of animals, both domestic and wild. Identified hosts for BVDV include buffalo, antelope, reindeer and various deer species, while unique pestivirus species have been identified in giraffes and pronghorn antelope. BVDV is a small RNA virus of the family Flaviviridae. It is closely related to other pestiviruses which are the causative agents of border disease in sheep and classical swine fever in pigs. Recently a divergent pestivirus named Bungowannah pestivirus was identified as an etiologic agent of fetal infection of piglets in Australia.

Disease caused by BVDV particularly in cattle is widespread, and can be economically devastating. BVDV infection in cattle can result in breeding problems, and can cause abortions or premature births. BVDV is capable of crossing the placenta of pregnant cattle, and may result in the birth of persistently infected (PI) calves that are immunotolerant to the virus and persistently viremic for the rest of their lives. Infected cattle can also exhibit "mucosal disease", characterized by elevated temperature, diarrhea, coughing and ulcerations of the alimentary mucosa. These persistently infected animals provide a source for dissemination of virus within the herd for further outbreaks of mucosal disease and are highly predisposed to infection with microorganisms responsible for causing enteric diseases or pneumonia.

BVDV is classified into one of two biotypes. Those of the "cp" biotype induce a cytopathic effect on cultured cells, whereas viruses of non-cytopathic, or "ncp", biotype do not. In addition, two major genotypes (type 1

5 and 2) are recognized, both of which have been shown to cause a variety of clinical syndromes.

BVDV virions are 40 to 60 nm in diameter. The nucleocapsid of BVDV consists of a single molecule of RNA and the capsid protein C. The nucleocapsid is surrounded by a lipid membrane with two glycoproteins anchored in it, E1 and E2. A third glycoprotein, E^{ms}, is loosely associated to the envelope. The genome of BVDV is approximately 12.5 kb in length, and contains a single open reading frame located between the 5' and 3' non-translated regions (NTRs). A polyprotein of approximately 438 kD is translated from this open reading frame, and is processed by cellular and viral proteases into at least eleven viral structural and nonstructural (NS) proteins (Tautz, et al., *J. Virol.* 71:5415-5422 (1997); Xu, et al., *J. Virol.* 71:5312-5322 (1997); Elbers, et al., *J. Virol.* 70:4131-4135 (1996); and Wiskerchen, et al., *Virology* 184:341-350 (1991)). The genomic order of BVDV is p20/N^{pro}, p14/C, gp48/E^{ms}, gp25/E1, gp53/E2, p54/NS2, p80/NS3, p10/NS4A, p32/NS4B, p58/NS5A and p75/NS5B. The three envelope proteins, gp48/E^{ms}, gp25/E1 and gp53/E2, are heavily glycosylated. E^{ms} (formerly referred to as E0 or gp48) forms homodimers, covalently linked by disulfides. The absence of a hydrophobic membrane anchor region suggests that E^{ms} is loosely associated with the envelope. E^{ms} induces high antibody titers in infected cattle, but the antisera has limited virus-neutralizing activity.

Among the BVDV vaccines currently available are those which contain chemically-inactivated wild-type virus. These vaccines typically require the administration of multiple doses, and result in a short-lived immune response; they also do not protect against fetal transmission of the virus. In sheep, a subunit vaccine based on a purified E2 protein has been reported. Although this vaccine appears to protect fetuses from becoming infected, protection is limited to only the homologous strain of virus, and there is no correlation between antibody titers and protection.

Modified live (ML) BVDV vaccines have been produced using virus that has been attenuated by repeated passaging in bovine or porcine cells, or by chemically-induced mutations that confer a temperature-sensitive phenotype on the virus. A single dose of a MLV BVDV vaccine has proven sufficient for providing protection from infection, and the duration of immunity can extend

5 for years in vaccinated cattle. In addition, cross-protection has been reported using MLV vaccines (Martin, et al., In "Proceedings of the Conference of Research Workers in Animal Diseases", 75:183 (1994)). However, existing MLV vaccines do not allow for the differentiation between vaccinated and naturally-infected animals.

10 Thus, it is clear that a need exists for new vaccines for controlling the spread of BVDV. Such a vaccine(s) could be invaluable in future national or regional BVDV eradication programs, and could also be combined with other cattle vaccines, representing a substantial advance in the industry. A more effective vaccine for controlling and monitoring the spread of BVDV would be
15 a "marked" vaccine. Such a vaccine could either contain an additional antigenic determinant which is not present in wild-type virus, or lack an antigenic determinant which is present in wild-type virus. With respect to the former, vaccinated animals mount an immune response to the "marker" immunogenic determinant, while non-vaccinated animals do not. Through the
20 use of an immunological assay directed against the marker determinant, vaccinated animals could be differentiated from non-vaccinated, naturally-infected animals by the presence of antibodies to the marker determinant. In the case of the latter strategy, animals infected with the wild-type virus mount an immune response to the marker determinant, while non-infected,
25 vaccinated animals do not, as a result of the determinant not being present in the marked vaccine. Through the use of an immunological assay directed against the marker determinant, infected animals could be differentiated from vaccinated, non-infected animals. In both scenarios, by culling out the infected animals, the herd could, over time, become BVDV-free. In addition to
30 the benefit of removing the threat of BVDV disease, certification of a herd as BVDV-free has direct freedom of trade economic benefits.

SUMMARY

In one embodiment, the present invention provides a chimeric
35 pestivirus, wherein said chimeric pestivirus comprises a bovine viral diarrhea virus which does not express its homologous E^{ms} protein, further wherein said chimeric pestivirus expresses a heterologous E^{ms} protein derived from

5 another pestivirus, or a natural, synthetic or genetic variant of said heterologous E^{ms} protein.

In another embodiment, the present invention provides the chimeric pestivirus as described above, wherein the heterologous E^{ms} protein of said chimeric pestivirus, or the natural, synthetic or genetic variant of said
10 heterologous E^{ms} protein, is derived from a pestivirus selected from the group consisting of a reindeer pestivirus, a giraffe pestivirus, and a pronghorn antelope pestivirus.

In a different embodiment, the present invention provides the chimeric pestivirus as described above, wherein the heterologous E^{ms} protein of said
15 chimeric pestivirus has at least one E^{ms} epitope which is not present in wild-type bovine viral diarrhea virus.

In a separate embodiment, the present invention provides the chimeric pestivirus as described above, wherein the heterologous E^{ms} protein of said chimeric pestivirus lacks at least one E^{ms} epitope which is present in wild-type
20 bovine viral diarrhea virus.

In one embodiment, the present invention provides a culture of the chimeric pestivirus as described above.

In another embodiment, the present invention provides a cell line or host cell comprising the chimeric pestivirus as described above.

25 In yet another embodiment, the present invention provides a polynucleotide molecule encoding for the chimeric pestivirus as described above.

In a different embodiment, the present invention provides an immunogenic composition comprising the chimeric pestivirus as described
30 above and a veterinarily-acceptable carrier.

In a separate embodiment, the present invention provides the immunogenic composition as described above, wherein the veterinarily-acceptable carrier is an adjuvant.

In yet another embodiment, the present invention provides the
35 immunogenic composition as described above, wherein said chimeric pestivirus is live attenuated.

5 In still another embodiment, the present invention provides the immunogenic composition as described above, wherein said chimeric pestivirus is inactivated.

 In a different embodiment, the present invention provides the immunogenic composition as described above, further comprising one or
10 more additional antigens useful for treating or preventing the spread of one or more additional pathogenic microorganisms in an animal.

 In a separate embodiment, the present invention provides an immunogenic composition comprising the polynucleotide molecule encoding for the chimeric pestivirus as described above and a veterinarily-acceptable
15 carrier.

 In one embodiment, the present invention provides a vaccine comprising the chimeric pestivirus as described above and a veterinarily-acceptable carrier.

 In another embodiment, the present invention provides the vaccine as
20 described above, wherein the veterinarily-acceptable carrier is an adjuvant.

 In a different embodiment, the present invention provides the vaccine as described above, wherein said chimeric pestivirus is live attenuated.

 In yet another embodiment, the present invention provides the vaccine as described above, wherein said chimeric pestivirus is inactivated.

25 In still another embodiment, the present invention provides the vaccine as described above, further comprising one or more additional antigens useful for treating or preventing the spread of one or more additional pathogenic microorganisms in an animal.

 In a separate embodiment, the present invention provides a vaccine
30 comprising a polynucleotide molecule encoding for the chimeric pestivirus as described above and a veterinary acceptable carrier.

 In one embodiment, the present invention provides a kit comprising, in at least one container, a vaccine comprising the chimeric pestivirus as described above.

35 In another embodiment, the present invention provides a method of treating or preventing the spread of bovine viral diarrhea virus infection, wherein a vaccine comprising the chimeric pestivirus as described above is administered to an animal.

17

5 In a different embodiment, the present invention provides method of
vaccinating an animal, wherein a DIVA pestivirus vaccine is administered to
said animal, and wherein said DIVA pestivirus vaccine comprises the chimeric
pestivirus as described above, further wherein said chimeric pestivirus has at
least one E^{ms} epitope which is not present in wild-type bovine viral diarrhea
10 virus.

 In a separate embodiment, the present invention provides method of
vaccinating an animal, wherein a DIVA pestivirus vaccine is administered to
said animal, and wherein said DIVA vaccine comprises the chimeric pestivirus
as described above, further wherein said chimeric pestivirus lacks at least one
15 E^{ms} epitope which is present in wild-type bovine viral diarrhea virus.

 In yet another embodiment, the present invention provides method of
differentiating between an animal vaccinated with a vaccine comprising the
chimeric pestivirus as described above and an animal infected with wild type
bovine viral diarrhea virus, wherein the animal vaccinated with said vaccine
20 generates antibodies to at least one E^{ms} epitope which is present in the
chimeric pestivirus of said vaccine, but which is not present in wild-type
bovine viral diarrhea virus, said method comprising the steps of:

- a) obtaining a serum sample from the animals;
- b) assaying said samples for the presence or absence of the
25 antibodies;
- c) identifying the animal having said antibodies as having been
vaccinated with said vaccine; and
- d) identifying the animal lacking said antibodies as having been
infected with the wild type BVDV.

30 In still another embodiment, the present invention provides method of
differentiating between an animal infected with wild-type bovine viral diarrhea
virus and an animal vaccinated with a vaccine comprising the chimeric
pestivirus as described above, wherein the animal infected with wild type
bovine viral diarrhea virus generates antibodies to at least one E^{ms} epitope
35 which is present in wild-type bovine viral diarrhea virus, but which is not
present in the chimeric pestivirus of said vaccine, said method comprising the
steps of:

- a) obtaining a serum sample from the animals;

- 5 b) assaying said samples for the presence or absence of the antibodies;
 c) identifying the animal having said antibodies as having been infected with the wild type BVDV; and
 d) identifying the animal lacking said antibodies as having been
10 vaccinated with said vaccine.

 In one embodiment, the present invention provides diagnostic kit for differentiating between an animal vaccinated with a vaccine comprising the chimeric pestivirus as described above and an animal infected with wild type bovine viral diarrhea virus, said kit comprising reagents capable of detecting
15 antibodies to at least one E^{ms} epitope which is present in the chimeric pestivirus of the vaccine, but which is not present in wild-type bovine viral diarrhea virus.

 In another embodiment, the present invention provides diagnostic kit for differentiating between an animal infected with wild type bovine viral
20 diarrhea virus and an animal vaccinated with a vaccine comprising the chimeric pestivirus as described above, said kit comprising reagents capable of detecting antibodies to at least one E^{ms} epitope which is present in wild-type bovine viral diarrhea virus, but which is not present in the chimeric pestivirus of the vaccine.

25 In yet another embodiment, the present invention provides an antibody which recognizes an epitope of E^{ms} which is present in the chimeric pestivirus as described above, but which epitope is not present in wild-type bovine viral diarrhea virus.

 In a different embodiment, the present invention provides an antibody
30 which recognizes an epitope present in wild-type bovine viral diarrhea virus, but which epitope is not present in the chimeric pestivirus as described above.

 In another embodiment, a chimeric pestivirus as described herein is used in the preparation of a medicament for the prevention or treatment of infections caused by BVDV.

35

DETAILED DESCRIPTION

 The following definitions may be applied to terms employed in the description of embodiments of the invention. The following definitions

- 5 supercede any contradictory definitions contained in each individual reference incorporated herein by reference.

Unless otherwise defined herein, scientific and technical terms used in connection with the present invention shall have the meanings that are commonly understood by those of ordinary skill in the art. Further, unless
10 otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular.

The term "amino acid," as used herein, refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function in a manner similar to the naturally occurring amino
15 acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the genetic code, as well as those amino acids that are later modified, for example, hydroxyproline, carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Stereoisomers (e.g., D-amino acids) of the twenty conventional amino acids, unnatural amino acids such as α and α -disubstituted amino acids, N-alkyl amino acids, lactic
20 acid, and other unconventional amino acids may also be suitable components for polypeptides of the present invention. Examples of unconventional amino acids include: 4-hydroxyproline, γ -carboxyglutamate, ϵ -N,N,N-trimethyllysine, ϵ -N-acetyllysine, O-phosphoserine, N-acetylserine, N-formylmethionine, 3-methylhistidine, 5-hydroxylysine, σ -N-methylarginine, and other similar amino
25 acids and imino acids.

Amino acid analogs refer to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, i.e., a carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group. Exemplary amino acid analogs include, for example, homoserine, norleucine,
30 methionine sulfoxide, and methionine methyl sulfonium. Such analogs have modified R groups (e.g., norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same essential chemical structure as a naturally occurring amino acid. Amino acid mimetics refer to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but that
35 function in a manner similar to a naturally occurring amino acid.

Amino acids may be referred to herein by either their commonly known three letter symbols or by the one-letter symbols recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

5 The term "animal" as used herein, is meant to include any animal that is susceptible to BVDV infections, including but not limited to bovine, ovine, caprine and porcine species, both domesticated and wild.

 The term "antibody" or "antibodies", as used herein, refers to an immunoglobulin molecule able to bind to an antigen by means of recognition
10 of an epitope. Antibodies can be a polyclonal mixture or monoclonal. Antibodies can be intact immunoglobulins derived from natural sources or from recombinant sources, or can be immunoreactive portions of intact immunoglobulins. Antibodies can exist in a variety of forms including, for example, as, Fv, Fab', F(ab')₂, as well as in single chains.

15 The term "antigen" as used herein refers to a molecule that contains one or more epitopes (linear, conformational or both) that upon exposure to a subject will induce an immune response that is specific for that antigen. The term "antigen" can refer to attenuated, inactivated or modified live bacteria, viruses, fungi, parasites or other microbes. The term "antigen" as used herein
20 can also refer to a subunit antigen, which is separate and discrete from a whole organism with which the antigen is associated in nature. The term "antigen" can also refer to antibodies, such as anti-idiotypic antibodies or fragments thereof, and to synthetic peptide mimotopes that can mimic an antigen or antigenic determinant (epitope). The term "antigen" can also refer
25 to an oligonucleotide or polynucleotide that expresses an antigen or antigenic determinant in vivo, such as in DNA immunization applications.

 The terms "BVDV", "BVDV isolates" or "BVDV strains" as used herein refer to bovine viral diarrhea viruses, including but not limited to type I and type II, that consist of the viral genome, associated proteins, and other
30 chemical constituents (such as lipids). A number of type I and type II bovine viral diarrhea viruses are known to those skilled in the art and are available through, e.g., the American Type Culture Collection (ATCC®). The bovine viral diarrhea virus has a genome in the form of RNA. RNA can be reverse transcribed into DNA for use in cloning. Thus, references made herein to
35 nucleic acid and bovine viral diarrhea virus sequences encompass both viral RNA sequences and DNA sequences derived from the viral RNA sequences.

 The term "cell line" or "host cell", as used herein means a prokaryotic or eukaryotic cell in which a virus can replicate and/or be maintained.

5 The term "chimeric" or "chimera" as used herein means a microorganism, for example a virus, containing genetic or physical components derived from more than one progenitor.

 The term "culture" as used herein means a population of cells or microorganisms growing in the absence of other species or types.

10 The term "DIVA" as used herein means a vaccine which is able to differentiate infected from vaccinated animals.

 An "epitope" is the specific site of the antigen which binds to a T-cell receptor or specific antibody, and typically comprises from about 3 amino acid residues to about 20 amino acid residues.

15 The term "heterologous", as used herein, means derived from a different species or strain.

 The term "homologous", as used herein, means derived from the same species or strain.

 The term "immunogenic composition", as used herein, means a
20 composition that generates an immune response (i.e., has immunogenic activity) when administered alone or with a pharmaceutically acceptable carrier, to an animal. The immune response can be a cellular immune response mediated primarily by cytotoxic T-cells, or a humoral immune response mediated primarily by helper T-cells, which in turn activates B-cells
25 leading to antibody production.

 The term "pathogen" or "pathogenic microorganism" as used herein means a microorganism- for example a virus, bacterium, fungus, protozoan, or helminth- which is capable of inducing or causing a disease, illness, or abnormal state in its host animal.

30 The term "pestivirus" as used herein means a RNA virus from the genus Pestivirus, of the family Flaviviridae. Pestiviruses include, but are not limited to, BVDV (type 1 and type 2), Classical Swine Fever Virus (CSFV), and Border Disease Virus (BDV), as well as pestiviruses isolated from species such as wild boar, buffalo, eland, bison, alpaca, pudu, bongo, various deer
35 species, giraffe, reindeer, chamois and pronghorn antelope (Vilcek and Nettleton; *Vet Microbiol.* 116:1-12 (2006))

 The term "polynucleotide molecule" as used herein means an organic polymer molecule composed of nucleotide monomers covalently bonded in a

5 chain. DNA (deoxyribonucleic acid) and RNA (ribonucleic acid) are examples of polynucleotides with distinct biological function.

The terms "prevent", "preventing" or "prevention", and the like, as used herein, mean to inhibit the replication of a microorganism, to inhibit transmission of a microorganism, or to inhibit a microorganism from
10 establishing itself in its host. These terms and the like as used herein can also mean to inhibit or block one or more signs or symptoms of infection.

The term "therapeutically effective amount" as used herein means an amount of a microorganism, or a subunit antigen, or polypeptides, or polynucleotide molecules, and combinations thereof, sufficient to elicit an
15 immune response in the subject to which it is administered. The immune response can comprise, without limitation, induction of cellular and/or humoral immunity.

The terms "treat", "treating" or "treatment", and the like, as used herein mean to reduce or eliminate an infection by a microorganism. These terms
20 and the like as used herein can also mean to reduce the replication of a microorganism, to reduce the transmission of a microorganism, or to reduce the ability of a microorganism to establish itself in its host. These terms and the like as used herein can also mean to reduce, ameliorate, or eliminate one or more signs or symptoms of infection by a microorganism, or accelerate the
25 recovery from infection by a microorganism.

The terms "vaccine" and "vaccine composition," as used herein, mean a composition which prevents or reduces an infection, or which prevents or reduces one or more signs or symptoms of infection. The protective effects of a vaccine composition against a pathogen are normally achieved by inducing
30 in the subject an immune response, either a cell-mediated or a humoral immune response or a combination of both. Generally speaking, abolished or reduced incidences of infection, amelioration of the signs or symptoms, or accelerated elimination of the microorganism from the infected subjects are indicative of the protective effects of a vaccine composition. The vaccine
35 compositions of the present invention provide protective effects against infections caused by BVDV.

The term "variant," as used herein, refers to a derivation of a given protein and/or gene sequence, wherein the derived sequence is essentially

5 the same as the given sequence, but for mutational differences. Said differences may be naturally-occurring, or synthetically- or genetically-generated.

The term "veterinarily-acceptable carrier" as used herein refers to substances, which are within the scope of sound medical judgment, suitable
10 for use in contact with the tissues of animals without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit-to-risk ratio, and effective for their intended use.

The following description is provided to aid those skilled in the art in practicing the present invention. Even so, this description should not be
15 construed to unduly limit the present invention as modifications and variations in the embodiments discussed herein can be made by those of ordinary skill in the art without departing from the spirit or scope of the present inventive discovery.

20 VIRUSES, IMMUNOGENIC COMPOSITIONS, AND VACCINES

The present invention provides immunogenic compositions and vaccines comprising one or more chimeric pestiviruses, wherein said chimeric pestiviruses comprise a bovine viral diarrhea virus which does not express its homologous E^{ms} protein, but wherein said chimeric pestivirus expresses a
25 heterologous E^{ms} protein derived from another pestivirus, or a natural, synthetic or genetic variant of said heterologous E^{ms} protein. The chimeric pestivirus can be selected from, but is not limited to, the group consisting of BVDV/reindeer pestivirus, BVDV/giraffe pestivirus, and BVDV/pronghorn antelope pestivirus chimeras.

30 In one embodiment, the BVDV/giraffe chimeric pestivirus is the strain deposited as UC 25547 with American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA, and given the ATCC® deposit designation of PTA-9938. In one embodiment, the BVDV/pronghorn antelope chimeric pestivirus is the strain deposited as UC
35 25548 with ATCC® and given the ATCC® deposit designation of PTA-9939. In one embodiment, the BVDV/reindeer chimeric pestivirus is the strain deposited as UC 25549 with ATCC® and given the ATCC® deposit designation of PTA-9940.

5 Chimeric pestiviruses of the present invention can be propagated in cells, cell lines and host cells. Said cells, cell lines or host cells may be for example, but not limited to, mammalian cells and non-mammalian cells, including insect and plant cells. Cells, cell lines and host cells in which chimeric pestiviruses of the present invention may be propagated are readily
10 known and accessible to those of ordinary skill in the art.

The chimeric pestiviruses of the present invention can be attenuated or inactivated prior to use in an immunogenic composition or vaccine. Methods of attenuation and inactivation are well known to those skilled in the art. Methods for attenuation include, but are not limited to, serial passage in cell
15 culture on a suitable cell line, ultraviolet irradiation, and chemical mutagenesis. Methods for inactivation include, but are not limited to, treatment with formalin, betapropiolactone (BPL) or binary ethyleneimine (BEI), or other methods known to those skilled in the art.

Inactivation by formalin can be performed by mixing the virus
20 suspension with 37% formaldehyde to a final formaldehyde concentration of 0.05%. The virus-formaldehyde mixture is mixed by constant stirring for approximately 24 hours at room temperature. The inactivated virus mixture is then tested for residual live virus by assaying for growth on a suitable cell line.

Inactivation by BEI can be performed by mixing the virus suspension of
25 the present invention with 0.1 M BEI (2-bromo-ethylamine in 0.175 N NaOH) to a final BEI concentration of 1 mM. The virus-BEI mixture is mixed by constant stirring for approximately 48 hours at room temperature, followed by the addition of 1.0 M sodium thiosulfate to a final concentration of 0.1 mM. Mixing is continued for an additional two hours. The inactivated virus mixture
30 is tested for residual live virus by assaying for growth on a suitable cell line.

Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can include one or more veterinarily-acceptable carriers. As used herein, a "veterinarily-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives,
35 antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like. Diluents can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others known to those skilled in the art.

- 5 Stabilizers include albumin, among others known to the skilled artisan.
Preservatives include merthiolate, among others known to the skilled artisan.

Adjuvants include, but are not limited to, the RIBI adjuvant system (Ribi Inc.), alum, aluminum hydroxide gel, oil-in water emulsions, water-in-oil emulsions such as, e.g., Freund's complete and incomplete adjuvants, Block
10 co polymer (CytRx, Atlanta Ga.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN[®] adjuvant, saponin, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) or other saponin fractions, monophosphoryl lipid A, Avridine lipid-amine adjuvant, heat-labile enterotoxin from *E. coli* (recombinant or otherwise),
15 cholera toxin, or muramyl dipeptide, among many others known to those skilled in the art. The amounts and concentrations of adjuvants and additives useful in the context of the present invention can readily be determined by the skilled artisan. In one embodiment, the present invention contemplates immunogenic compositions and vaccines comprising from about 50 µg to
20 about 2000 µg of adjuvant. In another embodiment adjuvant is included in an amount from about 100 µg to about 1500 µg, or from about 250 µg to about 1000 µg, or from about 350 µg to about 750 µg. In another embodiment, adjuvant is included in an amount of about 500 µg/2 ml dose of the immunogenic composition or vaccine.

25 The immunogenic compositions and vaccines can also include antibiotics. Such antibiotics include, but are not limited to, those from the classes of aminoglycosides, carbapenems, cephalosporins, glycopeptides, macrolides, penicillins, polypeptides, quinolones, sulfonamides, and tetracyclines. In one embodiment, the present invention contemplates
30 immunogenic compositions and vaccines comprising from about 1 µg/ml to about 60 µg/ml of antibiotic. In another embodiment, the immunogenic compositions and vaccines comprise from about 5 µg/ml to about 55 µg/ml of antibiotic, or from about 10 µg/ml to about 50 µg/ml of antibiotic, or from about 15 µg/ml to about 45 µg/ml of antibiotic, or from about 20 µg/ml to about 40
35 µg/ml of antibiotic, or from about 25 µg/ml to about 35 µg/ml of antibiotic. In yet another embodiment, the immunogenic compositions and vaccines comprise less than about 30 µg/ml of antibiotic.

5 Immunogenic compositions and vaccines of the invention can further include one or more other immunomodulatory agents such as, e.g., interleukins, interferons, or other cytokines, suitable amounts of which can be determined by the skilled artisan.

10 Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can include one or more polynucleotide molecules encoding for a chimeric pestivirus. Either DNA or RNA molecules encoding all of the chimeric pestivirus genome, or one or more open reading frames, can be used in immunogenic compositions or vaccines. The DNA or RNA molecule can be administered absent other agents, or it can be administered together with an
15 agent facilitating cellular uptake (e.g., liposomes or cationic lipids). Total polynucleotide in the immunogenic composition or vaccine will generally be between about 0.1 µg/ml and about 5.0 mg/ml. In another embodiment, the total polynucleotide in the immunogenic composition or vaccine will be from about 1 µg/ml and about 4.0 mg/ml, or from about 10 µg/ml and about 3.0
20 mg/ml, or from about 100 µg/ml and about 2.0 mg/ml. Vaccines and vaccination procedures that utilize nucleic acids (DNA or mRNA) have been well described in the art, for example, U. S. Pat. No. 5,703,055, U.S. Pat. No. 5,580,859, U.S. Pat. No. 5,589,466, all of which are incorporated herein by reference.

25 Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can also include additional BVDV antigens, for example, those described in U.S. Pat. No. 6,060,457, U.S. Pat. No. 6,015,795, U.S. Pat. No. 6,001,613, and U.S. Pat. No. 5,593,873, all of which are herein incorporated by reference.

In addition to one or more chimeric pestiviruses, immunogenic
30 compositions and vaccines can include other antigens. Antigens can be in the form of an inactivated whole or partial preparation of the microorganism, or in the form of antigenic molecules obtained by genetic engineering techniques or chemical synthesis. Other antigens appropriate for use in accordance with the present invention include, but are not limited to, those
35 derived from pathogenic bacteria such as *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus anthracis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*,

5 *Clostridial spp.*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Chlamydia spp.*, *Brucella spp.*, *Vibrio spp.*, *Salmonella enterica* serovars and *Leptospira spp.* Antigens can also be derived from pathogenic fungi such as *Candida*, protozoa such as *Cryptosporidium parvum*, *Neospora canium*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria spp.*, *Babesia spp.*, *Giardia spp.*, or
 10 helminths such as *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, and *Fasciola*. Additional antigens include pathogenic viruses such as bovine coronavirus, bovine herpesviruses-1,3,6, bovine parainfluenza virus, bovine respiratory syncytial virus, bovine leukosis virus, rinderpest virus, foot and mouth disease virus, rabies virus, and influenza virus.

15

FORMS, DOSAGES, ROUTES OF ADMINISTRATION

Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can be administered to animals to induce an effective immune response against BVDV. Accordingly, the present invention provides methods of stimulating an
 20 effective immune response against BVDV, by administering to an animal a therapeutically effective amount of an immunogenic composition or vaccine of the present invention described herein.

Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can be made in various forms depending upon the route of administration. For
 25 example, the immunogenic compositions and vaccines can be made in the form of sterile aqueous solutions or dispersions suitable for injectable use, or made in lyophilized forms using freeze-drying techniques. Lyophilized immunogenic compositions and vaccines are typically maintained at about 4°C, and can be reconstituted in a stabilizing solution, e.g., saline or and
 30 HEPES, with or without adjuvant. Immunogenic compositions and vaccines can also be made in the form of suspensions or emulsions.

Immunogenic compositions and vaccines of the present invention include a therapeutically effective amount of one or more of the above-described chimeric pestiviruses. Purified viruses can be used directly in an
 35 immunogenic composition or vaccine, or can be further attenuated, or inactivated. Typically, an immunogenic composition or vaccine contains between about 1×10^2 and about 1×10^{12} virus particles, or between about 1×10^3 and about 1×10^{11} virus particles, or between about 1×10^4 and about

5 1×10^{10} virus particles, or between about 1×10^5 and about 1×10^9 virus particles, or between about 1×10^6 and about 1×10^8 virus particles. The precise amount of a virus in an immunogenic composition or vaccine effective to provide a protective effect can be determined by a skilled artisan.

The immunogenic compositions and vaccines generally comprise a
10 veterinarily-acceptable carrier in a volume of between about 0.5 ml and about 5 ml. In another embodiment the volume of the carrier is between about 1 ml and about 4 ml, or between about 2 ml and about 3 ml. In another embodiment, the volume of the carrier is about 1 ml, or is about 2 ml, or is about 5 ml. Veterinarily-acceptable carriers suitable for use in immunogenic
15 compositions and vaccines can be any of those described hereinabove.

Those skilled in the art can readily determine whether a virus needs to be attenuated or inactivated before administration. In another embodiment of the present invention, a chimeric pestivirus can be administered directly to an animal without additional attenuation. The amount of a virus that is
20 therapeutically effective can vary depending on the particular virus used, the condition of the animal and/or the degree of infection, and can be determined by a skilled artisan.

In accordance with the methods of the present invention, a single dose can be administered to animals, or, alternatively, two or more inoculations can
25 take place with intervals of from about two to about ten weeks. Boosting regimens can be required and the dosage regimen can be adjusted to provide optimal immunization. Those skilled in the art can readily determine the optimal administration regimen.

Immunogenic compositions and vaccines can be administered directly
30 into the bloodstream, into muscle, or into an internal organ. Suitable means for parenteral administration include intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intrathecal, intraventricular, intraurethral, intrasternal, intracranial, intramuscular and subcutaneous. Suitable devices for parenteral administration include needle (including microneedle) injectors, needle-free
35 injectors and infusion techniques.

Parenteral formulations are typically aqueous solutions which can contain excipients such as salts, carbohydrates and buffering agents (preferably to a pH of from about 3 to about 9, or from about 4 to about 8, or

5 from about 5 to about 7.5, or from about 6 to about 7.5, or about 7 to about 7.5), but, for some applications, they can be more suitably formulated as a sterile non-aqueous solution or as a dried form to be used in conjunction with a suitable vehicle such as sterile, pyrogen-free water.

The preparation of parenteral formulations under sterile conditions, for
10 example, by lyophilisation, can readily be accomplished using standard pharmaceutical techniques well known to those skilled in the art.

The solubility of compounds used in the preparation of parenteral solutions can be increased by the use of appropriate formulation techniques known to the skilled artisan, such as the incorporation of solubility-enhancing
15 agents including buffers, salts, surfactants, liposomes, cyclodextrins, and the like.

Formulations for parenteral administration can be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed, sustained, pulsed, controlled, targeted and programmed release.
20 Thus compounds of the invention can be formulated as a solid, semi-solid, or thixotropic liquid for administration as an implanted depot providing modified release of the active compound. Examples of such formulations include drug-coated stents and poly(*D*-lactic-co-glycolic)acid (PLGA) microspheres.

Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can
25 also be administered topically to the skin or mucosa, that is, dermally or transdermally. Typical formulations for this purpose include gels, hydrogels, lotions, solutions, creams, ointments, dusting powders, dressings, foams, films, skin patches, wafers, implants, sponges, fibres, bandages and microemulsions. Liposomes can also be used. Typical carriers include
30 alcohol, water, mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, glycerin, polyethylene glycol and propylene glycol. Penetration enhancers can be incorporated. See, for example, Finnin and Morgan, *J. Pharm Sci*, 88 (10):955-958 (1999).

Other means of topical administration include delivery by
35 electroporation, iontophoresis, phonophoresis, sonophoresis and microneedle or needle-free (e.g. Powderject™, Bioject™, etc.) injection.

5 Formulations for topical administration can be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed, sustained, pulsed, controlled, targeted and programmed release.

 Immunogenic compositions and vaccines can also be administered intranasally or by inhalation, typically in the form of a dry powder (either alone
10 or as a mixture, for example, in a dry blend with lactose, or as a mixed component particle, for example, mixed with phospholipids, such as phosphatidylcholine) from a dry powder inhaler or as an aerosol spray from a pressurized container, pump, spray, atomizer (preferably an atomizer using electrohydrodynamics to produce a fine mist), or nebulizer, with or without the
15 use of a suitable propellant, such as 1,1,1,2-tetrafluoroethane or 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane. For intranasal use, the powder can comprise a bioadhesive agent, for example, chitosan or cyclodextrin.

 The pressurized container, pump, spray, atomizer, or nebulizer contains a solution or suspension of the compound(s) of the invention
20 comprising, for example, ethanol, aqueous ethanol, or a suitable alternative agent for dispersing, solubilizing, or extending release of the active, a propellant(s) as solvent and an optional surfactant, such as sorbitan trioleate, oleic acid, or an oligolactic acid.

 Prior to use in a dry powder or suspension formulation, the drug
25 product is generally micronized to a size suitable for delivery by inhalation (typically less than about 5 microns). This can be achieved by any appropriate comminuting method, such as spiral jet milling, fluid bed jet milling, supercritical fluid processing to form nanoparticles, high pressure homogenization, or spray drying.

30 Capsules (made, for example, from gelatin or hydroxypropylmethylcellulose), blisters and cartridges for use in an inhaler or insufflator can be formulated to contain a powder mix of the compound of the invention, a suitable powder base such as lactose or starch and a performance modifier such as *Heucine*, mannitol, or magnesium stearate. The
35 lactose can be anhydrous or in the form of the monohydrate. Other suitable excipients include dextran, glucose, maltose, sorbitol, xylitol, fructose, sucrose and trehalose.

5 A suitable solution formulation for use in an atomizer using electrohydrodynamics to produce a fine mist can contain from about 1 μg to about 20 mg of the compound of the invention per actuation and the actuation volume can vary from about 1 μl to about 100 μl . In another embodiment, the amount of compound per actuation can range from about 100 μg to about 15
10 mg, or from about 500 μg to about 10 mg, or from about 1 mg to about 10 mg, or from about 2.5 μg to about 5 mg. In another embodiment, the actuation volume can range from about 5 μl to about 75 μl , or from about 10 μl to about 50 μl , or from about 15 μl to about 25 μl . A typical formulation can comprise the compound of the invention, propylene glycol, sterile water, ethanol and
15 sodium chloride. Alternative solvents which can be used instead of propylene glycol include glycerol and polyethylene glycol.

Formulations for inhaled/intranasal administration can be formulated to be immediate and/or modified release using, for example, PGLA. Modified release formulations include delayed, sustained, pulsed, controlled, targeted
20 and programmed release.

In the case of dry powder inhalers and aerosols, the dosage unit is generally determined by means of a valve which delivers a metered amount. Units in accordance with the invention are typically arranged to administer a metered dose or "puff" containing from about 10 ng to about 100 μg of the
25 compound of the invention. In another embodiment, the amount of compound administered in a metered dose is from about 50 ng to about 75 μg , or from about 100 ng to about 50 μg , or from about 500 ng to about 25 μg , or from about 750 ng to about 10 μg , or from about 1 μg to about 5 μg . The overall daily dose will typically be in the range from about 1 μg to about 100 mg which
30 can be administered in a single dose or, more usually, as divided doses throughout the day. In another embodiment, the overall daily dose can range from about 50 μg to about 75 mg, or from about 100 μg to about 50 mg, or from about 500 μg to about 25 mg, or from about 750 μg to about 10 mg, or from about 1 mg to about 5 mg.

35 Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can also be administered orally or perorally, that is into a subject's body through or by way of the mouth and involves swallowing or transport through the oral mucosa (e.g., sublingual or buccal absorption) or both. Suitable flavors, such

5 as menthol and levomenthol, or sweeteners, such as saccharin or saccharin sodium, can be added to those formulations of the invention intended for oral or peroral administration.

Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can be administered rectally or vaginally, for example, in the form of a suppository,
10 pessary, or enema. Cocoa butter is a traditional suppository base, but various alternatives can be used as appropriate. Formulations for rectal/vaginal administration can be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed, sustained, pulsed, controlled, targeted and programmed release.

15 Immunogenic compositions and vaccines of the present invention can also be administered directly to the eye or ear, typically in the form of drops of a micronized suspension or solution in isotonic, pH-adjusted, sterile saline. Other formulations suitable for ocular and aural administration include ointments, biodegradable (e.g. absorbable gel sponges, collagen) and non-
20 biodegradable (e.g. silicone) implants, wafers, lenses and particulate or vesicular systems, such as niosomes or liposomes. A polymer such as crossed-linked polyacrylic acid, polyvinylalcohol, hyaluronic acid, a cellulosic polymer, for example, hydroxypropylmethylcellulose, hydroxyethylcellulose, or methyl cellulose, or a heteropolysaccharide polymer, for example, gelatin gum,
25 can be incorporated together with a preservative, such as benzalkonium chloride. Such formulations can also be delivered by iontophoresis.

Formulations for ocular/aural administration can be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed, sustained, pulsed, controlled, targeted and programmed release.

30 The immunogenic compositions and vaccines of the present invention can be used in the preparation of a medicament for treating or preventing the spread of bovine viral diarrhea virus infection in an animal.

The immunogenic compositions and vaccines of the present invention can be used in the preparation of a medicament for administering to an
35 animal, wherein the medicament is a DIVA pestivirus vaccine comprising a chimeric pestivirus comprising a bovine viral diarrhea virus which does not express its homologous E^{ms} protein, and wherein said chimeric pestivirus expresses a heterologous E^{ms} protein derived from another pestivirus, or a

- 5 natural, synthetic or genetic variant of said heterologous E^{ms} protein. In one embodiment, the chimeric pestivirus has at least one E^{ms} epitope which is not present in wild-type bovine viral diarrhea virus. In another embodiment the chimeric pestivirus lacks at least one E^{ms} epitope which is present in wild-type bovine viral diarrhea virus.

10

DETECTION, DIAGNOSTIC METHODS

The present invention provides methods of determining the origin of a pestivirus present in an animal subject.

- Vaccination which utilizes a DIVA vaccine - one which is able to
- 15 differentiate infected from vaccinated animals - provides a means for determining the origin of a pestivirus present in an animal subject. This differentiation can be accomplished via any of various diagnostic methods, including but not limited to ELISA, Western blotting and PCR. These and other methods are readily recognized and known to one of ordinary skill in the
- 20 art.

- The chimeric pestiviruses of the present invention can be distinguished from wild-type BVDV strains in both their genomic composition and proteins expressed. Such distinction allows for discrimination between vaccinated and infected animals. For example, a determination can be made as to whether an
- 25 animal testing positive for BVDV in certain laboratory tests carries a wild-type BVDV strain, or carries a chimeric pestivirus of the present invention previously obtained through vaccination.

- A variety of assays can be employed for making the determination. For example, virus can be isolated from the animal testing positive for BVDV, and
- 30 nucleic acid-based assays can be used to determine the presence of a chimeric pestivirus genome, indicative of prior vaccination. The nucleic acid-based assays include Southern or Northern blot analysis, PCR, and sequencing. Alternatively, protein-based assays can be employed. In protein-based assays, cells or tissues suspected of an infection can be isolated from
- 35 the animal testing positive for BVDV. Cellular extracts can be made from such cells or tissues and can be subjected to, e.g., Western Blot, using appropriate antibodies against viral proteins that can distinctively identify the presence of either the chimeric pestivirus previously inoculated, or wild-type BVDV.

5 The extent and nature of the immune responses induced in the animal can be assessed by using a variety of techniques. For example, sera can be collected from the inoculated animals and tested for the presence or absence of antibodies specific for the chimeric virus, e.g., in a conventional virus neutralization assay. Detection of responding cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) in lymphoid tissues can be achieved by assays such as T cell proliferation, as indicative of the induction of a cellular immune response. The relevant techniques are well described in the art, e.g., Coligan et al. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons Inc. (1994).

15 KITS

Inasmuch as it may be desirable to administer an immunogenic composition or vaccine in combination with additional compounds, for example, for the purpose of treating a particular disease or condition, it is within the scope of the present invention that an immunogenic composition or vaccine can conveniently be included in, or combined in, the form of a kit suitable for administration or co-administration of the compositions.

Thus, kits of the present invention can comprise one or more separate pharmaceutical compositions, at least one of which is an immunogenic composition or vaccine in accordance with the present invention, and a means for separately retaining said compositions, such as a container, divided bottle, or divided foil packet. An example of such a kit is a syringe and needle, and the like. A kit of the present invention is particularly suitable for administering different dosage forms, for example, oral or parenteral, for administering the separate compositions at different dosage intervals, or for titrating the separate compositions against one another. To assist one administering a composition of the present invention, the kit typically comprises directions for administration.

Another kit of the present invention can comprise one or more reagents useful for the detection of and differentiation between a BVDV-infected animal and a chimeric pestivirus-vaccinated animal. The kit can include reagents for analyzing a sample for the presence of whole BVDV, or BVDV polypeptides, epitopes or polynucleotide sequences which are not present in the chimeric pestivirus of the immunogenic composition or vaccine. Alternatively, kits of

5 the present invention can include reagents for analyzing a sample for the presence of a chimeric pestivirus, or polypeptides, epitopes or polynucleotide sequences which are not present in wild-type BVDV. The presence of virus, polypeptides, or polynucleotide sequences can be determined using antibodies, PCR, hybridization, and other detection methods known to those
10 of skill in the art.

Another kit of the present invention can provide reagents for the detection of antibodies against particular epitopes. The epitopes are either present in the chimeric pestivirus of the present invention and not present in wild type BVDV, or alternatively, are present in wild-type BVDV and not
15 present in the chimeric pestivirus of the present invention. Such reagents are useful for analyzing a sample for the presence of antibodies, and are readily known and available to one of ordinary skill in the art. The presence of antibodies can be determined using standard detection methods known to those of skill in the art.

20 In certain embodiments, the kits can include a set of printed instructions or a label indicating that the kit is useful for the detection and differentiation of BVDV-infected animals from chimeric pestivirus-vaccinated animals.

25 ANTIBODY, ANTIBODIES

Antibodies can either be monoclonal, polyclonal, or recombinant. Conveniently, the antibodies can be prepared against the immunogen or a portion thereof. For example, a synthetic peptide based on the amino acid sequence of the immunogen, or prepared recombinantly by cloning
30 techniques or the natural gene product and/or portions thereof can be isolated and used as the immunogen. Immunogens can be used to produce antibodies by standard antibody production technology well known to those skilled in the art, such as described generally in Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold
35 Spring Harbor, NY, (1988) and Borrebaeck, "Antibody Engineering - A Practical Guide", W.H. Freeman and Co. (1992). Antibody fragments can also be prepared from the antibodies, and include Fab, F(ab')₂, and Fv, by methods known to those skilled in the art.

5 In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by standard methods in immunology known in the art. Techniques not specifically described are generally followed as in Stites, et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton and Lange, Norwalk, CT (1994) and Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in
10 Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980). In general, ELISAs and Western blotting are the preferred types of immunoassays. Both assays are well known to those skilled in the art. Both polyclonal and monoclonal antibodies can be used in the assays. The antibody can be bound to a solid support substrate or conjugated with a detectable moiety or
15 be both bound and conjugated as is well known in the art. (For a general discussion of conjugation of fluorescent or enzymatic moieties, see Johnstone and Thorpe, "Immunochemistry in Practice", Blackwell Scientific Publications, Oxford (1982).) The binding of antibodies to a solid support substrate is also well known in the art. (For a general discussion, see Harlow and Lane (1988)
20 and Borrebaeck (1992).) The detectable moieties contemplated for use in the present invention can include, but are not limited to, fluorescent, metallic, enzymatic and radioactive markers such as biotin, gold, ferritin, alkaline phosphatase, b-galactosidase, peroxidase, urease, fluorescein, rhodamine, tritium, ^{14}C and iodination.

25 The present invention is further illustrated by, but by no means limited to, the following examples.

Example 1. Construction and Serological Characterization of Chimeric Pestiviruses

30 *E. coli* K12 GM2163 [F- ara-14, leuB6, thi-1, fhuA31, lacY1, tsx-78, galK2, galT22, supE44, hisG4, rpsL136, (Str^r), xyl-5, mtl-1, dam13::Tn9(Cam^r), dcm-6, mcrB1, hsdR2(rk⁻mk⁻), mcrA] harbors a plasmid containing the full length genomic cDNA of bovine viral diarrhea virus strain NADL (BVDV-NADL), obtained from Dr. R. Donis, University of Nebraska.

35 RD cells (bovine testicular cells transformed with SV40; obtained from Dr. R. Donis) were maintained in OptiMEM supplemented with 3% horse serum, 1% non-essential amino acids (NEAA) in modified Eagle's medium (MEM), 2 mM GlutaMax and 10 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin. BK-6 cells were obtained

5 from Pfizer Global Manufacturing (PGM). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) supplemented with 5% horse serum or donor calf serum (PGM), 2 mM Glutamax, and 1% Antibiotic and Antimycotic. All medium components except where indicated were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). All cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ environment.

Monoclonal antibody (MAb) 15C5 specific to BVDV E^{ms} was purchased from IDEXX (Westbrook, ME). MAb 20.10.6 against BVDV NS3 was provided by Dr. E. Dubovi (Cornell University). MAbs WS 363, WS 373 and WS 371, having specificity for the Border Disease virus (BDV) E^{ms} protein, were obtained from Veterinary Laboratories Agency (Surrey, UK). Bovine serum samples #77, #816, #1281, and #1434 were obtained internally at Pfizer.

Chimeric pestiviruses were generated by replacing the E^{ms} gene of the BVDV-NADL strain with the E^{ms} gene of giraffe (G-E^{ms}), reindeer (R-E^{ms}), or pronghorn antelope (P-E^{ms}) pestivirus using an overlapping PCR method. Either PfuUltraTM II fusion HS DNA polymerase (Stratagene; La Jolla, CA) or Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) was used. The oligonucleotide primers (with accompanying SEQ ID NOs) for overlapping PCRs and for generating a full length viral DNA are listed in Table 1.

25 **Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR amplification**

SEQ ID NO	Name	Origin	Sequences (5'-3')	Primer Binding Site (underlined sequence)
1	Oligo B-5	T7 + NADL	<u>GTGTTAATACGACTCACTATAG</u> TATACGAGAATTAGAAAAGGC	T7 promoter
2	Oligo 84	NADL	GGGGGCTGTTAGAGGTCTTCC	
3	Oligo 127	G-E ^{ms} + NADL	<u>AAATCCACTGGGTGATGTTCCTCTC</u> CCAATTGTAACTTGAAACAAAAC	G-E ^{ms} N-terminus
4	Oligo 128	G-E ^{ms}	GAGAACATCACCCAGTGGAA	
5	Oligo 129	G-E ^{ms}	TGCGTGGGCTCCAAACCATGT	
6	Oligo 130	G-E ^{ms} + NADL	<u>AACATGGTTTGGAGCCCACGCA</u> GCTTCCCCTTACTGTGATGTCTG	G-E ^{ms} C-terminus
7	Oligo 131	R-E ^{ms} + NADL	<u>GGTCCACTGTGTTATATTCCTCTC</u> CCATTGTAACTTGAAACAAAAC	R-E ^{ms} N-terminus
8	Oligo 132	R-E ^{ms}	GAGAATATAACACAGTGAACC	

9	Oligo 133	R-E ^{ms}	TGCATTAGCTCCGAACCACGTT	
10	Oligo 134	R-E ^{ms} + NADL	<u>AACGTGGTTCCGGAGCTAATGCA</u> GCTTCCCCTTACTGTGATGTCG	R-E ^{ms} C-terminus
11	Oligo 135	P-E ^{ms} + NADL	<u>GGTTCCTACTGAGTTATATTCAC</u> TCCCATTGTAACCTGAAACA	P-E ^{ms} N-terminus
12	Oligo 136	P-E ^{ms}	GTGAATATAACTCAGTGGAACC	
13	Oligo 137	P-E ^{ms}	TGCCTGTGCCCCAAACCATGT	
14	Oligo 138	P-E ^{ms} + NADL	<u>AACATGGTTTGGGGCACAGGCA</u> GCTTCCCCTTACTGTGATGTCG	P-E ^{ms} C-terminus
15	Oligo 175	NADL	GTTATCAATAGTAGCCACAGAAT	
16	Oligo 177	NADL	TCCACCCTCAATCGACGCTAAA	
17	Oligo 237	CM5960	CCCTGAGGCCTTCTGTTCTGAT	
18	Oligo P7	CM5960	CACTTGTCGGAGGTACTACTACT	
19	Oligo P8	CM5960	CTTGCTATCTTATCTCTTATTGC	
20	Oligo P3	CM5960	ACTATCTGAACAGTTGGACAGG	
21	Oligo 296-1	T7 + CM53637	<u>GTGTTAATACGACTCACTATA</u> GTATACGAGATTAGCTAAAG	T7 promoter
22	Oligo 297	P- E ^{ms} +CM53637	<u>CCAGGTCCACTGAGTTATATTCAC</u> TCCTGTTACCAGCTGAAGCAGAA	P-E ^{ms} N-terminus
23	Oligo 298	P- E ^{ms} +CM53637	<u>AACATGGTTTGGGGCACAGGCA</u> GCAAGTCCATACTGTAAAGTG	P-E ^{ms} C-terminus
24	Oligo 299	CM53637	TTAATGCCCTCCCTGTCTCTACCACCT	
25	Oligo 300	CM53637	AGGATGAGGATCTAGCAGTGGATCT	
26	Oligo 303	CM53637	CCATAGCCATCTGCTCAGACAGTA	
27	Oligo 92-1	CM53637	GGGGCTGTCAGAGGCATCCTCTAGTC	
28	Oligo 321	CM53637	AGCCACTACACCTGTCACGAGAAG	
29	Oligo 250	NADL	<u>CACCATGAAAATAGTGCCCAAAGAAATC</u>	NADL-C C terminus
30	Oligo 252	NADL	<u>TTAAGCGTATGCTCCAAACCACGTC</u>	NADL-E ^{ms} C terminus

5

Plasmid containing the full length cDNA of BVDV-NADL was extracted from *dam- E. coli* K12 GM2163. The plasmid was methylated *in vitro* with *dam* methyltransferase and S-adenosylmethionine (New England Biolabs; Ipswich, MA). G-E^{ms}, R-E^{ms}, and P-E^{ms} genes (GenBank accession numbers NC_003678, NC_003677, and AY781152, respectively) were synthesized and cloned into a cloning vector.

For construction of chimeric BVDV-NADL/G-E^{ms} DNA, a fragment of BVDV-NADL encoding for the 5'UTR to the 3' end of C gene was amplified by PCR from methylated plasmid with primers Oligo B-5 and Oligo 127. The G-

5 E^{ms} gene was amplified by PCR from the plasmid DNA containing the G-E^{ms} gene with Oligo 128 and Oligo 129. A BVDV fragment encoding for E1 to the 3'UTR was amplified by PCR from methylated plasmid with Oligo 130 and Oligo 84. The PCR products were gel purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen; Valencia, CA). The purified PCR products were treated with Dpn
10 I and Exonuclease 1 (New England Biolabs). The treated PCR products were assembled to create a full length chimeric BVDV-NADL/G-E^{ms} genome by PCR using Oligo B-5 and Oligo 84.

For construction of chimeric BVDV-NADL/R-E^{ms} DNA, a fragment of BVDV-NADL encoding for the 5'UTR to the 3' end of C gene was amplified by
15 PCR from methylated plasmid with primers Oligo B-5 and Oligo 131. The R-E^{ms} gene was amplified by PCR from the plasmid containing R-E^{ms} gene with Oligo 132 and Oligo 133. A BVDV fragment encoding for E1 to the 3'UTR was amplified by PCR from methylated plasmid with Oligo 134 and Oligo 84. The PCR products were gel purified with QIAquick Gel Extraction Kit. The purified
20 PCR products were treated with Dpn I and Exonuclease 1. The treated PCR products were assembled to create a full length chimeric BVDV-NADL/R-E^{ms} genome by PCR with Oligo B-5 and Oligo 84.

For construction of chimeric BVDV-NADL/P-E^{ms} DNA, a fragment of BVDV-NADL encoding for the 5'UTR to the 3' end of C gene was amplified by
25 PCR from methylated plasmid with primers Oligo B-5 and Oligo 135. The P-E^{ms} gene was amplified by PCR from the plasmid DNA containing P-E^{ms} gene with Oligo 136 and Oligo 137. A BVDV fragment encoding for E1 to the 3'UTR was amplified by PCR from methylated plasmid with Oligo 138 and Oligo 84. The PCR products were gel purified with QIAquick Gel Extraction
30 Kit. The purified PCR products were treated with Dpn I and Exonuclease 1. The treated PCR products were assembled to create a full length chimeric BVDV-NADL/P-E^{ms} genome by PCR with Oligo B-5 and Oligo 84.

For sequence confirmation of the chimeric E^{ms} regions, a fragment corresponding to the 5' UTR to the E1 region of each assembled full length
35 chimeric genome was amplified by PCR using Oligo B-5 and Oligo 175, and the PCR products were sequenced and analyzed.

Full length viral genomic RNA transcripts were generated from plasmid containing the full-length cDNA of BVDV-NADL or chimeric BVDV-NADL/E^{ms}

- 5 DNAs using mMessage mMachine T7 Ultra kit (Ambion; Austin, TX). Quality and quantity of each RNA transcript was determined on an RNA gel and a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop; Wilmington, DE). Overnight cultures of RD cells in wells of 6-well plates were transfected with viral RNA using Lipofectin reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.
- 10 Following transfection, the cells were incubated at 37°C for 3 days. The supernatants were harvested and stored at -80°C.

- Viral RNAs from harvested supernatants were extracted using MagMax™ AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. The RNAs were reverse transcribed and the
- 15 region of each chimera encoding N^{pro} to E1 was amplified using primers Oligo 177 and Oligo 175 (Table 1), and the ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The RT-PCR products were then sequenced.

- Cell monolayers from either a viral RNA transfection or virus infection
- 20 were fixed in 80% acetone. BVDV- or BDV-specific monoclonal antibodies (Mabs) were used in conjunction with the anti-mouse IgG peroxidase ABC Elite kit (Vector Laboratories; Burlingame, CA). Color was developed using VIP peroxidase substrate (Vector Laboratories).

- Chimeric virus titers were determined by a limiting dilution method.
- 25 Viral samples were 10-fold serially diluted and transferred to 96-well plates (100 µl per well), with 4 - 6 replicates per dilution. 100 µl of a suspension of BK-6 cells were then added to each well, and the plates incubated at 37°C for 4 - 5 days. Virus infection was determined by both cytopathic effect (CPE) and MAb staining. Virus titers were calculated using the Spearman-Kärber
- 30 method.

- To obtain the biological clones of each chimera, virus samples were first diluted 100-fold and followed by a 10-fold dilution series. 100 µl of the diluted viruses were transferred to each well of a 96 well plate, 4 replicates per dilution. 100 µl of BK-6 cells were then added to each well, and the plates
- 35 incubated at 37°C for 4 days. The supernatants were harvested and transferred to new plates and stored at -80°C. The cells were fixed and stained. The supernatants from wells containing single virus foci were harvested and expanded as virus stocks.

5 Growth kinetics studies were carried out in T-25 flasks containing BK-6 cells. When the cells reached approximately 90% confluency, they were infected with each chimera at MOI of 0.02. After adsorption for 1 hr, the inoculum was removed. Cells were washed 3x with PBS, and 3 ml of fresh growth medium was then added. Samples were then collected at various time
10 points from 0 to 144 hrs for titer determinations.

For the virus neutralization test, frozen stocks of the three BVDV-NADL/E^{ms} chimeras, parental BVDV-NADL, and BVDV-CM5960 (BVDV type I) were diluted in DMEM to about 4,000 TCID₅₀/ml. Sera from cattle immunized with Bovi-Shield Gold (Pfizer; New York, NY), with pre-determined
15 titers against both BVDV type I and II, were 2-fold serially diluted with DMEM. 50 µl of virus (200 TCID₅₀) were mixed with an equal volume of diluted cattle serum in 96-well tissue culture plates (4 replicates/dilution), and incubated at 37°C for 60 min. 100 µl of BK-6 cells were then added to each well, and the plates were incubated at 37°C for 3-6 days. Serum negative for BVDV
20 antibodies was also included in each plate as a control. End point neutralization titers of the sera were determined by both CPE and by immunohistochemistry (IHC) at day 3 and day 6.

Results. Chimeric BVDV-NADL/E^{ms} DNAs in which the NADL E^{ms} gene/protein was replaced by E^{ms} of giraffe (G-E^{ms}), reindeer (R-E^{ms}) or
25 pronghorn antelope (P-E^{ms}) pestivirus, were constructed. Plasmid DNA containing each of the chimeric E^{ms} regions was sequenced to confirm sequence authenticity. The following chimeric pestiviruses were deposited with the American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, USA on April 2, 2009, and confirmed viable by the
30 ATCC® on April 23, 2009: BVDV-NADL/G-E^{ms} (PTA-9938), BVDV-NADL/P-E^{ms} (PTA-9939), and BVDV-NADL/R-E^{ms} (PTA-9940).

BVDV-NADL/E^{ms} chimeric viruses were rescued from RD cells after transfection with *in vitro*-transcribed viral RNA. Extensive cytopathic effect (CPE) in RD cells was observed 48 - 72 hours after transfection with BVDV-NADL/G-E^{ms} or BVDV-NADL/R-E^{ms} RNA transcripts. CPE was not obvious
35 with the BVDV-NADL/P-E^{ms} virus, however. Culture supernatants were harvested from each well, and the remaining cells were fixed and stained with BVDV NS3-specific MAb antibody 20.10.6. Cells infected with one of the

5 three chimeric pestiviruses were incubated with the MAb. Viral RNAs were extracted from the harvested supernatants, and sequenced to confirm the E^{ms} genes of all three chimeras.

The three BVDV-NADL/E^{ms} chimeras were tested for their reactivity to each of several E^{ms} MAbs specific for BVDV or BDV. The results are shown in
10 Table 2. The BVDV-NADL/R-E^{ms} chimera reacted to all three BDV E^{ms} MAbs, while neither BVDV-NADL/G-E^{ms}, BVDV-NADL/P-E^{ms} nor BVDV-NADL parental virus were recognized by BDV E^{ms} MAbs. BVDV-NADL/G-E^{ms}, BVDV-NADL/R-E^{ms}, and NADL parental virus reacted to a pan-BVDV E^{ms} MAb 15C5. MAbs specific to either E^{ms} of BDV or BVDV did not react with the
15 BVDV-NADL/P-E^{ms} chimera.

Table 2. Reactivity of BVDV-NADL/E^{ms} chimeras to MAbs

Mab	Specificity	Chimera reactivity			
		BVDV-NADL/G-E ^{ms}	BVDV-NADL/R-E ^{ms}	BVDV-NADL/P-E ^{ms}	BVDV-NADL
20					
WS 371	BDV E ^{ms}	-	+++	-	-
25					
WS 373	BDV E ^{ms}	-	+++	-	-
WS363	BDV E ^{ms}	-	+++	-	-
30	15C5	+++	+++	-	+++
20.10.6	Pestivirus NS3	+++	+++	++	+++

35 In order to determine whether the chimeric E^{ms} proteins in the viruses had any impact on the recognition of viral neutralizing epitopes by antibodies from BVDV-vaccinated cattle, a virus neutralization assay was performed with the three BVDV-NADL/E^{ms} chimeras, BVDV-NADL, and BVDV-CM5960 (BVDV type I). Sera from 4 cows with neutralizing antibody titers ranging from
40 0 to greater than 40,000 (determined previously against BVDV-CM5960) were

utilized. The results (Table 3) indicate that titers against all three chimeras were generally comparable to those for parental BVDV-NADL and BVDV-CM5960. The neutralization titers against BVDV-NADL/P-E^{rns} were slightly lower than those against the other two chimeras, BVDV-NADL and BVDV-CM5960.

Table 3. Neutralization titers of bovine antisera against BVDV-NADL/E^{rns} chimeras

Cattle		Neutralization titers			
Sera #	BVDV-NADL/G-E ^{rns}	BVDV-NADL/R-E ^{rns}	BVDV-NADL/P-E ^{rns}	BVDV-NADL	
CM5960					
816	< 10	<10	<10	<10	
<10					
77	320	320	320	160	320
1281	6400	12800	3200	3200	
25600					
1434	51200	25600	6400	25600	
51200					

The three BVDV-NADL/E^{rns} chimeras were biologically cloned two times by limiting dilution. Three clones of BVDV-NADL/G-E^{rns}, four of BVDV-NADL/R-E^{rns}, and three of BVDV-NADL/P-E^{rns} were obtained. These clones were each expanded between 1-3 times. Titration results indicated that expanded BVDV-NADL/G-E^{rns} clone 1, BVDV-NADL/R-E^{rns} clones 3 and 5, and BVDV-NADL/P-E^{rns} clone 2 yielded the highest titers.

Growth kinetics studies were performed with BVDV-NADL/G-E^{rns} clone 1, BVDV-NADL/R-E^{rns} clone 3, BVDV-NADL/P-E^{rns} clone 2, and uncloned BVDV-NADL/P-E^{rns}. Growth curves generated from these clones were compared to the parental BVDV-NADL. BVDV-NADL/G-E^{rns} and BVDV-NADL/R-E^{rns} chimeras had growth kinetics similar to the parental BVDV-NADL, while BVDV-NADL/P-E^{rns} grew slower and had lower titers at each time point than the parental virus and other two chimeras.

5 Three BVDV-NADL/E^{ms} chimeric viruses were created, in which the NADL E^{ms} gene/protein was replaced by E^{ms} of a giraffe, reindeer or pronghorn antelope pestivirus. All three chimeras were viable and infectious in both RD and BK-6 cells. *In vitro* data demonstrated that the chimeric E^{ms} proteins did not affect neutralization of the chimeras by antisera from BVDV-
10 vaccinated cattle. This suggests that neutralizing epitopes on the chimeric viruses, regardless of where they are located, were not affected by the E^{ms} substitutions.

 The chimeric viruses had different growth kinetics and reacted differently to BVDV or BDV E^{ms} monoclonal antibodies. BVDV-NADL/G-E^{ms} and BVDV-NADL/R-E^{ms} had similar growth kinetics to the parental virus, while
15 BVDV-NADL/P-E^{ms} grew slower and to a lower titer than the parental virus. Both BVDV-NADL/G-E^{ms} and BVDV-NADL/R-E^{ms} reacted to BVDV E^{ms} monoclonal antibody 15C5, while BVDV-NADL/P-E^{ms} did not. Sequence comparison results showed that G-E^{ms} and R-E^{ms} had higher sequence
20 similarities to BVDV NADL (75.8% and 76.2%, respectively) than P-E^{ms} (59%). These data, taken together with the MAb reactivity results, suggest that G-E^{ms} and R-E^{ms} may be antigenically more similar to the parental E^{ms} than P-E^{ms}.

25 **Example 2. Construction and Serological Characterization and Efficacy Testing of Chimeric Pestivirus Vaccine Candidates**

 Type 1 BVDV strain CM5960 and Type 2 BVDV strain CM53637 were obtained from Pfizer Global Manufacturing. The viral RNAs were extracted using MagMaxTM AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion) according to the
30 manufacturer's instructions. The RNAs were reverse transcribed to generate cDNAs using ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Chimeric pestiviruses were generated by replacing the E^{ms} gene of CM5960 and CM53637 with the E^{ms} gene of pronghorn antelope pestivirus (P-E^{ms}) using an overlapping PCR method.
35 The oligonucleotide primers used for PCRs are listed in Table 1.

 For construction of chimeric CM5960/P-E^{ms} DNA, a fragment of CM5960 cDNA between the 5'UTR and the 3' end of C gene was amplified by PCR from CM5960 cDNA with primers Oligo B-5 and Oligo 135. The P-E^{ms}

5 gene was amplified by PCR from the plasmid DNA containing P-E^{ms} gene with Oligo 136 and Oligo 137. A third fragment between the beginning of E1 and the 3' end of E2 was amplified by PCR from CM5960 cDNA with primers Oligo 138 and Oligo 237.

The above-described fragments were gel purified using a QIAquick Gel
10 Extraction Kit (Qiagen), and assembled by PCR to create one fragment with Oligo B-5 and Oligo 237. A fragment between E1 region and NS5B region was amplified by PCR from CM5960 cDNAs with primers Oligo P7 and Oligo P8. Another fragment between NS5A region and the end of 3'UTR was amplified by PCR from CM5960 cDNAs with primers Oligo P3 and Oligo 84.
15 These three fragments were then gel purified, and assembled by PCR with Oligo B-5 and Oligo 84 to create a full length chimeric CM5960L/P-E^{ms} genome.

For construction of chimeric CM53637/P-E^{ms} DNA, a fragment of CM53637 cDNA between the 5'UTR and the 3' end of C gene was amplified
20 by PCR from CM53637 cDNA with primers Oligo 296-1 and Oligo 297. A second fragment between the beginning of E1 and the 3' end of E2 was amplified by PCR from CM53637 cDNA with primers Oligo 298 and Oligo 303. These two fragments were gel purified, and together with a fragment encoding for the P-E^{ms} gene (see above), were assembled by PCR to create one
25 fragment using Oligo 296-1 and Oligo 303.

A fragment between E1 region and NS3 region was then amplified by PCR from CM53637 cDNA with primers Oligo 298 and Oligo 299. Another fragment between NS3 region and the end of 3'UTR was also amplified by PCR from CM53637 cDNA with primers Oligo 300 and Oligo 92-1. These two
30 fragments and the one above were gel purified, and assembled by PCR with Oligo 296-1 and Oligo 92-1 to create a full length chimeric CM53637/P-E^{ms} genome.

Full length viral genomic RNA transcripts were generated from chimeric CM5960/P-E^{ms} and chimeric CM53637/P-E^{ms} DNAs using mMessage
35 mMachinE T7 Ultra kit (Ambion). Quality and quantity of each RNA transcript was determined on an RNA gel. Overnight cultures of RD cells in wells of 6-well plates were transfected with viral RNA using Lipofectin reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Following

5 transfection, the cells were incubated at 37°C for 3 days. The cells plus the supernatants were passed one to several times in RD and/or BK-6 cells. The supernatants were then serially passed in BK-6 cells. The supernatants were harvested and stored at -80°C.

To confirm the identity of rescued recombinant virus, viral RNAs from
10 harvested supernatants were extracted using MagMax™ AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. The RNAs were reverse transcribed using ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and the region of each chimera between 5' UTR and E2 or p7 was amplified by PCR using primers Oligo B-5
15 and Oligo 237 (for CM5960/P-E^{ms} chimera) or Oligo 296-1 and Oligo 321 (for CM53637/P-E^{ms} chimera) (Table 1). The RT-PCR products were then sequenced.

Cell monolayers from either a viral RNA transfection or virus infection were fixed in 80% acetone. BVDV specific MAbs were used in conjunction
20 with the anti-mouse IgG peroxidase ABC Elite kit (Vector Laboratories) for immunohistochemistry. Color was developed using VIP peroxidase substrate (Vector Laboratories).

Results. Chimeric CM5960/P-E^{ms} and CM53637/P-E^{ms} viruses were constructed and rescued. The 5'UTR to E2 regions, including the chimeric
25 pronghorn-E^{ms} regions, were confirmed by sequencing. Both chimeras were viable and infectious in both RD and BK-6 cells. Both chimeras were not reactive to BVDV E^{ms} specific MAb 15C5, but reactive to BVDV NS3 specific MAb 20.10.6 in immunohistochemistry staining.

The sequence for the chimeric pestivirus (BVDV-CM5960 (BVDV type
30 I)/P-E^{ms}) is presented in the sequence listing as SEQ ID NO: 31. The sequence for the chimeric pestivirus (BVDV-CM53637 (BVDV type II)/P-E^{ms}) is presented in the sequence listing as SEQ ID NO: 32.

The CM5960/P-E^{ms} chimera was biologically cloned by limited dilution (see above Example 1 for methodology).

35

Example 3. Efficacy Testing of Chimeric Pestivirus Vaccine Candidates in a Calf Respiratory Disease Model

5 BVDV negative healthy calves are obtained, randomly assigned to study groups, and maintained under supervision of an attending veterinarian. The test vaccine is combined with a sterile adjuvant, and administered by either intramuscular (IM) or subcutaneous (SC) injection, or by intranasal (IN) inoculation. The vaccine is given either as one or two doses. Two doses of
10 vaccine are administered, 21 to 28 days apart. The animals are subsequently challenged at 21 to 28 days following the final vaccination with a Type 1 or Type 2 strain of BVDV. Challenge inoculum is given intranasally in a 4 ml divided dose, 2 ml per nostril. Control groups consisting of unvaccinated, unchallenged animals and/or unvaccinated, challenged animals are also
15 maintained throughout the study.

Clinical parameters are monitored daily, including rectal temperature, depression, anorexia, and diarrhea. Serum neutralization titers are determined by a constant-virus, decreasing-serum assay in bovine cell culture, using serial dilutions of serum combined with a BVDV Type 1 or 2
20 strain. Post-challenge isolation of BVDV in bovine cell culture is attempted from peripheral blood. A BVDV-positive cell culture is determined by indirect immunofluorescence. To demonstrate protection following challenge, a reduction in incidence of infection is demonstrated in vaccinated groups versus the control groups.

25

Example 4. Chimeric Pestivirus Vaccine Efficacy Testing in a Pregnant Cow-Calf Model

BVDV-negative cows and heifers of breeding age are obtained and randomly assigned to a vaccination test group or a placebo (control) group.
30 Cows are inoculated twice by intramuscular (IM) or subcutaneous (SC) injection, with either vaccine or placebo, 21 to 28 days apart. Following the second vaccination, all cows receive an IM prostaglandin injection to synchronize estrus. Cows displaying estrus are bred by artificial insemination with certified BVDV-negative semen. At approximately 60 days of gestation,
35 the pregnancy status of cows is determined by rectal palpation.

Approximately 6 weeks later, cows with confirmed pregnancies are randomly selected from each test group. Each of these cows is challenged by intranasal inoculation of BVDV Type 1 or 2. Blood samples are collected on

5 the day of challenge and at multiple postchallenge intervals for purposes of BVDV isolation.

Twenty-eight days after challenge, left flank laparotomies are performed and amniotic fluid is extracted from each cow. Immediately prior to surgery, a blood sample is collected from each cow for serum neutralization
10 assays. Following caesarian delivery, a blood sample is collected from each fetus. Fetuses are then euthanized, and tissues are aseptically collected for purposes of BVDV isolation. In cases where spontaneous abortions occur, blood samples are taken from the dam when abortion is detected and two weeks later. The paired blood samples and aborted fetuses are subjected to
15 serologic testing and virus isolation. Vaccine efficacy is demonstrated by a lack or decrease of fetal infection and late-term abortion.

Example 5. Diagnostic Assays for Differentiation between Vaccinated and Naturally Infected Cattle

20 Cattle vaccinated with a vaccine of the present invention can be compared with cattle naturally infected with a wild type BVDV. Cattle of various ages are vaccinated with either a live or inactivated chimeric pestivirus vaccine according to instructions provided. Serum samples are collected 2-3 weeks or later following vaccination. To differentiate between
25 cattle which received the chimeric pestivirus vaccine versus those infected by a field (wild-type) strain of BVDV, serum samples are tested via a differential diagnostic assay. The chimeric pestivirus elicits the production of specific antibodies which bind to the E^{ms} protein of the chimeric pestivirus, but not to the E^{ms} protein present on wild-type BVDV. In the context of wild-type BVDV,
30 the opposite is true. Specific antibodies are generated which recognize the E^{ms} protein present on wild-type BVDV, but not the E^{ms} protein present on the chimeric pestivirus. Methods of assaying for antibody binding specificity and affinity are well known in the art, and include but are not limited to immunoassay formats such as competitive ELISA, direct peptide ELISA,
35 Western blots, indirect immunofluorescent assays, and the like.

For a competitive ELISA, whole or partial wild-type or chimeric pestivirus viral antigens, including the E^{ms} protein (naturally, synthetically or recombinantly derived), are used as an antigen source. Following coating of

5 the ELISA plate with antigen under alkaline conditions, cattle serum samples and dilutions are added together with an optimized dilution of a MAb specific for either E^{ms} protein of the wild type BVDV or the E^{ms} protein of the chimeric pestivirus, and incubated for 30 -90 min. Either horseradish peroxidase or alkaline phosphatase is conjugated to the MAb to allow for colorimetric
10 detection of binding. Following washing of the plates, an enzyme-specific chromogenic substrate is added, and after a final incubation step, the optical density of each well is measured at a wavelength appropriate for the substrate used. The degree of inhibition of binding of the labeled mAb is dependent on the level of antibodies in the cattle serum that specifically recognize the
15 protein coating the plate.

In the case of chimeric E^{ms} protein (e.g. pronghorn E^{ms}) present on the chimeric pestivirus being the test antigen, a lack of binding by the chimeric pestivirus E^{ms}-specific mAb indicates the presence of antibodies in the cattle serum that recognize the chimeric pestivirus -specific epitope, indicative of
20 vaccination. In contrast, serum from cattle not immunized, but naturally infected, will not contain antibodies which will bind to the chimeric pestivirus E^{ms} protein coating the plate. Therefore, the chimeric pestivirus E^{ms}-specific mAb will bind to the bound protein, and result in subsequent color development.

25 In the case of E^{ms} protein present on wild-type BVDV being the test antigen, a lack of binding by the wild type BVDV E^{ms}-specific mAb indicates the presence of antibodies in the cattle serum that recognize the wild-type BVDV-specific epitope, indicative of a natural (wild-type) infection. In contrast, serum from cattle immunized with the chimeric pestivirus vaccine will not
30 contain antibodies which will bind to the wild-type BVDV E^{ms} protein coating the plate. Therefore, the wild type BVDV E^{ms}-specific mAb will bind to the bound protein, and result in subsequent color development.

For development of such an assay, the following methods were carried out.

First, a recombinant baculovirus expressing BVDV-NADL E^{ms} was
35 constructed. A portion of the C protein of BVDV, plus the full length E^{ms} gene, were amplified by PCR from a plasmid containing full length of BVDV-NADL cDNA with primers Oligo 250 (SEQ ID NO: 29; 5'-CACCATGAAAATAGTGCCCAAAGAATC-3') and Oligo 252 (SEQ ID NO:

5 30; 5'-TTAAGCGTATGCTCCAAACCACGTC-3'). The PCR product was cloned into pENTR™/D-TOPO (Invitrogen) and transformed into One Shot® Competent *E. coli* (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The recombinant plasmid was extracted and the insert was confirmed by sequencing. This plasmid was designated pENTR-E^{ms}. pENTR-E^{ms} and
10 BaculoDirect™ Baculovirus Expression System (Invitrogen) were used to construct recombinant baculovirus expressing BVDV-NADL E^{ms} according to the manufacturer's instructions. The recombinant baculovirus expressing BVDV-NADL E^{ms} was generated, plaque purified, expanded, and stored at both 4° C and -80° C. The expression of BVDV-NADL E^{ms} in the recombinant
15 baculovirus was confirmed by immunofluorescent staining and Western blotting against BVDV E^{ms} specific MAb 15C5 following conventional Western Blot methods.

For production of the ELISA antigen, SF21 cells in 100 ml suspension culture were infected with 0.5 ml of the recombinant baculovirus stock. The
20 cells were harvested after 4 days incubation at 27° C. The cells were centrifuged at low speed (about 800g) for 10 min to collect the cells and washed once with PBS. The cells were lysed with 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8.0, and 1% IGEPAL CA-630. The mixture was first incubated on ice for 10 minutes and then at -80° C for 1 hour. After thawing, the mixture was
25 clarified by centrifugation at 1000g for 15 minutes. The supernatant was further clarified by centrifuge at 8000g for 20 minutes at 4° C. The final supernatant, designated Baculo-E^{ms} lysate, was aliquoted and stored at -80° C.

In carrying out the assay, the ELISA plates were coated overnight at 4°
30 C with 100 µl/well of MAb WB210 (Veterinary Laboratory Agency; Type 1 BVDV E^{ms} specific), diluted 1:1000 in carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.0). The next day, the plates were washed three times and blocked with blocking buffer (PBS containing 1% casein sodium salt and 0.05% Tween 20) at 37° C for 1 hour. The plates were subsequently washed three times with blocking
35 buffer, and 100 µl of Baculo-E^{ms} lysate (1:3200 diluted in PBS) was added to each well, and the plates were incubated at 37° C for 1 hour. Following three washes with blocking buffer, 100 µl of undiluted cattle serum samples were added to the wells, except for one column of wells (to serve as non-competing

34

5 15C5-HRP controls), and incubated at 37° C for 1 hour. Following three more washes with blocking buffer, 100 µl of MAb 15C5-HRP conjugate (BVDV E^{ns} specific, 1:20,000 diluted in blocking buffer) was added to each well, and incubated at 37° C for 1 hour. Following three washes with blocking buffer, 100 µl of ABTS substrate (Peroxidase substrate solutions A + B; KPL, USA) was added to each well, and incubated at room temperature for 20 - 60 minutes for color development. The optical density (OD) was measured at the wavelength of 405 nm. The percentage of OD reduction for each serum sample is calculated by following formula:

[1 - (OD of Sample ÷ Mean OD of 15C5-HRP Controls)] x 100%.

15 Results:

All of the serum samples that tested positive by the virus neutralization (VN) test had over 82% O.D. reduction, except sample ID# 13851 (Table 4). All of the serum samples that tested negative by the virus neutralization test had less than 17% O.D. reduction, except sample ID# 5150 (Table 4). The discrepancy might be explained by the differences in how the assays are carried out, as they are measuring different antibodies, and the proportion of specific antibodies varies among animals.

25 **Table 4. BVDV positive and negative serum samples in a MAb15C5 competition ELISA.**

Row #	Sample ID	O.D. of Sample	Average O.D. of No Serum Column	% Reduction
1	40021	0.0615	0.907013	93.21950182
2	40014	0.0965	0.907013	89.36068171
3	40422	0.0639	0.907013	92.95489701
4	40372	0.0754	0.907013	91.68699897
5	40222	0.0634	0.907013	93.01002301
6	40152	0.0894	0.907013	90.14347093
7	13461	0.0663	0.907013	92.6902922
8	13851	0.641	0.907013	29.32846607
9	13801	0.1599	0.907013	82.37070472
10	13904	0.073	0.907013	91.95160378

11	40504	0.0625	0.907013	93.10924981
12	40471	0.0914	0.907013	89.92296693
13	35037	0.0639	0.907013	92.95489701
14	13690	0.159	0.907013	82.46993152
15	13797	0.0859	0.907013	90.52935294
16	6127	0.0886	0.907013	90.23167253
17	5138	0.7434	0.907013	18.03866097
18	5139	0.8423	0.907013	7.13473787
19	5141	0.7732	0.907013	14.75315128
20	5142	0.7475	0.907013	17.58662776
21	5144	0.8293	0.907013	8.568013909
22	5145	0.9488	0.907013	-4.607100449
23	5146	0.9451	0.907013	-4.199168038
24	5147	1.0138	0.907013	-11.77348064
25	5148	0.9322	0.907013	-2.7769172
26	5149	0.9794	0.907013	-7.980811741
27	5150	0.1157	0.907013	87.24384325

Rows 1-16: Positive cattle serum samples

Rows 17-27: Negative cattle serum samples

- All serum samples are used undiluted in the ELISA

5

Although the present invention has been described in considerable detail with reference to certain versions thereof, other versions are possible. Therefore, the scope of the appended claims should not be limited to the description of the versions contained herein.

We claim:

1. A chimeric pestivirus, wherein said chimeric pestivirus comprises a bovine viral diarrhea virus which does not express its homologous E^{ms} protein, further wherein said chimeric pestivirus expresses a heterologous E^{ms} protein derived from another pestivirus, or a natural, synthetic or genetic variant of said heterologous E^{ms} protein.
2. The chimeric pestivirus of claim 1, wherein the heterologous E^{ms} protein of said chimeric pestivirus, or the natural, synthetic or genetic variant of said heterologous E^{ms} protein, is derived from a pestivirus selected from the group consisting of a reindeer pestivirus, a giraffe pestivirus, and a pronghorn antelope pestivirus.
3. The chimeric pestivirus of claim 1, wherein the heterologous E^{ms} protein of said chimeric pestivirus has at least one E^{ms} epitope which is not present in wild-type bovine viral diarrhea virus.
4. The chimeric pestivirus of claim 1, wherein the heterologous E^{ms} protein of said chimeric pestivirus lacks at least one E^{ms} epitope which is present in wild-type bovine viral diarrhea virus.
5. A culture of the chimeric pestivirus of claim 1.
6. A cell line or host cell comprising the chimeric pestivirus of claim 1.
7. A polynucleotide molecule encoding for the chimeric pestivirus of claim 1.
8. An immunogenic composition comprising the chimeric pestivirus of claim 1 and a veterinarily-acceptable carrier.
9. The immunogenic composition of claim 8, wherein the veterinarily-acceptable carrier is an adjuvant.
10. The immunogenic composition of claim 8, wherein said chimeric pestivirus is live attenuated.
11. The immunogenic composition of claim 8, wherein said chimeric pestivirus is inactivated.
12. The immunogenic composition of claim 8, further comprising one or more additional antigens useful for treating or preventing the spread of one or more additional pathogenic microorganisms in a bovine.

13. An immunogenic composition comprising the polynucleotide molecule of claim 7 and a veterinarily-acceptable carrier.
14. A vaccine comprising the chimeric pestivirus of claim 1 and a veterinarily-acceptable carrier.
15. The vaccine of claim 14, wherein the veterinarily-acceptable carrier is an adjuvant.
16. The vaccine of claim 14, wherein said chimeric pestivirus is live attenuated.
17. The vaccine of claim 14, wherein said chimeric pestivirus is inactivated.
18. A vaccine comprising the polynucleotide molecule of claim 7 and a veterinary acceptable carrier.
19. The vaccine of claim 14, further comprising one or more additional antigens useful for treating or preventing the spread of one or more additional pathogenic microorganisms in a bovine.
20. A kit comprising, in at least one container, the vaccine of claim 14.
21. A method of treating or preventing the spread of bovine viral diarrhea virus infection, wherein the vaccine of claim 14 is administered to an animal.
22. A method of vaccinating an animal, wherein a DIVA pestivirus vaccine is administered to said animal, and wherein said DIVA pestivirus vaccine comprises the chimeric pestivirus of claim 1, further wherein said chimeric pestivirus has at least one E^{ms} epitope which is not present in wild-type bovine viral diarrhea virus.
23. A method of vaccinating an animal, wherein a DIVA pestivirus vaccine is administered to said animal, and wherein said DIVA vaccine comprises the chimeric pestivirus of claim 1, further wherein said chimeric pestivirus lacks at least one E^{ms} epitope which is present in wild-type bovine viral diarrhea virus.
24. A method of differentiating between an animal vaccinated with the vaccine of claim 14 and an animal infected with wild type bovine viral diarrhea virus, wherein the animal vaccinated with said vaccine generates antibodies to at least one E^{ms} epitope which is present in the chimeric

pestivirus of said vaccine, but which is not present in wild-type bovine viral diarrhea virus, said method comprising the steps of:

- a) obtaining a serum sample from the animals;
- b) assaying said samples for the presence or absence of the antibodies;
- c) identifying the animal having said antibodies as having been vaccinated with said vaccine; and
- d) identifying the animal lacking said antibodies as having been infected with the wild type BVDV.

25. A method of differentiating between an animal infected with wild-type bovine viral diarrhea virus and an animal vaccinated with the vaccine of claim 14, wherein the animal infected with wild type bovine viral diarrhea virus generates antibodies to at least one E^{ms} epitope which is present in wild-type bovine viral diarrhea virus, but which is not present in the chimeric pestivirus of said vaccine, said method comprising the steps of:
- a) obtaining a serum sample from the animals;
 - b) assaying said samples for the presence or absence of the antibodies;
 - c) identifying the animal having said antibodies as having been infected with the wild type BVDV; and
 - d) identifying the animal lacking said antibodies as having been vaccinated with said vaccine.
26. A diagnostic kit for differentiating between an animal vaccinated with a vaccine comprising the chimeric pestivirus of claim 1 and an animal infected with wild type bovine viral diarrhea virus, said kit comprising reagents capable of detecting antibodies to at least one E^{ms} epitope which is present in the chimeric pestivirus of the vaccine, but which is not present in wild-type bovine viral diarrhea virus.
27. A diagnostic kit for differentiating between an animal infected with wild type bovine viral diarrhea virus and an animal vaccinated with a vaccine comprising the chimeric pestivirus of claim 1, said kit comprising reagents capable of detecting antibodies to at least one E^{ms} epitope which is

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/055291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N7/04 C07K14/18 C12N15/86 A61K39/12 C07K16/10
G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RONECKER S, ZIMMER G, HERRLER G, GREISER-WILKE I, GRUMMER B.: "Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains." J GEN VIROL., vol. 89, no. 9, September 2008 (2008-09), pages 2114-2121, XP002569579 the whole document ----- -/--	1, 5-7, 26, 28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2010

Date of mailing of the international search report

17/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2009/055291

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN GENNIP H. G. P. ET AL: "Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E<RNS> or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 4-5, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 447-459, XP004218115 ISSN: 0264-410X	26-29
Y	the whole document	1-29
X	DONG XN, CHEN YH.: "Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines." VACCINE, vol. 25, no. 2, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 205-230, XP002569580	26-29
Y	paragraph [3.1.4.] - paragraph [3.2.2.] paragraph [02.3]	1-29
X	BEER M, REIMANN I, HOFFMANN B, DEPNER K.: "Novel marker vaccines against classical swine fever." VACCINE., vol. 25, no. 30, 4 January 2007 (2007-01-04), pages 5665-5670, XP002569581 4th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, Oslo, 25-29 June 2006	26-29
Y	paragraph [2.4.]; figures 1,2; table 1 paragraph [0003] - paragraph [0004]	1-29
X	DE SMIT A J ET AL: "Chimeric (marker) C-strain viruses induce clinical protection against virulent classical swine fever virus (CSFV) and reduce transmission of CSFV between vaccinated pigs" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 11-12, 8 December 2001 (2001-12-08), pages 1467-1476, XP004313961 ISSN: 0264-410X	26-29
Y	the whole document	1-29
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No
PCT/IB2009/055291

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 001 613 A (DONIS RUBEN O [US] ET AL) 14 December 1999 (1999-12-14) column 1, line 45 - line 58; claims 1,8-13,21 column 2, line 51 - line 57 column 12, line 21 - line 44 -----	1-29
X	GRIPSHOVER E.M. ET AL.: "variation in erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine diarrhoea virus" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 125, 2007, pages 11-21, XP002569582 the whole document -----	26,27
X	GREGO E, USLENGHI F, STRASSER M, LUZZAGO C, FRIGERIO M, PELETTI S, ROSATI S.: "Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine viral diarrhoea antibody based on Erns glycoprotein expressed in a baculovirus system." J VET DIAGN INVEST., vol. 19, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 21-27, XP002569583 the whole document -----	27,29
A	REIMANN I ET AL: "An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 322, no. 1, 25 April 2004 (2004-04-25), pages 143-157, XP004500339 ISSN: 0042-6822 the whole document -----	1
A	VILCEK S ET AL: "Pestiviruses in wild animals" VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 116, no. 1-3, 25 August 2006 (2006-08-25), pages 1-12, XP024935730 ISSN: 0378-1135 [retrieved on 2006-08-25] cited in the application the whole document ----- -/--	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2009/055291

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEHRLE F, RENZULLO S, FAUST A, BEER M, KADEN V, HOFMANN MA.: "Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines." J GEN VIROL., vol. 88, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 2247-2258, XP002569584 the whole document	1
A	US 6 015 795 A (VAN DEN HURK JAN [CA] ET AL) 18 January 2000 (2000-01-18) the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2009/055291

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6001613	A	14-12-1999	NONE	
US 6015795	A	18-01-2000	NONE	

Sequence_PC33857A_ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Luo, Yugang
Welch, Siao-Kun Wan
Yuan, Ying
Ankenbauer, Robert Gerard

<120> CHIMERIC PESTIVIRUSES

<130> PC33857A

<150> US 61/119,594
<151> 2008-12-03

<150> US 61/173,363
<151> 2009-04-28

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> T7 + NADL

<220>
<221> misc_feature
<223> Oligo B-5

<400> 1
gtggttaatac gactcactat agtatacgag aattagaaaa ggc 43

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Pestivirus

<220>
<221> misc_feature
<223> NADL

<220>
<221> gene
<222> (1)..(21)
<223> Oligo 84

<400> 2
gggggctggt agaggtcttc c 21

<210> 3
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

41

Sequence_PC33857A_ST25.txt
aacatggttt ggagcccacg cagcttcccc ttactgtgat gtcg 44

<210> 7
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> R-Erns+NADL

<220>
<221> misc_feature
<223> Oligo 131

<400> 7
ggttccactg tggttatattc tctcccattg taacttgaaa caaaact 47

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Pestivirus

<220>
<221> misc_feature
<223> R-Erns

<220>
<221> gene
<222> (1)..(22)
<223> Oligo 132

<400> 8
gagaatataa cacagtggaa cc 22

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Pestivirus

<220>
<221> misc_feature
<223> R-Erns

<220>
<221> gene
<222> (1)..(22)
<223> Oligo 133

<400> 9
tgcattagct ccgaaccacg tt 22

<210> 10
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

Sequence_PC33857A_ST25.txt

<400> 13
tgcctgtgcc ccaaaccatg t 21

<210> 14
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> P-Erns+NADL

<220>
<221> misc_feature
<223> oligo 138

<400> 14
aacatggttt ggggcacagg cagcttcccc ttactgtgat gtcg 44

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Pestivirus

<220>
<221> misc_feature
<223> NADL

<220>
<221> gene
<222> (1)..(23)
<223> oligo 175

<400> 15
gttatcaata gtagccacag aat 23

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Pestivirus

<220>
<221> misc_feature
<223> NADL

<220>
<221> gene
<222> (1)..(22)
<223> oligo 177

<400> 16
tccaccctca atcgacgcta aa 22

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Pestivirus

Sequence_PC33857A_ST25.txt

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(22)
 <223> Oligo P3

<400> 20
 actatctgaa cagttggaca gg

22

<210> 21
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7+CM53637

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Oligo 296-1

<400> 21
 gtgtaatac gactcactat agtatacgag attagctaaa g

41

<210> 22
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> P-Erns+CM53637

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Oligo 297

<400> 22
 ccaggttcca ctgagttata ttcactcctg ttaccagctg aagcagaa

48

<210> 23
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> P-Erns+CM53637

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Oligo 298

<400> 23
 aacatggttt ggggcacagg cagcaagtcc atactgtaaa gtg

43

<210> 24
 <211> 27
 <212> DNA

Sequence_PC33857A_ST25.txt

<220>
<221> gene
<222> (1)..(26)
<223> oligo 92-1

<400> 27
ggggctgtca gaggcaccc ctagtc

26

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Pestivirus

<220>
<221> misc_feature
<223> CM53637

<220>
<221> gene
<222> (1)..(24)
<223> oligo 321

<400> 28
agccactaca cctgtcacga gaag

24

<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NADL

<220>
<221> misc_feature
<223> oligo 250

<400> 29
caccatgaaa atagtgccca aagaatc

27

<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NADL

<220>
<221> misc_feature
<223> oligo 252

<400> 30
ttaagcgtat gctccaaacc acgtc

25

Sequence_PC33857A_ST25.txt

<210> 31
 <211> 12307
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Erns chimeric virus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> BVDV Type 1

```

<400> 31
gtatacgaga attagaaaag gctctcgtat acgtattggg caattaaaat aataattagg      60
cctagggaaac aaaagtcccc ctgagcgaag gccgaaaaga ggctagccat gcccttagta      120
ggactagcat aaagagggggg gtagcagcag tgggtgagttc gttggatggc ttaagccctg      180
agtacagggg agtcgtcagt ggttcgacgc cttggaataa aggtctcgag atgccacgtg      240
gacgagggca tgcccaaagc acatcttaac ctgagcgggg gtcgcccagg taaaagcagt      300
tctaaccgac tgttacgaat acagcctgat aggggtgctgc agaggccttc tgttctgcta      360
ctaaaaatct ctgctgtaca tggcacatgg agttgatcac aaatgaactt ttatacaaaa      420
cttacaaca aaaacccgctc aggggtggaag aacctgttta tgatcaggca ggtgatccct      480
tatttggtga aaggggagca gtccaccctc aatcgacgtt aaagctccca cacaagagag      540
gggaatgcga tgtacccatc aacttggcat ctttaccaaa aaggggtgac tgcaggtcgg      600
gtaatagcag aggacctgtg agcgggatct acttgaagcc agggccacta ttttaccagg      660
actataaggg tcccgtctat cacagggccc cgctggagct ctttgaagag ggaaccatgt      720
gtgaaacgac taaacggata gggagagtaa ctggaagtga cggaaagttg taccacattt      780
atgtgtgtat agatggatgt ataataataa aaagtgccac aagaagtcac caaaggggtgc      840
ttaggtgggt ccataatagg cttactgcc ctctatgggt cacaagttgc tcagacacga      900
aagaagaggg agcaacaaaa aagaaaacac agaaacccga cagactagag aaggggaaga      960
tgaaaatagt gccagagaa tccgaaaaag acagcaaac taaacctccg gatgctacaa     1020
tagtggtaga tggagttaaa taccaggtga agaagaaggg aaaaatcaag agtaagaaca     1080
ctcaggacgg cttgtaccat aacaaaaaca aaccgccgga atcacgtaag aaactggaaa     1140
aagcattgct ggcattgggca ataataacta tagttttggt tcaagttaca atgggagtga     1200
atataactca gtggaacctg gctgacgaag gcaccgaagg cgtacatagg gtcattgttg     1260
agagagggat aaatagaagt ttacatggca tatggcccca acagatatgc cacggaatcc     1320
caagctacaa cccaccaaac agagagctct cgatgattgt cggaatgggt gatgcaagca     1380
ttagaacaaa ttatacctgc tgtaatctac agagacacga atggaacaaa catggctgggt     1440
gcaattggtg caacatcata ccatggatta aggtgatgaa ctacagccag aggaacctca     1500
    
```

Sequence_PC33857A_ST25.txt

ctgaaggcac atatggcaaa gagtgtgccg taacgtgtag gcacgacagc atattagaca	1560
tcaatatagt cactcaggcc cgcaatcaac ccacaatggt aaccgggtgc aaaataggaa	1620
agaacttttc gttctcaggt gaaattagag aaaaaccatg taattatgat atccaaccag	1680
aggaaatact acatttgcca cacgaatgtg gggagtggta tagtgaaata agccaccagg	1740
cggtcgacat gatcactaat gggttggagg cctctagaaa ttcagcagcc aaagtcttga	1800
gttgatagg gcgcaaattg gaaaggatag gaaagagagc acaagcaaaa tcaaaaacat	1860
ggtttggggc acaggcagct tccccctact gtgatgtcga tcgaaagatt ggctacatat	1920
ggtatacaaa aaattgtacc cctgcctgct tgcccaagaa cacaaaaatt gtcggccctg	1980
ggaagtttga caccaacgca gaggacggca agatactaca tgagatgggg ggccacttgt	2040
cggaggtact actactttct ttagtgggtc tgtccgactt cgcaccggaa acagccagcg	2100
aatgtacct aatcctacat ttttccatcc cacaaagtca cgttgacata atggaatgtg	2160
ataagacca gttgaacctc acagtggagc ttacaacagc tgatgtaata ccaggatcag	2220
tctggaacct aggcaagtgg gtatgtataa gaccaaattg gtggccttat gagacaactg	2280
tggtgttggc atttgaagag gtgagccagg tggtgaagtt agtgttgagg gcactcagag	2340
atttgacacg catttggaac gctgcaacaa ctactgcttt cttaatatgc cttgttaaga	2400
tagtcagggg ccagatggta cagggcattc tgtggctact actgataaca ggggtacaag	2460
gggacttgca ttgcaaacct gaattctcat atgccatagc aagggatgaa agaattggtc	2520
aactgggggc tgaaggcctt actaccactt ggaaggatta ctgcctgaa atgaaactgg	2580
aagacacaat ggtcatagct tggtgcaaag atggtgaagtt tacgtacctc ccaaggtgca	2640
cgagagaaac cagatatctc gcgatcttgc atacaagggc cttaccgacc agtgtggtat	2700
tcaaaaaact ttttgatggg cgaaagcaag aggatgtagt cgaaatggac gacaactttg	2760
aatttggact ctgcccattg gatgccaaac ccatagtaag agggaaattc aatacaacgc	2820
tgctgaacgg accggccttc cagatgggtat gccccatagg atggacaggg actgtaagct	2880
gtatgtcatt caatatggac accttagcca caaccgtgat acggacatat agaaggtcca	2940
aaccatttcc tcataggcaa ggctgtatca cccaaaagac tctgggggag gatctccata	3000
actgcatact cggaggaaat tggactttgt tgcttgaga cgtgctatta taaaagggg	3060
gctctattga atcctgcaag tggtgtggtt atcaatttaa agagagcgag ggactaccac	3120
actaccccat tggcaagtgt agattagaga atgagactgg ttacagacta gtagacgata	3180
cctcttgtaa tagagaaggt gtggccatag taccacaagg gacattacgg tgcaagatag	3240
gaaaaactac tatacaggtc atagctatgg ataccaaact cgggcctatg ccttgcagac	3300
catatgaaat aatatcaagt gaggggcctg tagaaaggac agcgtgtacc ttcaactaca	3360

Sequence_PC33857A_ST25.txt

ctaaaacatt	aaaaaataag	tattttgagc	ccagagacag	ctacttccag	caatacatgc	3420
taaaaggaga	gtatcaatac	tggtttgacc	tggaggtaac	cgaccatcac	cgggattact	3480
ttgccgagtc	catattagtg	gtggtggtag	ccctcctggg	tggcagatat	gtactttggt	3540
tactagttac	atacatggtc	ttatcagaac	agaaggcctc	agggactcag	tatggagcag	3600
gggaagtagt	gatgatgggc	aacttgctaa	cccataatga	cattgaagtg	gtgacatact	3660
tcttgctggt	gtacctactg	ctgaggggaag	agagcgtaaa	gaagtgggtc	ttacttttat	3720
accacatctt	agtgtcacac	ccaatcaa	ctgtaactgt	gatcctattg	atgattgggg	3780
atgtggtaaa	ggcagactca	gggggccaag	ggtacttttg	gcaaatagac	ctctgtttta	3840
caatagttgt	actaatcatc	ataggtttaa	tcatagccag	gcgtgacca	actatagtc	3900
cactagtaac	aataatggca	gcactgaggg	tcactggatt	gacctaccag	cctggagttg	3960
acgtcgctat	ggcagtcatg	accataaccc	tactgatggt	tagctatgtg	acagattact	4020
ttagatataa	aagatggtta	cagtgcgttc	tcagcctggt	gtcaggggtg	ttcttgataa	4080
gaagccta	gcacctaggt	agaatagagg	tgccagaggt	aaccatccca	aactggagac	4140
cactaacttt	aatactgtta	tatttgatct	caacaaca	tgtaacaatg	tggaaggttg	4200
acatcgctgg	cttggtgttg	caatgcctgc	ctatcttatt	actggccaca	accttggtgg	4260
ccgacttctt	aaccctcata	ctgatcctgc	ctacctatga	attgggttaa	ttatactacc	4320
tgaaaactgt	taggactgat	atagaaagaa	gttgccagg	gggatagac	tgtacaagag	4380
ttgactccat	ctacgacatt	gatgagagtg	gagagggcgt	atatctcttt	ccatcaaggc	4440
agaaaggaca	gaggagcttt	tccatactct	tgccccctgt	caaagcaaca	ctgataagtt	4500
gcgtcagcag	taaatggcag	ctaataaca	tgagttacct	aactttggac	tttatgtact	4560
acatgcacag	gaaagttata	gaagagatat	caggaggcac	caacatgata	tccagggttag	4620
tagcggcact	catagagctg	aactggtcca	tggaagaaga	ggagagcaaa	ggcctaaaga	4680
agttttatct	attatctgga	aggttgagaa	acctaataat	aaaacataaa	gtaagaaatg	4740
agaccgtggc	ttcttggtac	ggggaggagg	aagtctacgg	tatgcaaag	atcatgacaa	4800
taatcaaggc	cagtacgctg	agtaagagca	agcactgcat	gatatgcact	gtatgtgaga	4860
gccgagagtg	gaaaggcggc	acctgcccc	aatgtggacg	ccatgggaag	ccgataatgt	4920
gtgggatgtc	gctagcggat	tttgaagaaa	gacactataa	aagaatcttt	ataaggggaag	4980
gtaactttga	gggtcctttc	aggcaagaat	acaatggctt	tgtacaatat	accgctaggg	5040
ggcaattact	tgtgagaaac	ttgcccgtac	tggcaactaa	agtaaaaatg	ctcatggtag	5100
gcaaccttgg	agaagaaatt	ggtgatctgg	aacatcttgg	gtggatccta	agggggcctg	5160
ccgtgtgtaa	gaagatcaca	gagcacgaaa	aatgccacat	caatatactg	gataaactaa	5220
ctgcattttt	cgggatcatg	ccgaggggga	ctacaccag	agccccggtg	aggttcccta	5280

Sequence_PC33857A_ST25.txt

cgagcttact	aaaagtgagg	aggggcctgg	agactggctg	ggcttacaca	caccaaggtg	5340
ggataagttc	agtcgaccat	gtaaccgccg	gaaaagacct	attggtctgt	gacagcatgg	5400
gacggactag	agtggtttgc	caaagcaaca	acaggttgac	cgatgagaca	gaatatggcg	5460
tcaagactga	ctcaggatgc	ccagacggtg	ccagatgtta	tgtgttaa	ccagaggctg	5520
tcaacatata	aggatccaag	ggggcagtcg	tccacctcca	aaagacaggt	ggagaattca	5580
cgtgtgtcac	cgcatcaggc	acaccggcct	ttttcgacct	aaaaaacttg	aaaggatggt	5640
caggattgcc	tatatccgaa	gcctccagcg	ggagggtggt	tggcagagtc	aaagtaggga	5700
agaatgaaga	gtctaaacct	acaaaaataa	tgagtggaa	ccagaccgtc	tcaaagaaca	5760
cagcagatct	aactgagatg	gtcaagaaga	taaccagcat	gaacagggga	gacttcaagc	5820
agattacttt	ggcaacaggg	gcaggaaaaa	ccacagaact	cccaaaagca	gttatagagg	5880
aataggaag	acacaagaga	gtattagttc	ttataccatt	aagggcagcg	gcagagtcag	5940
tttaccagta	tatgagatta	aaacacccaa	gcatctcttt	taacctaagg	ataggggaca	6000
tgaaagaggg	ggacatggca	acggggataa	cctatgcatc	atacgggtac	ttctgccaaa	6060
tgccccaacc	aaagctcaga	gctgctatgg	tagaatactc	atacatattc	ttagatgaat	6120
accattgtgc	cactcctgaa	caactggcaa	ttatcgga	gatccacaga	ttttcagaga	6180
gtataagagt	cgtcgccatg	actgccacgc	cggcaggggtc	ggtgaccaca	acagggtcaa	6240
agcacccaat	agaggaattc	atagcccccg	aggtaatgaa	aggggaggat	cttggtagtc	6300
agttccttga	tatagcaggg	ttaaaaatac	cagtggatga	gatgaaaggt	aatatgttgg	6360
tttttgtacc	cacgagaaac	atggcagtag	agggtggcaa	gaagctaaaa	gctaagggct	6420
ataattctgg	atactattac	agtggagagg	atccagccaa	tctgagagtt	gtaacatcgc	6480
agtctcccta	tgtaatcgtg	gccacaaatg	ctattgaatc	aggagtgaca	ctaccagatt	6540
tggacacggt	tgtagacacg	gggctgaaat	gtgaaaagag	ggtgagggta	tcatcaaaga	6600
tacccttcat	cgtaacaggt	cttaagagga	tggccgtgac	tgtgggtgag	caggctcagc	6660
gtaggggcag	agtaggtaga	atgaaacccg	ggagatatta	tagaagccag	gaaacagcaa	6720
ccgggtcaaa	ggactaccac	tatgacctct	tgcaggcaca	aagatacggg	attgaggatg	6780
gaatcaacgt	aacgaagtcc	tttagggaga	tgaattacga	ttggagccta	tacgaggagg	6840
acagcctact	aataacccag	ttggaaatac	taaataatct	actcatctca	gaagacttgc	6900
cagccgctgt	taagaatata	atggccagga	cagatcacc	agagccaatc	caacttgc	6960
acaacagcta	tgaagtccag	gtcccggtcc	tgttcccaaa	aataaggaat	ggagaagtca	7020
cagacaccta	cgaaaattac	tcgtttctaa	acgccagaaa	gttaggggag	gatgtacccg	7080
tgtatatcta	tgccactgaa	gatgaggatc	tggcagttga	cctcttaggg	ctagactggc	7140

Sequence_PC33857A_ST25.txt

cagatcctgg gaaccagcag gtagtggaga ctggcaaagc actgaagcaa gtgaccgggt	7200
tgctctcggc tgaaaatgcc ctactagtgg ctttatttgg gtacgtaggt tatcaggctc	7260
tctcaaagag gcatgtccca atgataacag acatatatac catcgaggac cagagactag	7320
aagacaccac ccacctccag tatgcaccca acgccataaa aaccgaaggg acagagactg	7380
aactgaaaga actggcgctg ggtgacgtgg aaaaaatcat gggagtcatt tcagattatg	7440
cagccggggg actggagttt gtgaaatccc aagcagaaaa gataaaaaca gcacctttgt	7500
ttaaagaaaa cgtagaagct gcaaaagggt acgtccaaaa attcattgac tcattaattg	7560
aaaataaaga tgcaataatc agatatgggt tgtggggaac acacactgca ctatacaaaa	7620
gcatagctgc aagactggga cacgaaacag cgtttgccac actggtgtta aaatggctag	7680
cttttgagg ggaatcagt ccagaccaca tcaagcagac ggcagttgat ttagtggtct	7740
attatgtgat gaataagcct tccttcccag gcgacaccga aacacagcaa gaagggaggc	7800
gattcgtgc tagcctgttc atctccgcac tggcaaccta cacatacaaa acttgggaatt	7860
accacaatct ctctaaagt gtggaaccag ccttggtta cctcccctat gctaccagcg	7920
cattaaaaat gttcacccca acgcggctag agagcgtggt gatactgagc accacgatat	7980
acaaaacata cctctccata aggaagggga agagtgatgg attgctgggc acggggatca	8040
gtgcagccat ggaaatcctg tcacaaaacc cagtgtcggg gggatatct gtgatgttg	8100
gggtaggggc cattgctgcg cacaacgcta ttgagtcag tgaacagaaa aggaccctac	8160
ttatgaaggt gttcgtaaag aacttcttgg atcaggctgc aacggatgag ctggtaaaag	8220
aaaaccaga gaaaattata atggccttat ttgaagcagt ccagacaatt ggtaaccccc	8280
tgagactaat ataccacctg tatggggttt actacaaagg ttgggaggcc aaggaactat	8340
ctgagaggac agcaggcaga aacttattca cattgataat gtttgaagcc ttcgagttat	8400
tagggatgga ctcagaagga aaaataagga acctgtccgg aaattacatc ttggatctga	8460
tatacggcct acacaagcag atcaacagag ggctgaagaa aatagtactg gggtagggctc	8520
ctgcaccctt tagttgtgac tggacccta gcgacgagag gatcagattg ccaacagaca	8580
actatttgag ggtagaaacc aggtgcccct gtggttatga gatgaaagcg ttcaaaaatg	8640
taggtggcaa gcttaccaaa gtggaggaga gcgggcctt cctatgtaga aacagacctg	8700
gtaggggacc agtcaactac agagtcacca agtattacga tgacaacctc agagagataa	8760
aaccggtagc aaagttggaa ggacaggtgg agcactacta taaaggggtc acagcaaaaa	8820
ttgactacag taaaggaaaa acgctcttgg ctactgacaa gtgggaggtg gaacatggtg	8880
tcatgaccag gttagctaag agatatactg gggttgggtt caatgggtgca tacttaggtg	8940
atgagcccaa tcaccgtgat ctagtggaga ggaactgtgc gactataacc aaaaacacag	9000
tacagtttct aaaaatgaag aaggggtgtg cattcaccta tgacctgacc atctccaatc	9060

Sequence_PC33857A_ST25.txt

tgaccaggct tattgaacta gtacacagga acaatcttga agagaaggaa ataccaccg	9120
ttacagtcac tacatggcta gcttacacct tcgtgaatga agacgtaggg actataaaac	9180
cagtactagg agagagggta atccccgacc ctgtagttga tgtcaactta caaccagagg	9240
tccaagtga tacatcagag gtcgggatca caataattgg aagggaaacc ctgatgacaa	9300
cgggggtgac acctgtattg gaaaaagtag agcctgacgc tagcaacaac caaagctcag	9360
tgaagattgg gttggataag ggtaattacc cagggcctgg aatacagaca catacactaa	9420
cagaagaaat acacgacagg gatgcaagac ccttcatcat gatcctgggc tcaaagaatt	9480
ccatgtcaaa tagggcaaag actgctagaa acataaatct gtacacagga aatgaccca	9540
gggaaataag agacttgatg gctgcagggc gcatgttagt agtagcactg agggatgtcg	9600
accctgagct ttctgaaatg gtcgacttca aggggacctt cttagatagg gaggccctgg	9660
aggtcttaag tctcgggcaa cctaaaccta agcaggtcac caaggcagct attagggatt	9720
tgattgaaca ggaaaaacag gtggagatcc ctaactgggt tacatcagat gaccagtat	9780
ttttggaagt ggccataaga aatgataagt actacttagt aggagatgtt ggagaggtaa	9840
aagatcaagc taaaacactt ggggccacgg atcagacaag aattgtaaag gaggtaggct	9900
caaggacgta taccatgaag ctatctagtt ggttcctcca agcatcaaaa aaacagataa	9960
gtttaactcc actgtttgag gaattgttgt tacggtgccc acctgcaact aagagcaata	10020
aggggcacat ggcacagct taccaattgg cacagggtaa ctgggagccc ctcggttgcg	10080
gggtgcacct aggtaccata ccagctagaa gggngaagat acacccatat gaagcttacc	10140
tgaggttgaa agatTTTTTT gaagaagaag agaagaaacc tagggTTTaa gatacagtaa	10200
taagagagca caacaaatgg atacttaaaa aaataagggt tcaaggaaac ctcaacacca	10260
agaaaatgct caacccccgg aaactatctg aacagttgga cagggagggg cgaaaagga	10320
acatctacaa ccaccagatt ggtaccataa tgtcaagtgc aggcataagg ctggagaaat	10380
tgccaatagt aagggcccaa accgacacta aaacctttca tgaggcaata agagataaga	10440
tagacaagag tgagaaccgg caaaatccag aattgcacaa caaattgttg gagatttttc	10500
acacaatagc ccaacccgcc ctgaaacaca cttacggtga ggtgacgtgg gagcaacttg	10560
aggcagggat aaataaaaaa ggggcagcag gctttctgga gaagaagaac atcggggaag	10620
tattggattc agaaaaacac ctggtggaac aattggtcag ggatctgaag gccgggagaa	10680
agataaaata ttatgaaact gcaataccaa aaaatgagaa aagagatgtc agcgatgact	10740
ggcaggcagg ggacctggtg gatgagaaga ggccaagagt tattcaatac cctgaagcca	10800
agacaaggct agccatcact aagggtcatgt ataactgggt gaaacagcag cccgttgtga	10860
ttccaggata tgaaggaaag acccctttgt tcaacatctt tgataaagtg agaaaggaat	10920

Sequence_PC33857A_ST25.txt

gggacttggt caatgagcca gtggccgtaa gttttgacac caaagcctgg gacacacaag	10980
tgactagtag ggatctgcaa cttatcggag aaatccagaa atattactat aggaaggagt	11040
ggcacaagtt cattgacacc atcaccgacc acatgacaga agtgccagtt ataacagcag	11100
atggtgaagt atatataaga aatgggcaga gaggtagtgg ccaaccagac acaagtgcag	11160
gcaacagcat gttaaagtgc ctaacaatga tgtacgcttt ctgcgaaagc acaggggtcc	11220
cgtacaagag tttcaacagg gtggcaagga tccatgtctg tggggatgat ggcttcttaa	11280
taactgaaaa agggttaggg ctgaaatttg ctaacaaagg gatgcagatt cttcacgaag	11340
caggcaaacc tcagaagata acggaagggg aaaagatgaa agttgcctat agatttgagg	11400
acatagagtt ctgttcccat accccagtcg ctgttaggtg gtccgacaat accagtagtc	11460
acatggccgg gagagacacc gctgtgatac tatcaaagat ggctacaaga ttggattcaa	11520
atggagagag gggtaggaca gcatatgaaa aagcggtagc cttcagtttc ttgctgatgt	11580
attcctggaa cccgcttggt aggaggattt gcctgttggg actttcgcaa cagccagaga	11640
cagacccatc caaacaggcc acttattatt acaaagggtg tccaataggg gcctataaag	11700
atgtgatagg tcggaatcta agtgaactaa agagaacagg cttcgagaaa ttggcaaatc	11760
taaacctaa cctgtccaca ttagggatct ggactaagca cacaagcaaa agaataatta	11820
atgactgtgt tgccattggg aaagaagaag gcaactggct agttaacgcc gacaggctga	11880
tatccagcaa aactggccac ttatacatac ctgataaggg ctttacatta caaggaaagc	11940
attatgagca actacagcta agaacagaga caaaaccggt catgggggtc gggactgaga	12000
gatacaagtt ggggtccata gtcaatctgc tgctgagaag gttgaaagtt ctgctcatga	12060
cggccgctcg tgccagcagc tgagacaagt gtatatattg taaataaatt aacccatgta	12120
catattgtat ataaatatag ttgggatcgt ccacctcaag aagacgacac acccaacag	12180
cacagctaaa cagtagttaa gattatctac ctcaagataa cactacattt aatgcacaca	12240
gcactttagc tgtatgagga tacgcccgcac gtctacagtt ggactagga agacctctaa	12300
cagcccc	12307

<210> 32
 <211> 12663
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Erns chimeric virus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> BVDV Type 2

<400> 32

Sequence_PC33857A_ST25.txt

gtatacgaga ttagctaaag tactcgtata cggattggac gtcaacaaat tttttaatt	60
ggcaacgtag ggaactttcc cctcagcgaa ggccgaaaag aggctagcca tgcccttagt	120
aggactagca aaaatagggg actagcggta gcagtgaagt cattggatgg ccgaaccctt	180
gagtacaggg gagtcgtcaa tggttcgaca ctccattggg tgaggagtct cgagatgcca	240
tgtggacgag ggcattgcca cggcacatct taaccatgc gggggttgca tgggtgaaag	300
cgctattcat ggcgttatgg acacagcctg ataggggtga gcagagacct gctattccgc	360
tagtaaaaac tctgctgtac atggcacatg gagttgtttt caaatgaact tttatacaaa	420
acataataac aaaaaccagc aggcgtcgtg gaacctgttt acgacgtcaa cgggcgtcca	480
ctgtttggag agagcagtga cttgcacccg cagtccacgc taaaactacc acaccaacga	540
ggtagtgcca acatcctgac caatgctagg tccctaccgc ggaaagggtga ctgccggaga	600
ggtaatgtgt atggagcggg gagtggcatc tatatcaagc caggaccgat ctactaccag	660
gattatgcgg agcctgtcta ccatagagcc ccattagaac tatgtaggga ggcaagtatg	720
tgcgaaacaa ctaggagagt tggcagagt accggtagt atgggaaatt atatcatatc	780
tacatctgca tagatgggtg tatcctcctg aagagggcga ctaggaatca accagaagtc	840
ctaaaatggg tatacaacag attagattgt cttttatggg tcactagctg ctccgatgaa	900
gggagtaaga gtgctacaag taagaagcag cctaagccag ataggataga aaaaggcaag	960
atgaaaatag ccccaaaaaga gacagaaaaa gattgcaaaa ccagaccccc cgacgcgact	1020
atagtagtag aaggggttaa gtaccagggt aagaaaaaag gaaaggtaag gggaaaaaat	1080
actcaagatg gggtgtatca caacaagaat aagccccctg aatcaagaaa gaaattggaa	1140
aaggcactac tagcttgggc catcttggca gcggttctgc ttcagctggt aacaggagtg	1200
aatataactc agtggaaacct ggctgacgaa ggcaccgaag gcgtacatag ggtcatgttt	1260
gagagagggg taaatagaag tttacatggc atatggcccc aacagatatg ccacggaatc	1320
caagctaca accccacca cagagagctc tcgatgattg tcggaatggt tgatgcaagc	1380
attagaacaa attatacctg ctgtaatcta cagagacacg aatggaacaa acatggctgg	1440
tgcaattggt acaacatcat accatggatt aagggtgatga actacagcca gaggaacctc	1500
actgaaggca catatggcaa agagtgtgcc gtaacgtgta ggcacgacag catattagac	1560
atcaatatag tcactcaggc ccgcaatcaa cccacaatgt taaccgggtg caaaatagga	1620
aagaactttt cgttctcagg tgaaattaga gaaaaacat gtaattatga tatccaacca	1680
gaggaaatac tacatttgcc acacgaatgt ggggagtggt atagtgaaat aagccaccag	1740
gcggtcgaca tgatcactaa tgggttggag gcctctagaa attcagcagc caaagtcttg	1800
agttggatag ggcgcaaatt ggaaaggata ggaaagagag cacaagcaaa atcaaaaaca	1860
tggtttgggg cacaggcagc aagtccatac tgtaaagtgg agaggaagat cggttacatc	1920

Sequence_PC33857A_ST25.txt

tggtatacaa	aaaactgcac	tccagcttgc	cttccaagaa	acactaaaat	aataggcccc	1980
gggaagtttg	ataccaacgc	cgaagatgga	aaaatactcc	atgagatggg	ggggcacctc	2040
tcagaatttg	tcctattgtc	tttggtgggt	ctgtctgact	ttgccccaga	aaccgcgagt	2100
gccatctact	tggttctaca	ttttgcgatc	ccgcaaaacc	acgttgatgt	agacacatgc	2160
gacaagaacc	agctgaattt	aacgggtcgca	actacagtag	cagagggtcat	accagggaca	2220
gtgtggaacc	tagggaagta	tgtctgcata	agaccagact	ggtggccata	tgagacgacg	2280
acagtcttcg	tccttagagga	agcagggcaa	gtaatcaaat	tggggctaag	ggccatcaga	2340
gacttaacta	ggatatggaa	tgctgccacc	accacagctt	tcctaattctt	tttagtgaaa	2400
gcactaaggg	gacaactaat	ccaagggcta	ttgtggctga	tgctaataac	aggagcacag	2460
ggtttccctg	aatgcaaaga	gggcttccaa	tatgccatat	ctaaagacag	aaaaatgggg	2520
ttactgggac	cagagagctt	aactacaaca	tggcacctcc	ccaccaaaaa	aatagtggac	2580
tccatggtaa	gtgtatggtg	tgaaggaaaa	gacttaaaaa	tattaaaaac	gtgcacaaaag	2640
gaagagaggt	acctagtggc	tgtgcacgag	agagccttat	caaccagtgc	cgagtttatg	2700
cagatcagtg	atgggacaat	aggcccagac	gtgatagata	tgctgatga	ctttgagttt	2760
ggactctgcc	cttgtgactc	aaaaccagtg	ataaagggca	aatttaatgc	cagcttactg	2820
aatggaccag	ctttccagat	ggtatgccca	caggggtgga	ctggtacagt	agaatgcacc	2880
ctagtgaacc	aagacacctt	ggacacaact	gtcattagga	catatagaag	aactacccca	2940
tttcagcgga	gaaaatgggtg	tacctatgaa	aaaataatag	gggaagatat	ccatgaatgc	3000
attctaggtg	gaaactggac	atgcataacc	ggtggccaca	gcgggttgaa	agacggacct	3060
atcaagaagt	gtaagtgggtg	tggctatgac	ttcgtcaact	cagagggact	accacactac	3120
ccaataggca	agtgcattgt	catcaatgag	agtgggtaca	ggtatgtaga	tgacacctct	3180
tgcgataggg	gtggtgtagc	catagttcca	actggcaccg	taaagtgtag	aataggtaac	3240
gtcacgggtg	aagttatcgc	tactaacaat	gatctgggac	ccatgccttg	cagcccagct	3300
gaagtgatag	caagtgaagg	accagtggaa	aagactgcat	gcacattcaa	ctattcaagg	3360
actctacct	ataagtatta	tgagccaagg	gaccggtact	tccaacaata	catgttaaaa	3420
gggggggtgg	aatattgggt	cgacctggat	tctgtagacc	accacaaaga	ctacttctca	3480
gagttcataa	tcatagcagt	ggtcgccttg	ttgggtggta	agtacgtact	atggctcttg	3540
ataacatata	caatactgtc	tgagcagatg	gctatgggcg	ctggagtga	tactgaagag	3600
atagtcatga	taggcaactt	gctgacacac	agtgatattg	aggttggtgt	ctatttcctt	3660
cttctgtact	taatagttaa	agaggaactg	gtgaggaaat	gggttatact	ggtataccac	3720
atcctttag	ctaaccctat	gaaaacaact	ggggtcattc	tactaatgct	agggggagtg	3780

Sequence_PC33857A_ST25.txt

gtgaaggcca gcagaatcaa tgctgatgac caaagtgcta tggacccatg ctttcttctc	3840
gtgacaggtg tagtggctgt tttgatgac gctagaagag aacctgccac cttaccactg	3900
attgtagcat tgctagcaat aagaacatca ggattcctac tgtccgctag cattgatgta	3960
actgtagcag tagtattaat tgtacttttg ctggctagct acgtaacaga ctacttttaga	4020
tataaaaagt ggcttcaatt ctcathtagt ctgatagctg gtatctttat tataaggagc	4080
ttgaaacata tcaaccagat ggaggtacca gaaatatcta tgccaagttg gagacctcta	4140
gctcttgtct tcttctatat aacatctaca gcaataacca ctaattggga cattgactta	4200
gcaggcttcc tgctgcaatg ggcgccagca gtgatcatga tggctaccat gtgggcagac	4260
tttttgactc tgatcatagt cctgcccagt tacgagttat ctaagcttta cttcctaaag	4320
aacgtcagga cagacgtgga aaagaactgg ctcggcaagg tgaaatacag acagatcagt	4380
tcagtttatg acatctgtga cagtgaggaa gcagtgtacc tatttccatc aaggcataag	4440
agtggaagca ggccagattt catattaccc tttttgaaag ccgtgttaat aagctgcatc	4500
agcagccaat ggcaaatggt ttacatttct tacctaatac tggaaatcac atactatatg	4560
cacaggaaaa tcatagatga ggtgtcagga ggagcaaatt ttctatcaag acttatagca	4620
gccatcatag aattaaattg ggccatagat gatgaggaat gtaaagggtc gaagaaactg	4680
tatctcttgt caggagagat gaagaattta atagttaaac ataaggtaag aaatgaagcc	4740
gtccacagat ggtttggtga ggaggaaata tatggggcac ccaagggtgat caccatcata	4800
aaagctagta ccctaagtaa aaacaggcac tgcataatct gcacgatctg tgaagggaaa	4860
gaatggaacg gagccaactg cccaaagtgt ggaagacaag gaaagcccat aacatgtgga	4920
atgacactcg cagactttga ggagaaacat tacaaaaaga tatttataag agaaggacgc	4980
caagaagcaa tgaatacgat gatgtgcagc cgatgccagg gaaagcatag gaggtttgaa	5040
acggaccggg aacctaaagag tgccagatac tgtgctgagt gtaataggct gcacctgct	5100
aggaagggtg acttttgggc agagtcaagc atgttgggcc tcaaaatcac ctactttgcg	5160
ctgatggatg gaaagggtga tgatatcaca gagtgggctg gatgccagcg tgtgggaatc	5220
tccccagata cccacagagt ccttgtcac atctcatttg gttcacggat gccaggcacc	5280
agtgggcggc agagagctac tccagatgcc cctcctgctg accttcagga tttcttgagc	5340
cggatctttc aagtaccccc aggcagatg tccagggaag agtataaggg ttacgtccaa	5400
tacacagcca gaggacaact ctttctgagg aacctgccaa ttctagcgac gaagatgaag	5460
ctattaatgg tggggaacct cggcgcagaa gttggcgacc tggaacatct aggatgggta	5520
ctgagagggc cagccgtgtg caaaaaaatt accaaccatg agaagtgcc cgtaaacatc	5580
atggataagc taactgcatt ttttggaaac atgcctagag gcacaacccc tagggcacct	5640
gtgaggttcc ccacagcact attgaaagtg agaagggggc tagagacggg atgggcttac	5700

Sequence_PC33857A_ST25.txt

acacaccaag gagggatcag ctcggtagac catgtcacag ccggaaagga tttactggtg	5760
tgtgacagta tgggcaggac cagggttgtc tgtcatagta acaataagat gactgacgag	5820
actgagtatg gcatcaagac cgactcaggg tgccccgaag gcgcgagggtg ttacgtgcta	5880
aaccacagaag ctgttaacat ttctggcaca aaaggagcta tggtagacacct ccagaaaact	5940
gggggggagt tcacatgtgt cactgcctca gggacccccg ctttcttcga tctaaaaaat	6000
ctaaaaggct ggtccgggct gccaatTTTT gaagcatcca gtggcagggt ggttggtagg	6060
gtgaaagtcg gcaagaatga ggattccaag cccaccaaac taatgagcgg aatccagaca	6120
gtgtctaaga gccagacgga cctagcggac atcgtaaaga aattgactag tatgaacaga	6180
ggagagttca aacagataac attagccact ggggcaggaa aaactacgga actgccaagg	6240
tccgttatag aggagatagg gaggcacaaa agggctcttag tcctgatacc attgagagcg	6300
gcagcagagt cagtgtatca gtatatgaga gtgaagtacc caagtatatc tttcaatttg	6360
agaataggag atatgaagga aggtgatatg gccaccggta tcacttacgc ctcatatggg	6420
tacttttgtc agcttccctca gcccAAactg agagctgcca tggtagagta ttcatatata	6480
ttcttagatg agtaccactg tgctacaccc gagcaattag caataattgg aaagatacac	6540
aggtttgctg aaaatcttag agtggttagca atgacagcaa ccccagctgg aacggtcaca	6600
acgactggtc agaaacaccc tatagaggag ttcatagccc cagagggtgat gaagggtgaa	6660
gatctaggta gtgaatactt ggatattgca ggggtgaaga taccgactga agagatgaaa	6720
ggcaacatgc tcgtgttcgt gccaaactagg aacatggcag tagaaacagc taagaaattg	6780
aaggcaaaaag ggtacaactc cggatactat tacagtgggg agaaccacaga aaacttgagg	6840
gtggtgacct cacaatcccc gtatgtggta gtagccacca atgccataga gtcagggtgtg	6900
acattaccag acttagacac agttgtagac actggactaa aatgtgagaa gaggggtgagg	6960
atatcttcaa aaatgccctt cattgtaaca ggacttaaga gaatggcagt cacaatagga	7020
gagcaagccc agcgcagggg gagagtagga agagtcaagc caggtaggta ctataggagt	7080
caagaaacag cttcaggggtc aaaagattac cattacgacc tactacaagc ccagagggtac	7140
ggaatagaag atggaattaa tgtaacaaag tcattcaggg agatgaacta tgattggagc	7200
ctttatgaag aggacagctt gatgataact caactcgagg tccttaacaa cctccttata	7260
tcagaagacc tgcctgccgc agtgaagaac atcatggccc ggaccgatca cccagaaccc	7320
atacaactgg cctataacag ttatgaaaac caagttccag tgctgttccc aaagatcaaa	7380
aatggtgagg tgacagacag ttatgagaat tacacatacc tcaatgcaag aaaactagga	7440
gaggacgtgc cggcgtatgt gtacgccacg gaggatgagg atctagcagt ggatcttctg	7500
ggtatggatt ggccggaccc aggcaaccaa caggtggtag agacagggag ggcattaaag	7560

Sequence_PC33857A_ST25.txt

caagtaactg gcttatccac agcagaaaat gccctcttga tagccttatt cggttacgtc	7620
gggtaccaga cgctttcaaa aaggcacata cccatgatta ctgacatcta tacacttgaa	7680
gaccacagac ttgaggacac aaccacacctc cagtttgccc caaacgctat aaggaccgac	7740
ggcaaggact cagagttgaa agaattagct gtgggagacc ttgataaata tgtggacgca	7800
ctggtagact actccaaaca agggatgaaa tttatcaaag tccaagctga aaaggtcaga	7860
gactcccagt ctacaaagga aggcttgcaa aatattaagg agtatgtgga taagtttata	7920
caatcactaa cagagaataa ggaggagatc atcaggtagt gactatgggg agttcacaca	7980
gcactctaca aaagcttggc agcgagactg gggcatgaaa cagcttttgc aacttttagtg	8040
gtaaaatggc tggcttttgg gggcgaaacg gtatctgctc acatcaagca agtagcagtt	8100
gatctagtag tatactatat catcaacaaa ccataccttc ctggagatac agagacccaa	8160
caagagggga ggaggtttgt ggctagtctt tttatatctg cactagcaac atacacatat	8220
aaaacctgga attacaacaa tctgcaacgg gttgtcgaac ctgccttagc ttacctcca	8280
tatgctacaa gtgccttgaa gttgttcgca cccacaagat tagagagtgt ggtcatactc	8340
agttctacaa tttacaagac atacctctct ataaggaagg gtaagagcga cggcttggtta	8400
ggtacaggca taagtgcagc catggagatc ctaaaccaaa acccaatctc agtaggtata	8460
tctgtgatgc tgggggtagg tgccatcgcc gcccataatg caatagaatc tagtgaacag	8520
aaaagaactt tgctgatgaa ggtctttgta aaaaattttt tggaccaagc agcgacagat	8580
gagctagtca aagagaaccc tgaaaaaata atcatggctc tatttgaagc agtccagacc	8640
ataggaaacc ccctaagact catctaccat ctgtacgggg tgtactataa ggggtgggaa	8700
gcaaaagaac tcgcagagaa aactgctggc cgcaacttat tcacattgat tatgtttgaa	8760
gcctttgagc ttttaggtat ggactcagaa ggaaagataa gaaacttgtc aggcaactac	8820
atactggact taatcttcaa tttgcataat aaattaaaca agggctctcaa aaaactagtc	8880
ttgggtggg ctccagcacc tttcagctgt gattggacac caagtgatga gaggataagc	8940
ttaccccata acaactactt aagggtagaa accaggtgtc cttgtggcta tgagatgaag	9000
gcaataaaaa atgttgctgg taaattgaca aaagtgaag aaaaggggccc cttcctatgc	9060
aggaatagat tagggagagg acctccaaac ttcaaagtaa caaagttcta tgatgatgac	9120
ttgaaagaag tcaagccagt agctaggcta gaaggccagg tggacctcta ttacaaggga	9180
gtaacagcaa agttagacta caacaatggg aaagtactgt tagctaccaaa caagtgggag	9240
gtggaccacg ctttcctgac cagattagta aagaagcaca cagggatagg ttttaaaggt	9300
gcatatttgg gtgacagacc agaccatcaa gatcttgctg atagagattg tgcaactata	9360
acgaagaact cagtacagtt cctaaaaatg aagaaagggt gcgctttcac atatgaccta	9420
acaatctcta accttgtcag gcttattgaa ctagtccata agaacaattt acaagaaaga	9480

Sequence_PC33857A_ST25.txt

gagatcccca ccgtagacagt aactacttgg cttgcatatt cttttgtcaa tgaagacctg	9540
gggactatca agcctgtatt gggggagaaa gtcatcccag aacccccga ggagttgagt	9600
ctccaacca ctgtgggact agtcaccact gagacagcaa taaccataac aggggaggct	9660
gaagtgatga cgacagggat cacaccagtg gtagagatga aagaagaacc tcagctggac	9720
caccagtcaa ctaccctaaa ggtaggggta aaggaagggg aatatccagg gccaggagtt	9780
aaccctaacc atttagtaga ggtgatagat gagaaagatg acaggccttt tgtcctaatt	9840
atcggtaaaca aaggttctac ctcgaacaga gcaagaaggg ccaagaatat acggctgtac	9900
aaaggaaaca acccaagaga gatcagggat ctgatgagcc aaggaagaat attaacggtt	9960
gctctaaaag agttggaccc ggaattaaaa gaattagtag attacaaggg gacctttctc	10020
aatagggag ctttagaagc cctaagctta ggtaagccaa ttaagaggaa aaccacagca	10080
gcaatgatca ggagggtaat agagccagag gttgaggagg aactaccaga ttggttccaa	10140
gcggaagaac ccctattttt ggaagcaaaa atacagaatg acttatacca cctaattggc	10200
agtgttgata gtataaaaag caaagcaaa gaattagggg ccacagataa cacaaagata	10260
gtgaaggag tcggggctag gacctatacg atgaaattga gtagctggag cacacaagtt	10320
actaaaaaac agatgagttt agccccctctc tttgaagagc tgttattaaa gtgccctcca	10380
tgtagtaaaa tttcaaaggg acatatggtg tcagcatacc aactggctca aggaaactgg	10440
gaacccctcg ggtgtggggg ctatatggga accataccag ctaggcgtct caagatccac	10500
ccttatgagg cttaccttaa actcaaagag ctgctggaag ttgaatcttc gaggatcacc	10560
gcaaaaagaat ccatcataag agaacataac acctggattc tgcggaaagt gagacatgag	10620
gggaacctaa gaactaaatc aatgattaac cctgggaaaa tatcagatca gctatgcaga	10680
gacggacaca aaagaaacat atataataag atcataggct caacaatggc ctctgctggt	10740
attaggctgg agaaactgcc agtagtccga gcccaaactg acacaaccag tttccaccaa	10800
gccataagag aaaaaattga taaaccagaa aacaagcaga ccctgaatt gcatgaagaa	10860
ctaatgaagg ttttcgactg cttaaagatc ccagagctga aggaatcgta tgatgaagtt	10920
tcatgggaac aattagaagc aggaataaac cgtaagggtg cagcagggtta tctagagagt	10980
aagaacatag gggaagtgtc agacacagag aaacacatag tagagcagct gatcaaggat	11040
ctgaggaagg ggaagaagat taagtactat gaaacagcca ttcccaagaa tgagaagaga	11100
gacgtcagcg acgactggga agccggagac ttcgttgatg aaaagaaacc aagagtaatc	11160
cagtacccgg acgccaagggt gagactggca attacaaaaa tgatgtacaa atgggtaaag	11220
caaaaaccag tggtgatacc cggctatgaa ggaaaaacac cactatttga catattcaac	11280
aaagtgaaga aggaatggga ttcattccag gaccccgtag cagtgaagctt tgacaccaaa	11340

Sequence_PC33857A_ST25.txt

```

gcgtgggata cacaagtcac cagtagagac ctaatgttga taagggatat ccagaaatat 11400
tatttcaaga gaagtacaca caaattttta gatacaataa cagaacacat ggtagaagta 11460
cctgtcatta cagcagacgg tgaagttttrac ataaggaatg gtcagagggg tagtggccaa 11520
cccgacacaa gtgctggtaa tagtatgttg aatgtcctaa ccatgatata tgctttctgt 11580
aaaagtacag gcatacctta caggggattc agcagagtgg caagaatcca tgtgtgtggt 11640
gatgatggct ttctgataac agaaagagga ctggggctga aattctctga gaagggtatg 11700
cagatattac atgaggccgg gaagccccag aaaataactg aaggggacag aatgaaagtg 11760
gcatacagat ttgaggacat cgagttttgt tcccatacac ccgtaccagt cagatgggca 11820
gataacacca gtagttacat ggcagggagg agcacagcca ctatactagc taagatggca 11880
accaggtttg attccagcgg agagaggggt agcacagctt atgagaaggc cgtagccttc 11940
agcttccttt tgatgtactc atggaatccc gtagttagaa ggatctgctt actggtgttg 12000
tcacagtttc cagaaatatt cccatccaaa aacacaatat actactacca aggggatccc 12060
atagctgctg acagagaagt gataggtaaa cagctgtgtg aactgaaaag aacaggattt 12120
gagaagctgg ctggtctgaa tttgagtatg accactctag gcatctggac aaaacattct 12180
agtaaaagac taatccaaga ctgtgtagag ataggtaaga gagaaggtaa ctggttagtt 12240
aatgctgaca gactgattgc aggaagact gggagtttt acatcccaag cactggtgtc 12300
actctgttgg gaaaacatta tgaggaaatt aacttaaagc aaaaggcggc acaaccgccg 12360
atagaggggg ttgacagata taagttgggc cccatagtta atgtaatctt gagaaggctg 12420
agggtgatgc tgatgacagt tgccagcgga agctggtaaa tccgtccgga gcatcgtgcc 12480
ctcgtcaag gttttaattg taaatattgt aaatagacag ctaagatatt tattgtagtt 12540
ggatagtaat gtagtgatag tagatacccc aatttaacac tacctccaat gcactaagca 12600
ctttagctgt gtgaggttaa ctcgacgtcc acggttggac tagaggatgc ctctgacagc 12660
cc 12663

```

VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA CON UNA PROTEINA ERNS**MODIFICADA****CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a pestivirus quiméricos novedosos y a su uso en composiciones inmunogénicas y vacunas. Se refiere también a procedimientos y kits para tratar o evitar la dispersión de la infección por el virus de la diarrea viral bovina, la presente invención se refiere adicionalmente al uso de pestivirus quiméricos en procedimientos y kits para diferenciar entre animales vacunados y animales infectados con un virus de tipo silvestre.

10

ANTECEDENTES

Los pestivirus, incluyendo el virus de la diarrea viral bovina (virus BVD, o BVDV), se han aislado de varias especies de animales, tanto domésticos como salvajes. Los huéspedes identificados para BVDV incluyen búfalo, antílope, reno y diversas especies de ciervo, mientras que se han identificado especies de pestivirus únicas en jirafas y en antílope americano. BVDV es un virus de ARN pequeño de la familia Flaviviridae. Está cercanamente relacionado con otros pestivirus que son los agentes causantes de la enfermedad de Border en ovejas y de la peste porcina clásica en cerdos. Recientemente un pestivirus divergente llamado pestivirus Bungowannah se ha identificado como un agente etiológico de la infección fetal de cochinitos en Australia.

20

La enfermedad causada por BVDV particularmente en ganado vacuno está extendida, y puede ser económicamente devastadora. La infección de BVDV en ganado vacuno puede dar como resultado problemas de cría, y puede causar abortos o nacimientos prematuros. BVDV es capaz de cruzar la placenta del ganado vacuno preñado, y puede dar como resultado el

25

nacimiento de partos infectados de forma persistente (PI) que son inmunotolerantes para el virus y persistentemente virémicos para el resto de sus vidas. El ganado vacuno infectado puede presentar también "enfermedad mucosal", caracterizada por temperatura elevada, diarrea, tos y ulceración de la mucosa alimentaria. Estos animales persistentemente infectados proporcionan una fuente para diseminación de virus dentro del rebaño por estallidos adicionales de enfermedad mucosal y están altamente predispuestos a infección con microorganismos responsables de causar enfermedades del intestino o neumonía.

10 BVDV está clasificado en uno de dos biotipos. Aquellos del biotipo "cp" inducen un efecto citopático en células cultivadas, mientras que los virus de biotipo no citopático, o "ncp", no. Además, se reconocen dos genotipos principales (tipo 1 y 2), se ha mostrado que ambos de los cuales causan una diversidad de síndromes clínicos.

15 Los viriones de BVDV son de 40 a 60 nm en diámetro. La nucleocápside de BVDV consta de una molécula individual de ARN y de la proteína C de la cápside. La nucleocápside está rodeada por una membrana lipídica con dos glicoproteínas unidas a ella, E1 y E2. Una tercera glicoproteína, E^{ms}, está asociada débilmente a la envoltura. El genoma de BVDV es
20 aproximadamente de 12,5 kb de longitud, y contienen un marco de lectura abierta individual localizada entre las regiones no traducidas de 5' y 3' (NTRs). Una poliproteína de aproximadamente 438 kD se traduce a partir de este marco de lectura abierta, y se procesa por proteasas celulares y virales en al menos once proteínas virales estructurales y no estructurales (NS) (Tautz, y col., *J. Virol.* 71: 5415-5422 (1997); Xu, y col., *J. Virol.* 71: 5312-5322 (1997); Elbers, y
25

col., *J. Virol.* 70: 4131-4135 (1996); y Wiskerchen, y col., *Virology* 184: 341-350 (1991)). El orden genómico de BVDV es p20/N^{pro}, p14/C, gp48/E^{ns}, gp25/E1, gp53/E2, p54/NS2, p80/NS3, p10/NS4A, p32/NS4B, p58/NS5A y p75/NS5B. Las tres proteínas de la envoltura, gp48/E^{ns}, gp25/E1 y gp53/E2, están muy glicosiladas. E^{ns} (antes referida como E0 o gp48) forma homodímeros, covalentemente unidos por disulfuros. La ausencia de una región de unión a membrana hidrófoba sugiere que E^{ns} está débilmente asociada con la envoltura. E^{ns} induce valoraciones de anticuerpo altas en ganado vacuno infectado, pero los antisueros tienen actividad neutralizadora de virus limitada.

10 Entre las vacunas de BVDV actualmente disponibles están aquellas que contienen virus de tipo silvestre químicamente inactivado. Estas vacunas requieren típicamente la administración de dosis múltiples, y dan como resultado una respuesta inmune de vida corta; ellas no protegen contra la transmisión fetal del virus. En ovejas, se ha comunicado una subunidad de
15 vacuna basada en una proteína E2 purificada. Aunque esta vacuna parezca proteger a los fetos de llegar a infectarse, la protección está limitada a sólo la cepa homóloga de virus, y no hay correlación entre valoraciones de anticuerpos y protección.

20 Las vacunas de BVDV modificadas vivas (ML) se han producido usando virus adecuados que se han atenuado pasando repetidamente en células bovinas o porcinas, o por mutaciones químicamente inducidas que confieren un fenotipo sensible a temperatura en el virus. Una dosis de una vacuna de MLV BVDV se ha demostrado suficiente para proporcionar protección de la infección, y la duración de la inmunidad puede prolongarse años en ganado
25 vacuno vacunado. Además, se ha comunicado protección cruzada usando

vacunas MLV (Martin, y col., In "Proceedings of the Conference of Research Workers in Animal Diseases", 75:183 (1994)). Sin embargo, las vacunas de MLV existentes permiten la diferenciación entre animales vacunados y animales infectados de forma natural.

- 5 Así, está claro que existe una necesidad de vacunas nuevas para controlar la dispersión de BVDV. Tal vacuna/tales vacunas pueden ser inapreciables en los futuros programas nacionales o regionales de erradicación de BVDV, y podrían combinarse también con otras vacunas de ganado vacuno, que representan un avance sustancial en la industria. Una vacuna más
- 10 efectiva para controlar y realizar seguimientos de la dispersión de BVDV debería ser una vacuna "marcada". Una vacuna tal podría contener un determinante antigénico adicional que no esté presente en virus de tipo silvestre, o carecer de un determinante antigénico que esté presente en virus de tipo silvestre. Con respecto a lo anterior, los animales vacunados montan
- 15 una respuesta inmune para el determinante inmunogénico "marcador", mientras que los animales no vacunados no. A través del uso de un ensayo inmunológico dirigido contra el determinante marcador, los animales vacunados se diferenciarían de animales no vacunados, infectados de forma natural por la presencia de anticuerpos para el determinante marcador. En el caso de la
- 20 última estrategia, los animales infectados con el virus de tipo silvestre montan una respuesta inmune para el determinante marcador, mientras que los animales vacunados, no infectados, no, como un resultado del determinante que no está presente en la vacuna marcada. Por el uso de un ensayo inmunológico dirigido contra el determinante marcador, los animales infectados
- 25 se diferenciarían de animales vacunados, no infectados. En ambos escenarios,

sacrificando de forma selectiva a los animales infectados, el rebaño podría, a lo largo del tiempo, llegar a estar libre de BVDV. Además del beneficio de eliminar la amenaza de la enfermedad de BVDV, la certificación de un rebaño como libre de BVDV ha conducido a liberación de beneficios económicos
5 comerciales.

SUMARIO

En una realización, la presente invención proporciona un pestivirus quimérico, en el que dicho pestivirus quimérico comprende un virus de la
10 diarrea viral bovina que no expresa su proteína E^{ms} homóloga, adicionalmente en el que dicho pestivirus quimérico expresa una proteína E^{ms} heteróloga derivada de otro pestivirus, o una variante natural, sintética o genética de dicha proteína E^{ms} heteróloga.

En otra realización, la presente invención proporciona un pestivirus
15 quimérico como se describe anteriormente, en el que la proteína E^{ms} heteróloga de dicho pestivirus quimérico, o la variante natural, sintética o genética de dicha proteína E^{ms} heteróloga, se deriva de un pestivirus seleccionado del grupo constituido por un pestivirus de reno, un pestivirus de jirafa, y un pestivirus de antilope americano.

20 En una realización diferente, la presente invención proporciona el pestivirus quimérico como se describe anteriormente, en el que la proteína heteróloga E^{ms} de dicho pestivirus quimérico tiene al menos un epítopo de E^{ms} que no está presente en el virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

En una realización diferente, la presente invención proporciona el
25 pestivirus quimérico que se describe anteriormente, en el que la proteína

heteróloga E^{ms} de dicho pestivirus quimérico carece de al menos un epitope de E^{ms} que está presente en el virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

En una realización, la presente invención proporciona un cultivo del pestivirus quimérico como se describe anteriormente.

5 En otra realización, la presente invención proporciona una línea celular o una célula huésped que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente.

En aún otra realización, la presente invención proporciona una molécula polinucleotídica que codifica para el pestivirus quimérico como se describe
10 anteriormente.

En una realización diferente, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente y un vehículo veterinariamente aceptable.

En una realización separada, la presente invención proporciona la
15 composición inmunogénica como se describe anteriormente, en la que el vehículo veterinariamente aceptable es un coadyuvante.

En aún otra realización, la presente invención proporciona la composición inmunogénica como se describe anteriormente, en la que dicho pestivirus quimérico está atenuado vivo.

20 En todavía otra realización, la presente invención proporciona la composición inmunogénica como se describe anteriormente, en la que dicho pestivirus quimérico está inactivado.

En una realización diferente, la presente invención proporciona la composición inmunogénica como se describe anteriormente, que comprende
25 adicionalmente uno o más antígenos adicionales útiles para tratar o evitar la

dispersión de uno o más microorganismos patógenos adicionales en un animal.

En una realización separada, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende la molécula polinucleotídica que codifica para el pestivirus quimérico como se describe anteriormente y un
5 vehículo veterinariamente aceptable.

En una realización diferente, la presente invención proporciona una vacuna que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente y un vehículo veterinariamente aceptable.

En una realización separada, la presente invención proporciona la
10 vacuna como se describe anteriormente, en la que el vehículo veterinariamente aceptable es un coadyuvante.

En aún otra realización, la presente invención proporciona la vacuna como se describe anteriormente, en la que dicho pestivirus quimérico está atenuado vivo.

15 En todavía otra realización, la presente invención proporciona la vacuna como se describe anteriormente, en la que dicho pestivirus quimérico está inactivado.

En una realización diferente, la presente invención proporciona la vacuna como se describe anteriormente, que comprende adicionalmente uno o
20 más antígenos adicionales útiles para tratar o evitar la dispersión de uno o más microorganismos patógenos adicionales en un animal.

En una realización separada, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una molécula polinucleotídica que codifica para el pestivirus quimérico como se describe anteriormente y un vehículo
25 veterinariamente aceptable.

En una realización, la presente invención proporciona un kit que comprende, en al menos un recipiente, una vacuna que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente.

5 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento de tratar o evitar la dispersión de infección de virus de la diarrea viral bovina, en el que una vacuna que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente se administra a un animal.

En una realización diferente, la presente invención proporciona procedimiento de vacunar un animal, en el que se administra una vacuna de
10 pestivirus DIVA a dicho animal, y en el que dicha vacuna de pestivirus DIVA comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente, adicionalmente en el que dicho pestivirus quimérico tiene al menos un epítipo de E^{ms} que no está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

En una realización separada, la presente invención proporciona
15 procedimiento de vacunar un animal, en el que se administra una vacuna de pestivirus DIVA a dicho animal, y en el que dicha vacuna DIVA comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente, adicionalmente en el que dicho pestivirus quimérico carece de al menos un epítipo de E^{ms} que está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

20 En aún otra realización, la presente invención proporciona procedimiento de diferenciación entre un animal vacunado con una vacuna que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente y un animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, en el que el animal vacunado con dicha vacuna genera anticuerpos para al menos un epítipo de E^{ms} que
25 está presente en el pestivirus quimérico de dicha vacuna, pero que no está

presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) obtener una muestra sérica de los animales;
- b) someter a ensayos tales muestras para la presencia o ausencia de los anticuerpos;
- c) identificar al animal que tiene dichos anticuerpos como que ha sido vacunado con dicha vacuna; y
- d) identificar al animal que carece de dichos anticuerpos como que se ha infectado con el BVDV de tipo silvestre.

10 En aún otra realización, la presente invención proporciona procedimiento de diferenciar entre un animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre y un animal vacunado con una vacuna que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente, en el que el animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre genera anticuerpos para al menos un epítipo de E^{ms} que está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, pero que no está presente en el pestivirus quimérico de dicha vacuna, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) obtener una muestra sérica de los animales;
- b) someter a ensayos dichas muestras para la presencia o ausencia de los anticuerpos;
- c) identificar al animal que tiene dichos anticuerpos como que ha sido infectado con el BVDV de tipo silvestre; y
- d) identificar al animal que carece de dichos anticuerpos como que ha sido vacunado con dicha vacuna.

25 En una realización, la presente invención proporciona kit diagnóstico

para diferenciar entre un animal vacunado con una vacuna que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente y un animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, comprendiendo dicho kit reactivos capaces de detectar anticuerpos para al menos un epítipo de E^{ms} que está presente en el pestivirus quimérico de la vacuna, pero que no está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

En otra realización, la presente invención proporciona kit diagnóstico para diferenciar entre un animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre y un animal vacunado con una vacuna que comprende el pestivirus quimérico como se describe anteriormente, comprendiendo dicho kit reactivos capaces de detectar anticuerpos para al menos un epítipo de E^{ms} que está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, pero que no está presente en el pestivirus quimérico de la vacuna.

En aún otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que reconoce un epítipo de E^{ms} que está presente en el pestivirus quimérico como se describe anteriormente, pero el cual epítipo no está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

En una realización diferente, la presente invención proporciona un anticuerpo que reconoce un epítipo presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, pero el cual epítipo no está presente en el pestivirus quimérico como se describe anteriormente.

En otra realización, un pestivirus quimérico como se describe en el presente documento se usa en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por BVDV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las siguientes definiciones se pueden aplicar a términos empleados en la descripción de realizaciones de la invención. Las siguientes definiciones reemplazan cualesquiera definiciones contradictorias contenidas en cada referencia individual incorporada en el presente documento mediante referencia.

A no ser que se defina de otro modo en la presente memoria, los términos científicos y técnicos que se usan relacionados con la presente invención tendrán los significados que se entienden habitualmente por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. Adicionalmente, a no ser que el contexto requiera algo diferente, los términos singulares incluirán el plural y los términos en plural y los términos en plural incluirán el singular.

El término "aminoácido", como se usa en el presente documento, hace referencia a aminoácidos que se dan en la naturaleza y a aminoácidos sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y a imitadores de aminoácidos que funcionan en una manera similar a los aminoácidos que se dan en la naturaleza. Los aminoácidos que se dan en la naturaleza son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los estereoisómeros (por ejemplo, aminoácidos D) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como α -aminoácidos y α -aminoácidos disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales pueden ser también componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato,

ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares.

Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se da en la naturaleza, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R. Los análogos de aminoácidos ejemplares incluyen, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, y metionina metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o armazones peptídicos modificados, pero mantienen la misma estructura química esencial como un aminoácido que se da en la naturaleza. Los miméticos de aminoácidos hacen referencia a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido que se da en la naturaleza.

Los aminoácidos se pueden referir para el presente documento bien por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o bien por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

El término "animal" como se usa en el presente documento, se pretende que incluya cualquier animal que sea susceptible de infecciones con BVDV, incluyendo pero no limitado a especies bovinas, ovinas, caprinas y porcinas, tanto domésticas como salvajes.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos", como se usa en el presente documento, hace referencia a una molécula de inmunoglobulina capaz de unir

un antígeno por medio de reconocimientos de un epítope. Los anticuerpos pueden ser una mezcla policlonal o monoclonales. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes, o pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden existir en una diversidad de formas que incluyen, por ejemplo, como, Fv, Fab', F(ab')₂, así como en cadenas individuales.

El término "antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que contiene uno o más epítopes (lineales, conformacionales o ambos) que tras exposición a un sujeto inducirán una respuesta inmune que es específica para ese antígeno. El término "antígeno" se puede referir a bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios vivos atenuados, inactivados o modificados. El término "antígeno" como se usa en el presente documento se puede referir también a un antígeno subunidad, que está separado y diferenciado a partir de un organismo entero con el que el antígeno está asociado en la naturaleza. El término "antígeno" se puede referir también a anticuerpos, tales como anticuerpos antiidiotípicos o fragmentos de los mismos, y a mimotopos peptídicos sintéticos que pueden imitar un antígeno o un determinante antigénico (epítope). El término "antígeno" se puede referir también a un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico in vivo, tal como en aplicaciones de inmunización de ADN.

Los términos "BVDV", "aislados de BVDV" o "cepas de BVDV" como se usan en el presente documento hacen referencia a virus de la diarrea viral bovina, incluyendo pero no limitados a tipo I y tipo II, que constan de genoma

viral, proteínas asociadas, y otros constituyentes químicos (tales como lípidos). Se conocen un número de virus de la diarrea viral bovina de tipo I y tipo II por aquellos expertos en la técnica y están disponibles a través de, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC®). El virus de la diarrea viral bovina
5 tiene un genoma en forma de ARN. El ARN se puede transcribir de forma reversa a ADN para usar en clonación. Así, las referencias hechas en el presente documento a ácido nucleico y virus de la diarrea viral bovina comprenden tanto secuencias de ARN virales como secuencias de ADN derivadas de las secuencias de ARN virales.

10 El término "línea celular" o "célula huésped", como se usa en el presente documento quiere decir una célula procariota o eucariota en la que un virus puede replicarse y/o mantenerse.

El término "quimérico" o "quimera" como se usa en el presente documento quiere decir un microorganismo, por ejemplo un virus, que
15 contienen componentes genéticos o físicos derivados de más de un progenitor.

El término "cultivo" como se usa en el presente documento quiere decir una población de células o microorganismos que crecen en la ausencia de otras especies o tipos.

El término "DIVA" como se usa en el presente documento quiere decir
20 una vacuna que es capaz de diferenciar animales infectados de animales vacunados.

Un "epitope" es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de linfocitos T o a anticuerpos específicos, y comprende típicamente de aproximadamente 3 residuos de aminoácidos a aproximadamente 20 residuos
25 de aminoácidos.

El término "heterólogo", como se usa en el presente documento, significa derivado de una especie o cepa diferente.

El término "homólogo", como se usa en el presente documento, significa derivado de la misma especie o cepa.

- 5 El término "composición inmunogénica", como se usa en el presente documento, quiere decir una composición que genera una respuesta inmune (es decir, tiene actividad inmunogénica) cuando se administra sola o con un vehículo farmacéuticamente aceptable, a un animal. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune celular mediada principalmente por linfocitos
- 10 T citotóxicos, o por una respuesta inmune humoral mediada principalmente por linfocitos T coadyuvantes, que a su vez activan linfocitos B conduciendo a producción de anticuerpos.

- El término "patógeno" o "microorganismo patógeno" como se usa en el presente documento quiere decir un microorganismo -por ejemplo un virus,
- 15 bacteria, hongo, protozoo, o helminto- que es capaz de causar o inducir una enfermedad, síndrome, o estado anormal en su animal huésped.

- El término "pestivirus" como se usa en el presente documento quiere decir un virus ARN del género Pestivirus, de la familia Flaviviridae. Los pestivirus incluyen, pero no se limitan a, BVDV (tipo 1 y tipo 2), Virus de la
- 20 Peste Porcina Clásica (CSFV), y Virus de la Enfermedad de Border (BDV), así como pestivirus aislados de especies tales como jabalí salvaje, búfalo, eland, bisonte, alpaca, pudú, bongo, diversas especies de ciervo, jirafa, reno, gamuza y antílope americano (Vilcek y Nettleton; *Vet Microbiol.* 116:1-12 (2006)).

- El término "molécula polinucleotídica" como se usa en el presente
- 25 documento quiere decir una molécula polimérica orgánica compuesta de

monómeros nucleotídicos unidos covalentemente en una cadena. ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) son ejemplos de polinucleótidos con distinta función biológica.

Los términos "evitar", "evitando" o "prevención", y similares, como se
5 usan en el presente documento, quieren decir inhibir la replicación de un microorganismo, inhibir transmisión de un microorganismo, o inhibir a un microorganismo de establecerse a sí mismo en un huésped. Estos términos y similares como se usan en el presente documento pueden también inhibir o bloquear uno o más signos o síntomas de infección.

10 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en el presente documento quiere decir una cantidad de un microorganismo, o de una subunidad de antígeno, o de polipéptidos, o de moléculas de polinucleótidos, y combinaciones de los mismos, suficientes para facilitar una respuesta inmune en el sujeto al que ello se administra. La respuesta inmune puede comprender,
15 sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o de inmunidad humoral.

Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento", y similares, como se usan en el presente documento quieren decir reducir o eliminar una infección por un microorganismo. Estos términos y similares como se usan en el presente documento pueden querer decir también reducir la replicación de un
20 microorganismo, reducir la transmisión de un microorganismo, o reducir la capacidad de un microorganismo para establecerse a sí mismo en su huésped. Estos términos y similares como se usan en el presente documento pueden también querer decir también reducir, mejorar, o eliminar uno o más signos o síntomas de infección por un microorganismo, o acelerar la recuperación de
25 infección por un microorganismo.

Los términos "vacuna" y "composición de vacuna", como se usan en el presente documento, quieren decir una composición que evita o reduce una infección, o que evita o reduce uno o más signos o síntomas de infección. Los efectos protectores de una composición de vacuna frente a un patógeno se logran normalmente induciendo en el sujeto una respuesta inmune, bien una respuesta inmune mediada por células o bien una respuesta inmune humoral o una combinación de ambas. Hablando generalmente, las incidencias de infección abolidas o reducidas, la mejora de los signos o síntomas, o la eliminación acelerada del microorganismo de los sujetos infectados son indicativas de los efectos protectores de una composición de vacuna. Las composiciones de vacuna de la presente invención proporcionan efectos protectores contra infecciones causadas por BVDV.

El término "variante", como se usa en el presente documento, hace referencia a una derivación de una proteína dada y/o de una secuencia de genes, en la que la secuencia derivada es esencialmente la misma que la secuencia dada, pero para diferencias mutacionales. Dichas diferencias pueden darse en la naturaleza, o pueden generarse sintética o genéticamente.

El término "vehículo veterinariamente aceptable" como se usa en el presente documento hace referencia a sustancias, que están dentro del alcance del juicio médico sólido, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebidas, y similares, proporcionales con una relación beneficio frente a riesgo razonable, y efectivas para su uso deseado.

La siguiente descripción se proporciona para ayudar a aquellos expertos en la técnica en practicar la presente invención. Aún así, esta descripción no

debería interpretarse para limitar indebidamente la presente invención ya que se pueden hacer modificaciones y variaciones en las realizaciones discutidas en el presente documento por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica sin apartarse del espíritu o del alcance del presente descubrimiento de la
5 invención.

VIRUS, COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS, Y VACUNAS

La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden uno o más pestivirus quiméricos, en las que dicho
10 pestivirus quimérico comprende un virus de la diarrea viral bovina que no expresa su proteína E^{ns} homóloga, pero en las que dicho pestivirus quimérico expresa una proteína E^{ns} heteróloga derivada de otro pestivirus, o una variante natural, de síntesis o genética de dicha proteína E^{ns} heteróloga. El pestivirus quimérico puede estar seleccionado de, pero no está limitado a, el grupo
15 constituido por quimeras de BVDV/pestivirus de reno, BVDV/pestivirus de jirafa y BVDV/pestivirus de antílope americano.

En una realización, el pestivirus quimérico de BVDV/pestivirus de jirafa es la cepa depositada como UC 25547 con American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU., y
20 se le da la designación de depósito ATCC® de PTA-9938. En una realización, el pestivirus quimérico de BVDV/pestivirus de antílope americano es la cepa depositada como UC 25548 con ATCC® y se le da la designación de depósito ATCC® de PTA-9939. En una realización, el pestivirus quimérico de BVDV/pestivirus de reno es la cepa depositada como UC 25549 con ATCC® y
25 se le da la designación de depósito ATCC® de PTA-9940.

Se pueden propagar los pestivirus quiméricos de la presente invención en células, líneas celulares y células huésped. Dichas células, líneas celulares o células huésped pueden ser por ejemplo, pero no se limitan a, células de mamífero y células no de mamífero, incluyendo células de insecto y células vegetales. Las células, las líneas celulares y las células huésped en las que se puede propagar los pestivirus quiméricos de la presente invención se conocen fácilmente y son fácilmente accesibles para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica.

El pestivirus quimérico de la presente invención puede atenuarse e inactivarse antes de usar en una composición inmunogénica o vacuna. Los procedimientos de atenuación e inactivación se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Los procedimientos para atenuación incluyen, pero no se limitan a, pasos en serie en cultivo celular en una línea celular adecuada, irradiación ultravioleta, y mutagénesis química. Los procedimientos para inactivación incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con formalina, betapropiolactona (BPL) o etilenoimina binaria (BEI), u otros procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

La inactivación por formalina se puede llevar a cabo mezclando la suspensión de virus con formaldehído al 37% a una concentración de formaldehído final del 0,05%. La mezcla de virus-formaldehído se mezcla por agitación continua durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de virus inactivada se pone a prueba después para virus vivos residuales realizando ensayo por crecimiento en una línea celular adecuada.

La inactivación por BEI se puede llevar a cabo mezclando la suspensión de virus de la presente invención con BEI (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N

) 0,1 M a una concentración de BEI final de 1 mM. La mezcla de virus-BEI se mezcla por agitación constante durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, seguida por la adición de tiosulfato de sodio 1,0 M a una concentración final de 0,1 mM. La mezcla se continúa durante dos horas
5 adicionales. La mezcla de virus inactivada se pone a prueba después para virus vivos residuales realizando ensayo por crecimiento en una línea celular adecuada.

Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención pueden incluir uno o más vehículos veterinariamente aceptables.
10 Como se usa en el presente documento, un "vehículo veterinariamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, coadyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, y similares. Los diluyentes pueden incluir
15 agua, solución salina, dextosa, etanol, glicerol, y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol, y lactosa, entre otros conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros conocidos por el trabajador experto. Los conservantes incluyen mertiolato, entre otros conocidos por el trabajador
20 experto.

Los coadyuvantes incluyen, pero no se limitan a, el sistema coadyuvante RIBI (Ribi Inc.), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, coadyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero Block (CytRx, Atlanta Ga.), SAF-
25 M (Chiron, Emeryville Calif.), coadyuvante AMPHIGEN[®], saponina, Quil A, QS-

21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil-lípido A, coadyuvante amina lipoidal Avridina, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (recombinante o lo contrario), toxina colérica, o péptido muramilo, entre otros muchos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Las cantidades y concentraciones de coadyuvantes y aditivos útiles en el compuesto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el trabajador experto. En una realización, la presente invención contempla composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 2000 µg de coadyuvante. En otra realización está incluido el coadyuvante en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1500 µg, o de aproximadamente 250 µg a aproximadamente 1000 µg, o de aproximadamente 350 µg a aproximadamente 750 µg. En otra realización, el coadyuvante está incluido en una cantidad de aproximadamente 500 µg/2 ml de dosis de la composición inmunogénica o vacuna.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden incluir también antibióticos. Tales antibióticos incluyen, pero no están limitados a, aquellos de las clases de aminoglicósidos, carbapenems, cefalosporinas, glicopéptidos, macrólidos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas, y tetraciclinas. En una realización, la presente invención contempla composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibiótico. En otra realización, las composiciones inmunogénicas y vacunas comprenden de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 55 µg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 10

µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 15 µg/ml a aproximadamente 45 µg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml de antibiótico, o de aproximadamente 25 µg/ml a aproximadamente 35 µg/ml de antibiótico. En aún otra realización, las composiciones inmunogénicas y vacunas comprenden menos de

5 aproximadamente 30 µg/ml de antibiótico.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la invención pueden incluir adicionalmente uno o más agentes inmunomoduladores distintos, tales como, por ejemplo, interleucinas, interferones, u otras citoquinas, cantidades

10 adecuadas de las que se pueden determinar por el trabajador experto.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención pueden incluir una o más moléculas polinucleotídicas que codifican para un pestivirus quimérico. Se pueden usar bien moléculas de ADN o bien moléculas de ARN que codifiquen todo el genoma del pestivirus quimérico, o uno o más

15 marcos de lectura abiertos, en composiciones inmunógenas o vacunas. La molécula de ADN o de ARN se puede administrar ausentes otros agentes, o se puede administrar conjuntamente con un agente que facilita captación celular (por ejemplo, liposomas o lípidos catiónicos). El polinucleótido total en la composición inmunogénica o en la vacuna estará generalmente entre

20 aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 5,0 mg/ml. En otra realización, el polinucleótido total en la composición inmunogénica o en la vacuna será de aproximadamente 1 µg/ml y de aproximadamente 4,0 mg/ml, o de aproximadamente 10 µg/ml y de aproximadamente 3,0 mg/ml, o de aproximadamente 100 µg/ml y de aproximadamente 2,0 mg/ml. Las vacunas y

25 los procedimientos de vacunación que utilizan ácidos nucleicos (ADN o mARN)

se han descrito bien en la técnica, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 5.703.055, la Patente de los Estados Unidos N.º 5,580,859, la Patente de los Estados Unidos N.º 5.589.466, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

5 Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención pueden incluir también antígenos de BVDV adicionales, por ejemplo, aquellos descritos en la patente de Estados Unidos N.º 6.060.457, la patente de Estados Unidos N.º 6.015.795, la patente de Estados Unidos N.º 6.001.613, y la patente de Estados Unidos N.º 5.593.873, todo lo cual está
10 incorporado en el presente documento por referencia.

Además de uno o más pestivirus quimérico(s), las composiciones inmunogénicas y las vacunas pueden incluir otros antígenos. Los antígenos pueden estar en forma de una preparación total o parcial inactivada del microorganismo, o en la forma de moléculas antigénicas obtenidas por técnicas
15 de ingeniería genética o de síntesis química. Otros antígenos apropiados para usar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de bacterias patógenas tales como *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus anthracis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia*
20 *haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridium* spp., *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Chlamydia* spp., *Brucella* spp., *Vibrio* spp., serotipos de *Salmonella enterica* y *Leptospira* spp. Los antígenos pueden estar
25 derivados también de hongos patógenos tales como *Candida*, protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria*

spp., *Babesia spp.*, *Giardia spp.*, o helmintos tales como *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, y *Fasciola*. Los antígenos adicionales incluyen virus patógenos tales como coronavirus bovinos, herpesvirus-1,3,6 bovinos, virus parainfluenza bovino, virus sincitial respiratorio bovino, virus de la leucosis bovina, virus de la
5 peste bovina, virus de enfermedades de las patas y la boca, virus de la rabia, y virus influenza.

FORMAS, DOSIFICACIONES, VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención
10 se pueden administrar a animales para inducir una respuesta inmune efectiva contra BVDV. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos de estimular una respuesta inmune efectiva contra BVDV, administrando a un animal una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición inmunógena o vacuna de la presente invención descrita en el
15 presente documento.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención se pueden fabricar de diversas formas dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden fabricarse en forma de soluciones o dispersiones estériles acuosas
20 adecuadas para uso inyectable, o pueden fabricarse en formas liofilizadas usando técnicas de secado por congelación. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas liofilizadas se mantienen típicamente a aproximadamente 4°C, y pueden reconstituirse en una solución estabilizante, por ejemplo, solución salina o y HEPES, con o sin coadyuvante. Las
25 composiciones inmunogénicas y las vacunas se pueden fabricar también en

forma de suspensiones o emulsiones.

Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los pestivirus quiméricos descritos anteriormente. Los virus purificados se pueden
5 usar directamente en una composición inmunogénica o vacuna, o pueden atenuarse adicionalmente, o inactivarse. Típicamente, una composición inmunogénica o vacuna contiene entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^{12} partículas virales, o entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^{11} partículas virales, o entre aproximadamente 1×10^4 y
10 aproximadamente 1×10^{10} partículas virales, o entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 partículas virales, o entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 partículas virales. La cantidad precisa de un virus en una composición inmunogénica o vacuna efectiva para proporcionar un efecto protector se puede determinar por un trabajador experto.

15 Las composiciones inmunogénicas y vacunas comprenden generalmente un vehículo veterinariamente aceptable en un volumen de entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 5 ml. En otra realización el volumen del vehículo está entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 4 ml, o entre aproximadamente 2 ml y aproximadamente 3 ml. En otra
20 realización, el volumen del vehículo es aproximadamente 1 ml, o es aproximadamente 2 ml, o es aproximadamente 5 ml. Los vehículos veterinariamente aceptables adecuados para usar en composiciones inmunogénicas y vacunas pueden ser cualesquiera de aquellos descritos anteriormente en el presente documento.

25 Aquellos expertos en la técnica determinan fácilmente si un virus

necesita atenuarse o inactivarse antes de su administración. En otra realización de la presente invención, se puede administrar un pestivirus quimérico directamente a un animal sin atenuación adicional. La cantidad de un virus que es terapéuticamente efectivo puede variar dependiendo del virus particular
5 usado, la afección del animal y/o el grado de infección, y puede determinarse por un trabajador experto.

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, se puede administrar una dosis individual a animales, o, alternativamente, pueden tener lugar dos o más inoculaciones con intervalos desde aproximadamente dos
10 hasta aproximadamente diez semanas. Los regímenes de refuerzo se pueden requerir y el régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar inmunización óptima. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar el régimen de administración óptima.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas se pueden administrar
15 directamente dentro del torrente sanguíneo, dentro del músculo, o dentro de un órgano interno. Los medios adecuados para administración parenteral incluyen intravenoso, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular y subcutáneo. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectoras de aguja
20 (incluyendo de microaguja), inyectoras libres de aguja y técnicas de infusión.

Las formulaciones parenterales son típicamente soluciones acuosas que pueden contener excipientes como sales, carbohidratos y agentes tamponantes (preferentemente a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 5 a
25 aproximadamente 7,5, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 7,5, o

aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma secada para usarse en conjunción con un vehículo adecuado tal como agua libre de pirógeno, estéril.

- 5 La preparación de formulaciones parenterales según condiciones estériles, por ejemplo, mediante liofilización, se pueden llevar a cabo fácilmente usando técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

- 10 La solubilidad de compuestos usados en la preparación de soluciones parenterales se puede incrementar por el uso de técnicas de formulación apropiadas conocidas por el trabajador experto, tales como la incorporación de agentes potenciadores de solubilidad que incluyen tampones, sales, tensioactivos, liposomas, ciclodextrinas, y similares.

- 15 Las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, mantenida, por pulsos, controlada, marcada y programada. Así los compuestos de la invención se pueden formular como un sólido, semisólido, o líquido tixotrópico para administración como un dispositivo implantado que proporciona liberación modificada del compuesto
- 20 activo. Ejemplos de tales formulaciones incluyen endoprótesis vasculares y microsferas de ácido poli(*dl*-lactico-glicólico) (PGLA).

- 25 Se pueden administrar también composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención a la piel o mucosa, es decir, dérmicamente o transdérmicamente. Las formulaciones típicas para este propósito incluyen geles, hidrogeles, lociones, soluciones, cremas, pomadas, polvos

espolvoreables, apósitos, espumas, películas, parches cutáneos, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendajes y microemulsiones. Se pueden usar también liposomas. Los vehículos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, parafina líquida, parafina blanca, glicerina, polietilenoglicol y propilenoglicol. Se
5 pueden incorporar potenciadores de penetración. Véase, por ejemplo, Finnin y Morgan, *J. Pharm Sci*, 88 (10): 955-958 (1999).

Otros medios de administración tópica incluyen administración por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis e inyección por microagujas o libre de agujas (*por ejemplo Powderject™, Bioject™, etc.*).

10 Las formulaciones para administración tópica pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, mantenida, por pulsos, controlada, marcada y programada.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas se pueden administrar
15 también intranasalmente o por inhalación, típicamente en forma de un polvo seco (bien solo o bien como una mezcla, por ejemplo, en una mezcla seca con lactosa, o como una partícula de componente mezclado, por ejemplo, mezclado con fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina) a partir de un inhalador de polvo seco o como un pulverizador de aerosol a partir de un contenedor presurizado,
20 bomba, pulverizador, atomizador (preferentemente un atomizador usando medios electrodinámicos para producir una niebla fina), o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano. Para uso intranasal, el polvo puede comprender un agente bioadhesivo, por ejemplo, chitosano o ciclodextrina.

25 El contenedor presurizado, bomba, pulverizador, atomizador, o

nebulizador contiene una solución del/de los compuesto(s) de la invención que comprende, por ejemplo, etanol, etanol acuoso, o un agente alternativo adecuado para dispersar, solubilizar, o prolongar la liberación del producto activo, un(os) propulsor(es) como disolvente y un tensioactivo opcional, tal como trioleato de sorbitán, ácido oleico, o un ácido oligoláctico.

Antes de usar en un polvo seco o formulación de suspensión, el producto de fármaco generalmente se micronizó a un tamaño adecuado para administrar mediante inhalación (típicamente menos de 5 micrómetros). Esto se puede lograr mediante cualquier procedimiento de pulverización apropiado, tal como molienda por chorro en espiral, molienda por chorro en lecho fluido, procesamiento en fluido supercrítico para formar nanopartículas, homogeneización por alta presión, o secado por pulverización.

Se pueden formular cápsulas (hechas, por ejemplo, de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), blister y cartuchos para usar en un inhalador o insuflador para contener una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón y un modificador de actuación tal como *L*-leucina, manitol, o estearato de magnesio. La lactosa puede ser anhidra o estar en forma del monohidrato. Otros excipientes adecuados incluyen dextrano, glucosa, maltosa, sorbitol, xilitol, fructosa, sacarosa y trehalosa.

Una formulación de solución adecuada para usar en un atomizador usando medios electrohidrodinámicos para producir una niebla fina puede contener de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 20 mg del compuesto de la invención por actuación y el volumen de actuación pueden variar de aproximadamente 1 μl a aproximadamente 100 μl . En otra realización, la

cantidad de compuesto por actuación puede variar de aproximadamente 100 μg a aproximadamente 15 mg, o de aproximadamente 500 μg a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 2,5 μg a aproximadamente 5 mg. En otra
5 realización, el volumen de actuación puede variar de aproximadamente 5 μl a aproximadamente 75 μl , o de aproximadamente 10 μl a aproximadamente 50 μl , o de aproximadamente 15 μl a aproximadamente 25 μl . Una formulación típica puede comprender el compuesto de la invención, propilenoglicol, agua estéril, etanol y cloruro de sodio. Disolventes alternativos que se pueden usar
10 en vez de propilenoglicol incluyen glicerol y polietilenoglicol.

Las formulaciones para administración inhalada/intranasal pueden formularse para liberarse de forma inmediata y/o modificada usando, por ejemplo, PGLA. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, mantenida, por pulsos, controlada, marcada y programada.

15 En el caso de inhaladores y aerosoles de polvo seco, la unidad de dosificación se determina generalmente por medio de una válvula que administra una cantidad medida. Las unidades de acuerdo con la invención están típicamente dispuestas para administrar una dosis medida o "soplo" conteniendo de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 100 μg del
20 compuesto de la invención. En otra realización, la cantidad de compuesto administrado en una dosis medida es de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 75 μg , o de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 50 μg , o de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 25 μg , o de aproximadamente 750 ng a aproximadamente 10 μg , o de aproximadamente 1
25 μg a aproximadamente 5 μg . La dosis diaria general estará típicamente en el

intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg que pueden administrarse en una dosis individual o, más usualmente, como dosis divididas a lo largo de todo el día. En otra realización, la dosis diaria general puede variar de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 75 mg, o de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 50 mg, o de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 25 mg, o de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg.

Se pueden administrar también composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención oralmente o peroralmente, es decir dentro del cuerpo del sujeto a través o por medio de la boca e implica tragar o transportar a través de la mucosa oral (por ejemplo, absorción sublingual o bucal) o ambas cosas. Se pueden añadir aromas adecuados, tales como mentol y levomentol, o edulcorantes, tales como sacarina o sacarina sódica, a aquellas formulaciones de la invención que se pretenden administrar de forma oral o peroral.

Se pueden administrar composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención rectalmente o vaginalmente, por ejemplo, en forma de un supositorio, pesario, o enema. La manteca de cacao es una base de supositorios tradicional, pero se pueden usar diversas alternativas según sea apropiado. Las formulaciones para administración rectal/vaginal pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, mantenida, por pulsos, controlada, marcada y programada.

Se pueden administrar también composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención directamente al ojo o al oído, típicamente en

forma de gotas de una suspensión micronizada o de una solución en medio salino estéril, isotónico, de pH ajustado. Otras formulaciones adecuadas para administración oral y auditiva incluyen pomadas, implantes biodegradables (*por ejemplo* esponjas de geles absorbibles, colágeno) y no biodegradables (*por ejemplo* 5 *silicona*), obleas, lentes y sistemas particulados o vesiculares, tales como niosomas o liposomas. Se puede incorporar un polímero tal como ácido poliacrílico reticulado, alcohol polivinílico reticulado, ácido hialurónico reticulado, un polímero celulósico, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, o metilcelulosa, o un polímero heteropolisacárido, por 10 *ejemplo*, goma gelán, conjuntamente con un conservante, tal como cloruro de benزالconio. Tales formulaciones pueden administrarse también por iontoforesis.

Las formulaciones para administración ocular/auditiva pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones 15 de liberación modificada incluyen liberación retardada, mantenida, por pulsos, controlada, marcada y programada.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención se pueden usar en la preparación de un medicamento para tratar o evitar la dispersión de infección con virus de la diarrea viral bovina en un animal.

20 Se pueden usar las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención en la preparación de un medicamento para administrar a un animal, en el que el medicamento es una vacuna de pestivirus DIVA que comprende un pestivirus quimérico que comprende un virus de la diarrea viral bovina que no expresa su proteína E^{ms} homóloga, y en la que dicho pestivirus 25 quimérico expresa una proteína E^{ms} heteróloga derivada de otro pestivirus, o

una variante natural, sintética o genética de dicha proteína E^{ns} heteróloga. En una realización, el pestivirus quimérico tiene al menos un epítipo de E^{ns} que no está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre. En otra realización, el pestivirus quimérico carece de al menos un epítipo de E^{ns} que
5 está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

DETECCIÓN, PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO

La presente invención proporciona procedimientos para determinar el origen de un pestivirus presente en un sujeto animal.

10 La vacunación que emplea una vacuna de DIVA -una que es capaz de diferenciar los animales infectados de los vacunados- proporciona un medio para determinar el origen de un pestivirus presente en un sujeto animal. Esta diferenciación puede lograrse por medio de cualquiera de diversos procedimientos diagnósticos, incluyendo pero no limitados a ELISA, prueba de
15 transferencia de Western y PCR. Estos y otros procedimientos se reconocen fácilmente por alguien de experiencia ordinaria en la técnica.

El pestivirus quimérico de la presente invención se puede distinguir de las cepas de BVDV de tipo silvestre tanto en su composición genómica como en las proteínas expresadas. Tal distinción permite discriminación entre
20 animales vacunados y animales infectados. Por ejemplo, se puede hacer una determinación respecto al caso en que si un animal da resultados positivos en una prueba para BVDV en ciertas pruebas de laboratorio lleva una cepa de BVDV de tipo silvestre, o lleva un pestivirus quimérico de la presente invención obtenido previamente por vacunación.

25 Se puede emplear una diversidad de ensayos para hacer la

determinación. Por ejemplo, los virus se pueden aislar del animal que da positivo para BVDV, y se pueden usar ensayos basados en ácidos nucleicos para determinar la presencia de un genoma de pestivirus quimérico, indicador de vacunación anterior. Los ensayos basados en ácidos nucleicos incluyen

5 análisis de prueba de transferencia de Southern o de Northern, PCR, y secuenciación. Alternativamente, se pueden emplear ensayos basados en proteínas. En ensayos basados en proteínas, las células o tejidos sospechosos de una infección se pueden aislar del animal que da resultados positivos para BVDV. Se pueden hacer extractos celulares a partir de tales células o tejidos y

10 pueden someterse a, por ejemplo, prueba de transferencia de Western, usando anticuerpos apropiados contra proteínas virales que pueden identificar la presencia de bien el pestivirus quimérico previamente inoculado, o bien del BVDV de tipo silvestre.

La extensión y naturaleza de las respuestas inmunes inducidas en el

15 animal se puede valorar usando una diversidad de técnicas. Por ejemplo, los sueros se pueden recoger a partir de animales inoculados y se pueden probar para la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para el virus quimérico, por ejemplo, en un ensayo de neutralización de virus convencional. Se puede lograr la detección de linfocitos T-citotóxicos (CTL) que dan

20 respuesta en tejidos linfoides por ensayos tales como proliferación de linfocitos T, como indicadora de la inducción de una respuesta inmune celular. Las técnicas relevantes se describen bien en la técnica, por ejemplo, Coligan y col. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons Inc. (1994).

Ya que puede ser deseable administrar una composición inmunogénica o vacuna en combinación con compuestos adicionales, por ejemplo, para el propósito de tratar una enfermedad o afección particular, está dentro del ámbito de la presente invención que una composición inmunogénica o vacuna pueda
5 estar convenientemente incluida en, o combinada en, la forma de un kit adecuado para administración o coadministración de las composiciones.

Así, los kits de la presente invención pueden comprender una o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales es una composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la presente invención, y
10 un medio para retener por separado dichas composiciones, tal como un recipiente, una botella dividida, o un paquete de láminas dividido. Un ejemplo de un kit tal es una jeringuilla y una aguja, y similares. Un kit de la presente invención es particularmente adecuado para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral o parenteral, para administrar las composiciones
15 separadas a intervalos de dosificación diferentes, o para valorar las composiciones separadas una frente a la otra. Para ayudar a una administración de una composición de la presente invención, el kit comprende típicamente las direcciones para administración.

Otro kit de la presente invención puede comprender uno o más reactivos
20 útiles para la detección de y para la diferenciación entre un animal infectado por BVDV y un animal vacunado con pestivirus quimérico. El kit puede incluir reactivos para analizar una muestra para la presencia de BVDV completo, o de polipéptidos de BVDV, epitopes o secuencias de polinucleótido que no están presentes en el pestivirus quimérico de la composición inmunogénica o vacuna.
25 Alternativamente, los kits de la presente invención pueden incluir reactivos para

analizar una muestra para la presencia de un pestivirus quimérico, o polipéptidos, epitopes o secuencias polinucleotídicas que no están presentes en el BVDV de tipo silvestre. La presencia de virus, polipéptidos, o secuencias de polinucleótidos se puede determinar usando anticuerpos, PCR, hibridación, y otros procedimientos de detección conocidos por aquellos de experiencia en la técnica.

Otro kit de la presente invención puede proporcionar reactivos para la detección de anticuerpos contra epitopes particulares. Los epitopes bien están presentes en el pestivirus quimérico de la presente invención y no están presentes en el BVDV de tipo silvestre, o bien alternativamente, están presentes en el BVDV de tipo silvestre y no están presentes en el pestivirus quimérico de la presente invención. Tales reactivos son útiles para analizar una muestra para la presencia de anticuerpos, y se conocen fácilmente y están fácilmente disponibles para alguien de experiencia ordinaria en la técnica. La presencia de anticuerpos se puede determinar usando procedimientos de detección estándar conocidos por aquellos de experiencia en la técnica.

En ciertas realizaciones, los kits pueden incluir un juego de instrucciones impresas o una etiqueta indicando que el kit es útil para la detección y diferenciación de animales infectados por BVDV de animales vacunados con pestivirus quimérico.

ANTICUERPO, ANTICUERPOS

Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales, o recombinantes. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra el inmunógeno o contra una parte del mismo. Por ejemplo, un péptido sintético

basado en la secuencia de aminoácidos del inmunógeno, o preparado recombinantemente por técnicas de clonación o el producto del gen natural y/o partes del mismo se puede aislar y usar como el inmunógeno. Los inmunógenos se pueden usar para producir anticuerpos por tecnología de
5 producción de anticuerpos estándar bien conocida por aquellos expertos en la técnica, tal como se describe generalmente en Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988) y Borrebaeck, "Antibody Engineering -A Practical Guide", W.H. Freeman y Co. (1992). Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse también a
10 partir de los anticuerpos, e incluyen Fab, F(ab')₂, y Fv, por procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

En la producción de anticuerpos, se puede llevar a cabo búsqueda del anticuerpo deseado por procedimientos estándar en inmunología conocidos en la técnica. Se siguen generalmente técnicas no específicamente descritas
15 como en Stites, y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994) y Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman y Co., Nueva York (1980). En general, los tipos preferidos de inmunoensayos son ELISA y prueba de transferencia de Western. Ambos ensayos se conocen bien por aquellos
20 expertos en la técnica. Se pueden usar tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales en los ensayos. El anticuerpo puede estar unido a un sustrato de soporte sólido o puede estar conjugado con un resto detectable o puede estar unido y conjugado según se sabe bien en la técnica. (Para una
25 discusión general de conjugación de restos fluorescentes o enzimáticos, véase Johnstone y Thorpe, "Immunochemistry in Practice", Blackwell Scientific

Publications, Oxford (1982)). La unión de anticuerpos a un sustrato de soporte sólido también se conoce bien en la técnica. (Para una discusión general, véanse Harlow y Lane (1988) y Borrebaeck (1992)). Los restos detectables para usar en la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, 5 marcadores fluorescentes, metálicos, enzimáticos y radiactivos tales como biotina, oro, ferritina, fosfatasa alcalina, b-galactosidasa, peroxidasa, ureasa, fluoresceína, rodamina, tritio, ^{14}C y yodinación.

La presente invención está ilustrada adicionalmente por, pero de ninguna manera está limitada por, los siguientes ejemplos.

10

Ejemplo 1. Construcción y Caracterización Serológica de Pestivirus Quiméricos

E. coli K12 GM2163 [F- ara-14, leuB6, thi-1, fhuA31, lacY1, tsx-78, galK2, galT22, supE44, hisG4, rpsL136, (Str^r), xyl-5, mtl-1, dam13::Tn9(Cam^r), 15 dcm-6, mcrB1, hsdR2(rk⁻mk⁻),mcrA] alberga un plásmido que contiene el ADNc genómico de longitud total de la cepa NADL del virus de la diarrea viral bovina (BVDV-NADL), obtenido del Dr. R. Donis, Universidad de Nebraska.

Se mantuvieron células RD (células testiculares bovinas transformadas con SV40; obtenidas del Dr. R. Donis) en OptiMEM suplementado con suero de 20 caballo al 3%, aminoácidos no esenciales al 1% (NEAA) en medio de Eagle modificado (MEM), Glutamax 2 mM y 10 $\mu\text{g/ml}$ de Gentamicina. Las células BK-6 se obtuvieron a partir de Pfizer Global Manufacturing (PGM). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementando con suero de caballo al 5% o con suero de ternero donante 25 (PGM), Glutamax 2 mM, y Antibiótico y Antimicótico al 1%. Todos los

componentes del medio salvo donde se indica se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Todas las células se mantuvieron a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5%.

Se adquirió anticuerpo monoclonal (MAb) 15C5 específico para E^{rn}s de BVDV a partir de IDEXX (Westbrook, ME). Se proporcionó MAb 20.10.6 contra BVDV NS3 por el Dr. E. Dubovi (Universidad de Cornell). Se obtuvieron MAb WS 363, WS 373 y WS 371, que tienen especificidad para la proteína E^{rn}s del virus de la Enfermedad de Border (BDV), de Veterinary Laboratories Agency (Surrey, Reino Unido). Las muestras de suero bovino n.º 77, n.º 816, n.º 1281, y n.º 1434 se obtuvieron internamente en Pfizer.

Se generaron pestivirus quiméricos reemplazando el gen E^{rn}s de la cepa BVDV-NADL con el gen E^{rn}s de pestivirus de jirafa (G-E^{rn}s), de reno (R-E^{rn}s), o de antilope americano (P-E^{rn}s) usando un procedimiento de PCR solapante. Se usó bien ADN polimerasa HS de fusión PfuUltraTM II (Stratagene; La Jolla, CA) o bien ADN polimerasa Taq de Platinum® de Alta Fidelidad (Invitrogen). Se enumeran en la Tabla 1 los cebadores de oligonucleótidos (con SEQ ID N.ºs acompañantes) para PCR solapantes y para generar un ADN viral de longitud total en la Tabla 1.

20 **Tabla 1. Cebadores oligonucleotídicos usados para amplificación por PCR**

SEQ ID N.º	Nombre	Origen	Secuencias (5'-3')	Sitio de Unión del Cebador (secuencia subrayada)
1	Oligo B-5	T7 + NADL	<u>GTGTTAATACGACTCACTATAG</u> TATACGAGAATTAGAAAAGGC	promotor T7
2	Oligo 84	NADL	GGGGGCTGTTAGAGGTCTTCC	
3	Oligo 127	G-E ^{rn} s + NADL	<u>AATTCCACTGGGTGATGTTCTCTC</u>	G-E ^{rn} s extremo N-

			CCATTGTAACCTTGAAACAAAAC	terminal
4	Oligo 128	G-E ^{ms}	GAGAACATCACCCAGTGGAA	
5	Oligo 129	G-E ^{ms}	TGCGTGGGCTCCAAACCATGT	
6	Oligo 130	G-E ^{ms} + NADL	<u>AACATGGTTTGGAGCCACGCA</u> GCTTCCCCTTACTGTGATGTCG	G-E ^{ms} extremo C-terminal
7	Oligo 131	R-E ^{ms} + NADL	<u>GGTTCCACTGTGTTATATTCTCTC</u> CCATTGTAACCTTGAAACAAAAC	R-E ^{ms} extremo N-terminal
8	Oligo 132	R-E ^{ms}	GAGAATATAACACAGTGGAAAC	
9	Oligo 133	R-E ^{ms}	TGCATTAGCTCCGAACACGTT	
10	Oligo 134	R-E ^{ms} + NADL	<u>AACGTGGTTCCGGAGCTAATGCA</u> GCTTCCCCTTACTGTGATGTCG	R-E ^{ms} extremo C-terminal
11	Oligo 135	P-E ^{ms} + NADL	<u>GGTTCCACTGAGTTATATTAC</u> TCCCATTGTAACCTTGAAACA	P-E ^{ms} extremo N-terminal
12	Oligo 136	P-E ^{ms}	GTGAATATAACTCAGTGGAAAC	
13	Oligo 137	P-E ^{ms}	TGCCTGTGCCCAAACCATGT	
14	Oligo 138	P-E ^{ms} + NADL	<u>AACATGGTTTGGGGCACAGGCA</u> GCTTCCCCTTACTGTGATGTCG	P-E ^{ms} extremo C-terminal
15	Oligo 175	NADL	GTTATCAATAGTAGCCACAGAAT	
16	Oligo 177	NADL	TCCACCCTCAATCGACGCTAAA	
17	Oligo 237	CM5960	CCCTGAGGCCTTCTGTTCTGAT	
18	Oligo P7	CM5960	CACCTGTGCGGAGGTACTACTACT	
19	Oligo P8	CM5960	CTTGTCTATCTTATCTCTTATTGC	
20	Oligo P3	CM5960	ACTATCTGAACAGTTGGACAGG	
21	Oligo 296-1	T7 + CM53637	<u>GTGTTAATACGACTCACTATA</u> GTATACGAGATTAGCTAAAG	promotor T7
22	Oligo 297	P- E ^{ms} +CM53637	<u>CCAGGTTCCACTGAGTTATATTAC</u> TCCTGTTACCAGCTGAAGCAGAA	P-E ^{ms} extremo N-terminal
23	Oligo 298	P- E ^{ms} +CM53637	<u>AACATGGTTTGGGGCACAGGCA</u> GCAAGTCCATACTGTAAAGTG	P-E ^{ms} extremo C-terminal
24	Oligo 299	CM53637	TTAATGCCCTCCCTGTCTCTACCACT	
25	Oligo 300	CM53637	AGGATGAGGATCTAGCAGTGGATCT	
26	Oligo 303	CM53637	CCATAGCCATCTGCTCAGACAGTA	
27	Oligo 92-1	CM53637	GGGGCTGTCAGAGGCATCCTCTAGTC	
28	Oligo 321	CM53637	AGCCACTACACCTGTCACGAGAAG	
29	Oligo 250	NADL	<u>CACCATGAAAATAGTGCCCAAAGAATC</u>	NADL-C extremo C-terminal
30	Oligo 252	NADL	<u>TTAAGCGTATGCTCCAAACCACGTC</u>	NADL-E ^{ms} extremo C-terminal

Se extrajo el plásmido que contiene el ADNc de longitud total de BVDV-

NADL de *dam- E. coli* K12 GM2163. El plásmido se metiló *in vitro* con *dam*-metiltransferasa y S-adenosilmetionina (New England Biolabs; Ipswich, MA). Se sintetizaron y clonaron dentro de un vector de clonación genes G-E^{rns}, R-E^{rns}, y P-E^{rns} (números de acceso de GenBank NC_003678, NC_003677, y
5 AY781152, respectivamente).

Para la construcción de ADN quimérico BVDV-NADL/G-E^{rns}, se amplificó un fragmento de BVDV-NADL que codifica para 5'UTR al extremo 3' del gen C mediante PCR a partir de plásmido metilado con cebadores Oligo B-5 y Oligo 127. El gen G-E^{rns} se amplificó por PCR a partir del ADN plasmídico que
10 contiene el gen G-E^{rns} con Oligo 128 y Oligo 129. Se amplificó un fragmento de BVDV que codifica para E1 al 3'UTR por PCR de plásmido metilado con Oligo 130 y Oligo 84. Los productos de PCR se purificaron de gel usando Kit de Extracción de Gel QIAquick (Qiagen; Valencia, CA). Los productos de PCR purificados se trataron con Dpn I y Exonucleasa 1 (New England Biolabs). Los
15 productos de PCR tratados se ensamblaron creando un genoma de BVDV-NADL/G-E^{rns} quimérico de longitud total por PCR usando Oligo B-5 y Oligo 84.

Para la construcción de ADN quimérico BVDV-NADL/G-E^{rns}, se amplificó un fragmento de BVDV-NADL que codifica para 5'UTR al extremo 3' del gen C mediante PCR a partir de plásmido metilado con cebadores Oligo B-5 y Oligo
20 131. El gen R-E^{rns} se amplificó por PCR a partir del plásmido que contiene gen R-E^{rns} con Oligo 132 y Oligo 133. Se amplificó un fragmento de BVDV que codifica para E1 al 3'UTR por PCR de plásmido metilado con Oligo 134 y Oligo 84. Los productos de PCR se purificaron de gel con Kit de Extracción de Gel QIAquick. Los productos de PCR purificados se trataron con Dpn I y
25 Exonucleasa 1. Los productos de PCR tratados se ensamblaron creando un

genoma de BVDV-NADL/R-E^{ms} quimérico de longitud total por PCR con Oligo B-5 y Oligo 84.

Para la construcción de ADN quimérico BVDV-NADL/G-E^{ms}, se amplificó un fragmento de BVDV-NADL que codifica para 5'UTR al extremo 3' del gen C mediante PCR a partir de plásmido metilado con cebadores Oligo B-5 y Oligo 135. El gen P-E^{ms} se amplificó por PCR a partir del ADN plasmídico que contiene el gen P-E^{ms} con Oligo 136 y Oligo 137. Se amplificó un fragmento de BVDV que codifica para E1 al 3'UTR por PCR de plásmido metilado con Oligo 138 y Oligo 84. Los productos de PCR se purificaron del gel con Kit de Extracción de Gel QIAquick. Los productos de PCR purificados se trataron con Dpn I y Exonucleasa 1. Los productos de PCR tratados se ensamblaron creando un genoma de BVDV-NADL/P-E^{ms} quimérico de longitud total por PCR con Oligo B-5 y Oligo 84.

Para la confirmación de secuencia de las regiones quiméricas de E^{ms}, se amplificó un fragmento que corresponde al 5' UTR para la región E1 de cada genoma quimérico de longitud total ensamblado por PCR usando Oligo B-5 y Oligo 175, y se secuenciaron y analizaron los productos de PCR.

Se generaron transcritos de ARN genómico viral de longitud total a partir de plásmidos que contienen el ADNc de longitud total de BVDV-NADL o el ADN de BVDV-NADL/E^{ms} quimérico usando kit mMessage mMachine T7 Ultra (Ambion; Austin, TX). La calidad y la cantidad de cada transcrito de ARN se determinó en un gel de ARN y en un espectrofotómetro de Nanodrop (Nanodrop; Wilmington, DE). Se transfectaron cultivos de toda una noche de células RD en pocillos de placas de 6 pocillos con ARN viral usando reactivo Lipofectina (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la

transfección, las células se incubaron a 37°C durante 3 días. Los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -80°C.

Los ARN virales de sobrenadantes recogidos se extrajeron usando Kit de Aislamiento de ARN Viral MagMax™ AI/ND (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARN se transcribieron inversamente y la región de cada quimera que codifica N^{pro} a E1 se amplificó usando cebadores Oligo 177 y Oligo 175 (Tabla 1), y el Sistema RT-PCR ThermoScript™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de RT-PCR se secuenciaron después.

Las monocapas de células de bien una transfección de ARN viral o bien una infección con virus se fijaron en acetona al 80%. Se usaron anticuerpos monoclonales específicos de BVDV o de BDV (Mab) en conjunción con el kit ABC Elite de IgG antirratón peroxidasa (Vector Laboratories; Burlingame, CA). El color se produjo usando sustrato de peroxidasa VIP (Vector Laboratories).

Las valoraciones de virus quiméricos se determinaron por un procedimiento de dilución limitante. Las muestras virales se diluyeron 10 veces en serie y se transfirieron a placas de 96 pocillos (100 µl por pocillo), con 4-6 replicados por dilución. Se añadieron después 100 µl de una suspensión de células BK-6 a cada pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 4-5 días. La infección viral se determinó tanto por efecto citopático (CPE) como por tinción con MAb. Las valoraciones de los virus se calcularon usando el procedimiento de Spearman-Kärbe.

Para obtener los clones biológicos de cada quimera, las muestras de virus se diluyeron primero 100 veces y se continuó por serie de diluciones de 10 veces. Se transfirieron 100 µl de los virus diluidos a cada pocillo de una

placa de 96 pocillos, 4 replicados por dilución. Se añadieron después 100 µl de células BK-6 a cada pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 4 días. Los sobrenadantes se recogieron y transfirieron a nuevas placas y se almacenaron a -80°C. Las células se fijaron y se tiñeron. Los sobrenadantes
5 de los pocillos que contenían focos de virus individuales se recogieron y se expandieron como reservas de virus.

Los estudios de cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en matraces T-25 que contienen células BK-6. Cuando las células alcanzaron aproximadamente confluencia al 90%, se infectaron con cada quimera a MOI
10 de 0,02. Después de absorción durante 1 hora, el inóculo se retiró. Las células se lavaron 3x con PBS, y se añadieron 3 ml de medio de crecimiento recién preparado. Las muestras se recogieron después en diversos puntos temporales de 0 a 144 horas para determinaciones de valoraciones.

Para la prueba de neutralización de virus, se diluyeron reservas
15 congeladas de tres quimeras de BVDV-NADL/E^{ms}, BVDV-NADL parental y BVDV-CM5960 (BVDV de tipo I) en DMEM a aproximadamente 4.000 TCID₅₀/ml. Se diluyeron dos veces en serie sueros de ganado vacuno inmunizado con Bovi-Shield Gold (Pfizer; Nueva York, NY), con valoraciones predeterminadas tanto contra BVDV de tipo I como contra BVDV de tipo II. Se
20 mezclaron 50 µl de virus (200 TCID₅₀) con un volumen igual de suero de ganado vacuno diluido en placas de cultivos de tejido de 96 pocillos (4 replicados/dilución) y se incubaron a 37°C durante 60 min. Se añadieron después 100 µl de células BK-6 a cada pocillo, y las placas se incubaron a 37°C durante 3-6 días. El suero negativo para anticuerpos contra BVDV se
25 incluyó también en cada placa como un control. Las valoraciones de

neutralización de punto final de los sueros se determinaron tanto por CPE como por inmunohistoquímica (IHC) en el día 3 y en el día 6.

Resultados. Se construyeron ADN de BVDV-NADL/E^{rns} quiméricos en los que el gen/la proteína NADL E^{rns} se reemplazó por E^{rns} de pestivirus de jirafa (G-E^{rns}), de reno (R-E^{rns}) o de antilope americano (P-E^{rns}). Se secuenció ADN plasmídico que contenía cada una de las regiones E^{rns} quiméricas para confirmar la autenticidad de secuencia. Se depositaron los siguientes pestivirus quiméricos con la American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, EE.U.U. en el 2 de abril de 2009, y se confirmó que era viable por ATCC® en el 23 de abril de 2009: BVDV-NADL/G-E^{rns} (PTA-9938), BVDV-NADL/P-E^{rns} (PTA-9939), y BVDV-NADL/R-E^{rns} (PTA-9940).

Los virus quiméricos BVDV-NADL/E^{rns} se recuperaron de las células RD después de transfección con ARN viral transcrito *in vitro*. Se observó efecto citopático de consideración (CPE) en células RD 48-72 horas después de transfección con transcritos de ARN BVDV-NADL/G-E^{rns} o BVDV-NADL/R-E^{rns}. CPE no fue obvio con el virus BVDV-NADL/P-E^{rns}, sin embargo. Se recogieron sobrenadantes de cultivo de cada pocillo, y las células que quedaron se fijaron y se tiñeron con anticuerpo MAb 20.10.6. específico de NS3 de BVDV. Las células infectadas con uno de los tres pestivirus quiméricos se incubaron con el MAb. Los ARN virales se extrajeron de los sobrenadantes recogidos, y se secuenciaron para confirmar los genes E^{rns} de todas las tres quimeras.

Las tres quimeras BVDV-NADL/E^{rns} se probaron por su reactividad para cada uno de los MAb de E^{rns} específicos para BVDV o BDV. Los resultados se muestran en Tabla 2. La quimera BVDV-NADL/R-E^{rns} se hizo reaccionar con

todos los tres MAb de E^{ms} de BVD, mientras que no se reconocieron ni BVDV-NADL/G-E^{ms}, ni BVDV-NADL/P-E^{ms} ni el virus parental BVDV-NADL por los MAb de E^{ms} de BVD. Se hicieron reaccionar BVDV-NADL/G-E^{ms}, BVDV-NADL/R-E^{ms}, y virus parental NADL con un MAb 15C5 de pan-BVDV E^{ms} MAb 15C5. Los MAb específicos bien para E^{ms} de BDV o bien para BVDV no reaccionaron con la quimera de BVDV-NADL/P-E^{ms}.

Tabla 2. Reactividad de quimeras BVDV-NADL/E^{ms} frente a los MAb

10	MAb	Especificidad	Reactividad de quimera			
			BVDV-NADL/G-E ^{ms}	BVDV-NADL/R-E ^{ms}	BVDV-NADL/P-E ^{ms}	BVDV-NADL
15	WS 371	BDV E ^{ms}	-	+++	-	-
	WS 373	BDV E ^{ms}	-	+++	-	-
	WS363	BDV E ^{ms}	-	+++	-	-
20	15C5	BVDV E ^{ms}	+++	+++	-	+++
	20.10.6	Pestivirus NS3	+++	+++	++	+++

25 Con el fin de determinar si las proteínas E^{ms} quiméricas en los virus tuvieron algún impacto en el reconocimiento de epitopes virales neutralizantes por anticuerpos de ganado vacuno vacunado contra BVDV, se llevó a cabo un ensayo de neutralización viral con las tres quimeras de BVDV-NADL/E^{ms},
30 BVDV-NADL, y BVDV-CM5960 (BVDV de tipo I). Se utilizaron los sueros de 4 vacas con valoraciones de anticuerpos neutralizantes que variaban desde 0 hasta mayores de 40.000 (previamente determinadas contra BVDV-CM5960).

Los resultados (Tabla 3) indican que las valoraciones frente a todas las tres quimeras fueron generalmente comparables a aquellas para BVDV-NADL parental y BVDV-CM5960. Las valoraciones de neutralización contra BVDV-NADL/P-E^{rns} fueron ligeramente menores que aquellas contra las otras dos quimeras, BVDV-NADL y BVDV-CM5960.

Tabla 3. Valoraciones de neutralización de antisueros bovinos contra quimeras de BVDV-NADL/E^{rns}

10	Ganado vacuno	Valoraciones de neutralización				
	N.º de Sueros	BVDV-NADL/G-E ^{rns}	BVDV-NADL/R-E ^{rns}	BVDV-NADL/P-E ^{rns}	BVDV-NADL	
	CM5960					
15	816	< 10	<10	<10	<10	
	77	320	320	320	160	
	1281	6400	12800	3200	3200	
	1434	51200	25600	6400	25600	

20 Las tres quimeras BVDV-NADL/E^{rns} se clonaron biológicamente dos veces por dilución limitante. Se obtuvieron tres clones de BVDV-NADL/G-E^{rns}, cuatro de BVDV-NADL/R-E^{rns}, y tres de BVDV-NADL/P-E^{rns}. Estos clones se expandieron cada uno entre 1-3 veces. Los resultados de valoración indicaron que el clon 1 de BVDV-NADL/G-E^{rns} expandido, los clones 3 y 5 de BVDV-NADL/R-E^{rns}, y el clon 2 de BVDV-NADL/P-E^{rns} 2 produjeron las valoraciones más altas.

Los estudios de cinéticas del crecimiento se llevaron a cabo con clon 1 de BVDV-NADL/G-E^{rns}, clon 3 de BVDV-NADL/R-E^{rns}, clon 2 de BVDV-NADL/P-E^{rns}, y BVDV-NADL/P-E^{rns} no clonado. Las curvas de crecimiento

generadas a partir de estos clones se compararon con el BVDV-NADL parental. Las quimeras BVDV-NADL/G-E^{ms} y BVDV-NADL/R-E^{ms} tuvieron cinéticas de crecimiento similares al BVDV-NADL parental, mientras que BVDV-NADL/P-E^{ms} crecieron más lentamente y tuvieron valoraciones menores en cada punto
5 temporal que el virus parental y las otras dos quimeras.

Se crearon tres virus quiméricos BVDV-NADL/E^{ms}, en los que el gen/la proteína NADL E^{ms} se reemplazó por E^{ms} de un pestivirus de jirafa, de reno o de antilope americano. Todas las tres quimeras fueron viables e infecciosas tanto en células RD como en células BK-6. Los datos *in vitro* demostraron que
10 las proteínas E^{ms} quiméricas no afectaron la neutralización de las quimeras por antisueros de ganado vacuno vacunado contra BVDV. Esto sugiere que los epitopes neutralizantes en los virus quiméricos, sin importar donde estén localizados, no estaban afectados por las sustituciones de E^{ms}.

Los virus quiméricos tuvieron cinéticas de crecimiento diferentes y
15 reaccionaron de forma diferente a anticuerpos monoclonales de E^{ms} de BVDV o de BDV. BVDV-NADL/G-E^{ms} y BVDV-NADL/R-E^{ms} tuvieron cinéticas de crecimientos similares al virus parental, mientras que BVDV-NADL/P-E^{ms} creció lentamente y a una valoración más baja que el virus parental. Tanto BVDV-NADL/G-E^{ms} como BVDV-NADL/R-E^{ms} reaccionaron frente a anticuerpo
20 monoclonal 15C5 de BVDV E^{ms}, mientras que BVDV-NADL/P-E^{ms} no lo hizo. Los resultados de comparación de secuencias mostraron que G-E^{ms} y R-E^{ms} tuvieron similitudes de secuencia más altas a BVDV NADL (el 75,8% y el 76,2%, respectivamente) que P-E^{ms} (el 59%). Estos datos, tomados conjuntamente con los resultados de reactividad de MAb, sugieren que G-E^{ms} y
25 R-E^{ms} pueden ser antigénicamente más similares al E^{ms} parental que al P-E^{ms}.

Ejemplo 2. Construcción y Caracterización Serológica y Realización de Pruebas de Eficacia de Candidatos a Vacunas de Pestivirus Quiméricos

Se obtuvieron la cepa de BVDV de tipo 1 CM5960 y la cepa de BVDV de tipo 2 CM53637 de Pfizer Global Manufacturing. Los ARN virales se extrajeron usando Kit de Aislamiento de ARN Viral MagMaxTM AI/ND (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARN se transcribieron de forma reversa generando ADNc usando Sistema de RT-PCR ThermoScriptTM (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generaron pestivirus quiméricos reemplazando el gen E^{ms} de CM5960 y de CM53637 con el gen E^{ms} de pestivirus de antílope americano (P-E^{ms}) usando un procedimiento de PCR solapante. Los cebadores oligonucleotídicos usados para las PCR se enumeran en la Tabla 1.

Para construcción de ADN de CM5960/P-E^{ms} quimérico, se amplificó un fragmento de ADNc de CM5960 entre el 5'UTR y el extremo 3' del gen C por PCR a partir de ADNc de CM5960 con cebadores Oligo B-5 y Oligo 135. El gen P-E^{ms} se amplificó por PCR a partir del ADN plasmídico que contiene el gen P-E^{ms} con Oligo 136 y Oligo 137. Se amplificó un tercer fragmento entre el comienzo de E1 y el extremo 3' de E2 por PCR a partir de ADNc de CM5960 con cebadores Oligo 138 y Oligo 237.

Los fragmentos anteriormente descritos se purificaron de gel usando un Kit de Extracción de Gel QIAquick (Qiagen), y se ensamblaron por PCR creando un fragmento con Oligo B-5 y Oligo 237. Se amplificó un fragmento entre la región E1 y la región NS5B por PCR a partir de los ADNc de CM5960 con cebadores Oligo P7 y Oligo P8. Se amplificó otro fragmento entre la región

NS5A y el extremo de 3'UTR por PCR a partir de los ADNc de CM5960 con cebadores Oligo P3 y Oligo 84. Estos tres fragmentos se purificaron en gel después, y se ensamblaron por PCR con Oligo B-5 y Oligo 84 creando un genoma de CM5960L/P-E^{ms} quimérico de longitud total.

5 Para construcción de ADN de CM53637/P-E^{ms} quimérico, se amplificó un fragmento de ADNc de CM53637 entre el 5'UTR y el extremo 3' del gen C por PCR a partir de ADNc de CM53637 con cebadores Oligo 296-1 y Oligo 297. Se amplificó un segundo fragmento entre el comienzo de E1 y el extremo 3' de E2 por PCR a partir de ADNc de CM53637 con cebadores Oligo 298 y Oligo
10 303. Estos dos fragmentos se purificaron en gel, y se ensamblaron conjuntamente con un fragmento que codifica para el gen P-E^{ms} (véase anteriormente), por PCR creando un fragmento usando Oligo 296-1 y Oligo 303.

Se amplificó después un fragmento entre la región E1 y la región NS3
15 por PCR a partir de ADNc de CM53637 con cebadores Oligo 298 y Oligo 299. Se amplificó además otro fragmento entre la región NS3 y el extremo de 3'UTR por PCR a partir de ADNc de CM53637 con cebadores Oligo 300 y Oligo 92-1. Estos dos fragmentos y el anterior se purificaron en gel, y se ensamblaron por PCR con Oligo 296-1 y Oligo 92-1 creando un genoma de CM53637/P-E^{ms}
20 quimérico de longitud total.

Se generaron transcritos de ARN genómico viral de longitud total a partir de los ADN de CM5960/P-E^{ms} quimérico y de CM53637/P-E^{ms} quimérico usando kit de mMessage mMachine T7 Ultra (Ambion). La calidad y la cantidad de cada transcrito de ARN se determinó en un gel de ARN. Se
25 transfetaron cultivos de toda una noche de células RD en pocillos de placas

de 6 pocillos con ARN viral usando reactivo Lipofectina (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la transfección, las células se incubaron a 37°C durante 3 días. Las células más los sobrenadantes se hicieron pasar una a varias veces en células RD y/o BK-6. Los sobrenadantes se hicieron pasar en serie en células BK-6. Los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -80°C.

Para confirmar la identidad del virus recombinante recuperado, los ARN virales de sobrenadantes recogidos se extrajeron usando Kit de Aislamiento de ARN Viral MagMax™ AI/ND (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARN se transcribieron de forma reversa usando Sistema de RT-PCR ThermoScript™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se amplificó la región de cada quimera entre 5' UTR y E2 o p7 por PCR usando cebadores Oligo B-5 y Oligo 237 (para quimera CM5960/P-E^{ms}) u Oligo 296-1 y Oligo 321 (para quimera CM53637/P-E^{ms}) (Tabla 1). Los productos de RT-PCR se secuenciaron después.

Las monocapas de células de bien una transfección de ARN viral o bien una infección con virus se fijaron en acetona al 80%. Se usaron MAb específicos para BVDV en conjunción con el kit ABC Elite de IgG antirratón peroxidasa (Vector Laboratories) para inmunohistoquímica. El color se produjo usando sustrato de peroxidasa VIP (Vector Laboratories).

Resultados. Se construyeron y recuperaron virus CM5960/P-E^{ms} y CM53637/P-E^{ms} quiméricos. Se confirmaron mediante secuenciación las regiones 5'UTR a E2, incluyendo las regiones de E^{ms} de antílope americano quiméricas. Ambas quimeras fueron viables e infecciosas tanto en células RD como en células BK-6. Ambas quimeras fueron no reactivas para MAb 15C5

específico de E^{ms} de BVDV, pero fueron reactivas para MAb 20.10.6 específico de NS3 de BVDV en tinción inmunohistoquímica.

La secuencia para el pestivirus quimérico (BVDV-CM5960 (BVDV de tipo I)/P-E^{ms}) se presenta en el listado de secuencias como SEQ ID N.º: 31. La
5 secuencia para el pestivirus quimérico (BVDV-CM53637 (BVDV de tipo II)/P-E^{ms}) se presenta en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 32.

La quimera CM5960/P-E^{ms} se clonó biológicamente por dilución limitada (véase anteriormente ejemplo 1 para metodología).

10 **Ejemplo 3. Realización de Pruebas de Eficacia de Candidatas a Vacuna de Pestivirus Quimérico en un Modelo de Enfermedad Respiratoria de Ternero**

Se obtienen partos saludables negativos en BVDV, se asignan al azar a grupos de estudio, y se mantienen bajo supervisión de un veterinario al cargo.
15 La vacuna de prueba se combina con un coadyuvante estéril y se administra bien por inoculación intramuscular (IM) o bien por inyección subcutánea (SC), o bien por inoculación intranasal (IN). La vacuna se da bien como una o bien como dos dosis. Se administran dos dosis de la vacuna, separadas 21 a 28 días. Los animales se ponen a prueba subsiguientemente a 21 a 28 días tras la
20 vacunación final con una cepa de Tipo 1 o de Tipo 2 de BVDV. Los inóculos de prueba se dan intranasalmente en una dosis dividida de 4 ml, 2 ml por narina. Se mantienen también durante todo el estudio grupos control constituidos por animales no vacunados, no puestos a prueba y/o animales no vacunados, puestos a prueba.

25 Se someten a seguimiento los parámetros clínicos diariamente,

incluyendo temperatura rectal, depresión, anorexia, y diarrea. Las valoraciones de neutralización sérica se determinan por un ensayo de virus constante, suero decreciente en cultivos de células bovinas, usando diluciones seriadas de sueros combinadas con una cepa de BVDV de tipo 1 o de tipo 2. Se intenta
5 aislamiento tras la prueba de BVDV en cultivo de células bovinas a partir de sangre periférica. Un cultivo celular positivo en BVDV se determina por inmunofluorescencia indirecta. Para demostrar protección tras la prueba, se demuestra una reducción en la incidencia de infección en grupos vacunados frente a los grupos control.

10

Ejemplo 4. Pruebas de Eficacia de la Vacuna de Pestivirus Quimérico en un Modelo de Vaca Preñada-Ternero

Se obtienen vacas y vaquillas en edad de crecimiento negativas en BVDV y se asignan al azar a un grupo de prueba de vacunación o a un grupo
15 de placebo (control). Las vacas se inoculan dos veces por inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC), bien con vacuna o bien con placebo, separadas 21 a 28 días. Tras la segunda vacunación, todas las vacas reciben una inyección de prostaglandinas IM sincronizando el estro. Las vacas que presentan estro se fecundaron mediante inseminación artificial con semen
20 negativo en BVDV certificado. A aproximadamente 60 días de la gestación, el estado de preñez de las vacas se determina por palpación rectal.

Aproximadamente 6 semanas más tarde, las vacas con embarazos confirmados se seleccionan al azar de cada grupo de prueba. Cada una de estas vacas se pone a prueba por inoculación intranasal de BVDV de tipo 1 ó 2.
25 Las muestras de sangre se recogen en el día de la prueba y a múltiples

intervalos posteriores a la prueba para propósitos de aislamiento de BVDV.

Veintiocho días tras la prueba, se llevan a cabo laparotomías del flanco izquierdo y se extrae fluido amniótico de cada vaca. Inmediatamente antes de la cirugía, se recoge una muestra de sangre de cada vaca para ensayos de neutralización de suero. Tras alumbramiento por cesárea, se recoge una muestra de sangre de cada feto. Los fetos se someten después a eutanasia, y los tejidos se recogen asépticamente para propósitos de aislamiento de BVDV. En casos donde tienen lugar abortos espontáneos, las muestras de sangre se toman de la madre cuando se detecta aborto y dos semanas después. Las muestras de sangre emparejadas y los fetos abortados se someten a realización de pruebas serológicas y a aislamiento vírico. La eficacia de la vacuna está demostrada por una carencia o disminución de infección fetal y por aborto tardío.

15 Ejemplo 5. Ensayos Diagnósticos para Diferenciación entre Ganado Vacuno Vacunado y Ganado Vacuno Infectado de forma Natural

El ganado vacuno vacunado con una vacuna de la presente invención puede compararse con ganado vacuno infectado de forma natural con un BVDV de tipo silvestre. Se vacuna ganado vacuno de diversas edades bien con una vacuna de pestivirus quimérico vivo o bien con una vacuna de pestivirus quimérico inactivado de acuerdo con las instrucciones proporcionadas. Se recogen muestras de suero 2-3 semanas o más tarde tras vacunación. Para diferenciar entre el ganado vacuno que recibió la vacuna de pestivirus quimérica frente a aquellos infectados por una cepa de campo (tipo silvestre) de BVDV, se prueban las muestras de suero por medio de un ensayo

de diagnóstico diferencial. El pestivirus quimérico provoca la producción de anticuerpos específicos que se unen a la proteína E^{ns} del pestivirus quimérico, pero no a la proteína E^{ns} presente en BVDV de tipo silvestre. En el contexto de BVDV de tipo silvestre, lo contrario es cierto. Se generan anticuerpos
5 específicos que reconocen la proteína E^{ns} presente en BVDV de tipo silvestre, pero no la proteína E^{ns} presente en el pestivirus quimérico. Se conocen bien en la técnica los procedimientos de realización de un ensayo para especificidad y afinidad de unión de anticuerpos, e incluyen pero no se limitan a formatos de inmunoensayo tales como ELISA ☐ competitivo, ELISA de péptidos directos,
10 pruebas de bandas de Western, ensayos de inmunofluorescencia indirecta, y similares.

Para un ELISA competitivo, se usan antígenos virales de pestivirus de tipo silvestre o quiméricos completos o parciales, incluyendo la proteína E^{ns} (derivada de forma natural, sintéticamente o recombinantemente), como una
15 fuente de antígenos. Tras revestimiento de la placa de ELISA con antígeno en condiciones básicas, se añaden las muestras y diluciones de suero de ganado vacuno conjuntamente con una dilución optimizada de un MAb específico bien para proteína E^{ns} del BVDV de tipo silvestre o bien para la proteína E^{ns} del pestivirus quimérico, y se incuban durante 30 -90 min. Bien la peroxidasa de
20 rábano picante o bien la fosfatasa alcalina está conjugada al MAb para permitir la detección colorimétrica de la unión. Tras el lavado de las placas, se añade un sustrato cromogénico específico de enzima, y después de una etapa e incubación final, la densidad óptica de cada pocillo se mide a una longitud de onda apropiada para el sustrato usado. El grado de inhibición de unión del mAb
25 marcado es dependiente del nivel de anticuerpos en el suero de ganado

vacuno que reconoce específicamente la proteína que reviste la placa.

En el caso de que la proteína E^{ms} quimérica (por ejemplo E^{ms} de antilope americano) presente en el pestivirus quimérico sea el antígeno de prueba, una falta de unión por el mAb específico de E^{ms} del pestivirus quimérico indica la presencia de anticuerpos en el suero de ganado vacuno que reconocen el pestivirus quimérico -epitope específico, indicativo de vacunación. En contraste, el suero de ganado vacuno no inmunizado, pero infectado de forma natural, no contendrá anticuerpos que se unan a la proteína E^{ms} de pestivirus quimérico que recubre la placa. Por lo tanto, el mAb específico de E^{ms} de pestivirus quimérico se unirá a la proteína unida, y dará como resultado formación de color subsiguiente.

En el caso de que la proteína E^{ms} presente en el BVDV de tipo silvestre sea el antígeno de prueba, una falta de unión por el mAb específico de E^{ms} de BVDV de tipo silvestre indica la presencia de anticuerpos en el suero de ganado vacuno que reconocen el epitope específico de BVDV de tipo silvestre, indicador de una infección natural (tipo silvestre). En contraste, el suero de ganado vacuno inmunizado con la vacuna de pestivirus quimérico no contendrá anticuerpos que se unan a la proteína E^{ms} de BVDV de tipo silvestre que recubre la placa. Por lo tanto, el mAb específico de E^{ms} de BVDV de tipo silvestre se unirá a la proteína unida, y dará como resultado formación de color subsiguiente.

Para el funcionamiento de un ensayo tal, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos.

Primero, se construyó un baculovirus recombinante que expresa BVDV-NADL E^{ms}. Se amplificaron una parte de la proteína C de BVDV, más el gen

E^{ns} de longitud total, por PCR a partir de un plásmido que contiene ADNc de BVDV-NADL de longitud total con cebadores Oligo 250 (SEQ ID N.º: 29; 5'-CACCATGAAAATAGTGCCCAAAGAATC-3') y Oligo 252 (SEQ ID N.º: 30; 5'-TTAAGCGTATGCTCCAAACCACGTC-3'). El producto de PCR se clonó en pENTRTM/D-TOPO (Invitrogen) y se transformó en *E. coli* Competente One Shot[®] (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se extrajo el plásmido recombinante y el inserto se confirmó por secuenciación. Este plásmido se designó pENTR-E^{ns}. Se usaron pENTR-E^{ns} y Sistema de Expresión de Baculovirus BaculoDirectTM (Invitrogen) construyendo el baculovirus recombinante que expresa BVDV-NADL E^{ns} de acuerdo con las instrucciones de fabricante. Se generó el baculovirus recombinante que expresa BVDV-NADL E^{ns}, se purificó en placa, se expandió, y se almacenó tanto a 4°C como a -80°C. La expresión de BVDV-NADL E^{ns} en el baculovirus recombinante se confirmó por tinción inmunofluorescente y por prueba de bandas de Western frente a MAb 15C5 específico de E^{ns} de BVDV tras procedimientos de prueba de bandas de Western convencionales.

Para la producción del antígeno de ELISA, las células SF21 en cultivo de suspensión de 100 ml se infectaron con 0,5 ml de la reserva de baculovirus recombinantes. Las células se recogieron después de incubación de 4 días a 27°C. Las células se centrifugaron a velocidad lenta (aproximadamente 800 g) durante 10 min para recoger las células y para lavarlas una vez con PBS. Las células se lisaron con NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM pH 8,0, e IGEPAL CA-630 al 1%. La mezcla se incubó primero en hielo durante 10 minutos y después a -80°C durante 1 hora. Después de descongelar, la mezcla se aclaró por centrifugación a 1000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se aclaró

adicionalmente por centrifuga a 8000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante final, designado lisado Baculo-E^{ms}, se alicuotó y se almacenó a -80°C.

Llevando a cabo el ensayo, las placas de ELISA se recubrieron durante
5 toda una noche a 4°C con 100 µl/pocillo de MAb WB210 (Veterinary Laboratory Agency; específico de E^{ms} de BVDV de tipo 1), diluido 1:1000 en tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,0). El día siguiente, las placas se lavaron tres veces y se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS que contiene sal sódica de caseína al 1% y Tween 20 al 0,05%) a 37°C durante 1 hora. Las placas se
10 lavaron subsiguientemente tres veces con tampón de bloqueo, y se añadieron 100 µl de lisado de Baculo-E^{ms} (diluido 1:3200 en PBS) a cada pocillo, y las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Tras tres lavados con tampón de bloqueo, se añadieron 100 µl de muestras de sueros de ganado vacuno no diluidas a los pocillos, salvo para una columna de pocillos (para servir como
15 controles de 15C5-HRP no competitivos), y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Tras tres lavados más con tampón de bloqueo, se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado MAb 15C5-HRP (específico de E^{ms} de BVDV, diluido 1:20.000 en tampón de bloqueo), y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Tras tres lavados con tampón de bloqueo, se añadieron a cada pocillo 100 µl
20 de sustrato ABTS (soluciones de sustrato de Peroxidasa A + B; KPL, EE.U.U.), y se incubaron a temperatura ambiente durante 20-60 minutos para formación de color. La densidad óptica (D.O.) se midió a la longitud de onda de 405 nm. El porcentaje de reducción de D.O. para cada muestra de suero se calcula por la siguiente fórmula:
25 [1 - (D.O. de Muestra ÷ D.O. Promedio de Controles de 15C5-HRP)] x 100%.

Resultados:

Todas las muestras de suero que dieron resultados positivos para la prueba de neutralización de virus (VN) tuvieron reducción de D.O. por encima del 82% ,
5 salvo la muestra de N.º de ID 13851 (Tabla 4). Todas las muestras de suero que dieron resultados negativos por la prueba de neutralización de virus tuvieron reducción de D.O. de menos del 17% , salvo la muestra de N.º de ID 5150 (Tabla 4). La discrepancia puede explicarse por las diferencias en como
10 se han llevado a cabo los ensayos, ya que están midiendo anticuerpos diferentes y la proporción de anticuerpos específicos varía entre animales.

Tabla 4. Muestras de suero positivas y negativas en BVDV en un ELISA competitivo de MAb15C5.

Número de Fila	ID de la Muestra	D.O. de la Muestra	D.O.	
			Promedio de Columna Sin Suero	% de Reducción
1	40021	0,0615	0,907013	93,21950182
2	40014	0,0965	0,907013	89,36068171
3	40422	0,0639	0,907013	92,95489701
4	40372	0,0754	0,907013	91,68699897
5	40222	0,0634	0,907013	93,01002301
6	40152	0,0894	0,907013	90,14347093
7	13461	0,0663	0,907013	92,6902922
8	13851	0,641	0,907013	29,32846607
9	13801	0,1599	0,907013	82,37070472
10	13904	0,073	0,907013	91,95160378

11	40504	0,0625	0,907013	93,10924981
12	40471	0,0914	0,907013	89,92296693
13	35037	0,0639	0,907013	92,95489701
14	13690	0,159	0,907013	82,46993152
15	13797	0,0859	0,907013	90,52935294
16	6127	0,0886	0,907013	90,23167253
17	5138	0,7434	0,907013	18,03866097
18	5139	0,8423	0,907013	7,13473787
19	5141	0,7732	0,907013	14,75315128
20	5142	0,7475	0,907013	17,58662776
21	5144	0,8293	0,907013	8,568013909
22	5145	0,9488	0,907013	-4,607100449
23	5146	0,9451	0,907013	-4,199168038
24	5147	1,0138	0,907013	-11,77348064
25	5148	0,9322	0,907013	-2,7769172
26	5149	0,9794	0,907013	-7,980811741
27	5150	0,1157	0,907013	87,24384325

Filas 1-16: Muestras de suero de ganado vacuno
positivas

Filas 17-27: Muestras de suero de ganado vacuno
negativas

- Todas las muestras de suero se usan sin diluir en
el ELISA

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle considerable con referencia a ciertas versiones de la misma, son posibles otras versiones. Por lo tanto, el alcance de las reivindicaciones adjuntas no debería limitarse a la descripción de las versiones contenidas en el presente documento.

5

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES:

5

1. Un pestivirus quimérico, en el que dicho pestivirus quimérico comprende un virus de la diarrea viral bovina que no expresa su proteína E^{ns} homóloga, adicionalmente en el que dicho pestivirus quimérico expresa una proteína E^{ns} heteróloga derivada de otro pestivirus, o una variante natural, sintética o genética de dicha proteína E^{ns} heteróloga.

10

2. El pestivirus quimérico de la reivindicación 1, en el que la proteína E^{ns} heteróloga de dicho pestivirus quimérico, o la variante natural, sintética o genética de dicha proteína E^{ns} heteróloga, se deriva de un pestivirus seleccionado del grupo constituido por un pestivirus de reno, un pestivirus de jirafa, y un pestivirus de antílope americano.

15

3. El pestivirus quimérico de la reivindicación 1, en el que la proteína E^{ns} heteróloga de dicho pestivirus quimérico tiene al menos un epítopo de E^{ns} que no está presente en el virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

4. El pestivirus quimérico de la reivindicación 1, en el que la proteína E^{ns} heteróloga de dicho pestivirus quimérico carece al menos de un epítopo de E^{ns} que está presente en el virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

20

5. Un cultivo del pestivirus quimérico de la reivindicación 1.

6. Una línea celular o una célula huésped que comprende el pestivirus

quimérico de la reivindicación 1.

7. Una molécula de polinucleótido que codifica para el pestivirus quimérico de la reivindicación 1.
8. Una composición inmunogénica que comprende el pestivirus quimérico de la reivindicación 1 y un vehículo veterinariamente aceptable.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, en la que el vehículo veterinariamente aceptable es un coadyuvante.
10. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, en la que dicho pestivirus quimérico está atenuado vivo.
11. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, en la que dicho pestivirus quimérico está inactivado.
12. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente uno o más antígenos adicionales útiles para tratar o evitar la dispersión de uno o más microorganismos patógenos adicionales en un bovino.
13. Una composición inmunogénica que comprende la molécula polinucleotídica de la reivindicación 7 y un vehículo veterinariamente aceptable.
14. Una vacuna que comprende el pestivirus quimérico de la reivindicación 1 y un vehículo veterinariamente aceptable.
15. La vacuna de la reivindicación 14, en la que el vehículo veterinariamente aceptable es un coadyuvante.
16. La vacuna de la reivindicación 14, en la que dicho pestivirus quimérico está atenuado vivo.
17. La vacuna de la reivindicación 14, en la que dicho pestivirus quimérico está

inactivado.

18. Una vacuna que comprende la molécula polinucleotídica de la reivindicación 7 y un vehículo veterinariamente aceptable.

19. La vacuna de la reivindicación 14, que comprende adicionalmente uno o
5 más antígenos adicionales útiles para tratar o evitar la dispersión de uno o más microorganismos patógenos adicionales en un bovino.

20. Un kit que comprende, en al menos un recipiente, la vacuna de la reivindicación 14.

21. Un procedimiento de tratar o evitar la dispersión de infección con virus de la
10 diarrea viral bovina, en el que la vacuna de la reivindicación 14 se administra a un animal.

22. Un procedimiento de vacunar un animal, en el que se administra una vacuna de pestivirus DIVA a dicho animal, y en el que dicha vacuna de pestivirus DIVA comprende el pestivirus quimérico de la reivindicación 1, adicionalmente en
15 el que dicho pestivirus quimérico tiene al menos un epítipo de E^{ms} que no está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

23. Un procedimiento de vacunar un animal, en el que se administra una vacuna de pestivirus DIVA a dicho animal, y en el que dicha vacuna de pestivirus DIVA comprende el pestivirus quimérico de la reivindicación 1, adicionalmente en
20 el que dicho pestivirus quimérico carece al menos de un epítipo de E^{ms} que está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

24. Un procedimiento de diferenciación entre un animal vacunado con la vacuna de la reivindicación 14 y un animal infectado con virus de la diarrea viral

bovina de tipo silvestre, en el que el animal vacunado con dicha vacuna genera anticuerpos para al menos un epítopo de E^{ms} que está presente en el pestivirus quimérico de dicha vacuna, pero que no está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 5 a) obtener una muestra sérica de los animales;
- b) someter a ensayos dichas muestras para la presencia o ausencia de los anticuerpos;
- c) identificar el animal que tiene dichos anticuerpos como que ha sido vacunado con dicha vacuna; y
- 10 d) identificar al animal que carece de dichos anticuerpos como que se ha infectado con el BVDV de tipo silvestre.

25. Un procedimiento de diferenciar entre un animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre y un animal vacunado con la vacuna de la reivindicación 14, en el que el animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre genera anticuerpos para al menos un epítopo de E^{ms} que está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, pero que no está presente en el pestivirus quimérico de dicha vacuna, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) obtener una muestra sérica de los animales;
- 20 b) someter a ensayos dichas muestras para la presencia o ausencia de los anticuerpos;
- c) identificar al animal que tiene dichos anticuerpos como que ha sido infectado con el BVDV de tipo silvestre; y

d) identificar al animal que carece de dichos anticuerpos como que ha sido vacunado con dicha vacuna.

26. Un kit diagnóstico para diferenciar entre un animal vacunado con una vacuna que comprende el pestivirus quimérico de la reivindicación 1 y un animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, comprendiendo dicho kit reactivos capaces de detectar al menos un epítipo de E^{ms} que está presente en el pestivirus quimérico de la vacuna, pero que no está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

27. Un kit diagnóstico para diferenciar entre un animal infectado con virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre y un animal vacunado con una vacuna que comprende el pestivirus quimérico de la reivindicación 1, dicho kit comprende reactivos capaces de detectar anticuerpos para al menos un epítipo de E^{ms} que está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, pero que no está presente en el pestivirus quimérico de la vacuna.

28. Un anticuerpo que reconoce un epítipo de E^{ms} que está presente en el pestivirus quimérico de la reivindicación 1, pero el cual epítipo no está presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre.

29. Un anticuerpo que reconoce un epítipo presente en virus de la diarrea viral bovina de tipo silvestre, pero el cual epítipo no está presente en el pestivirus quimérico de la reivindicación 1.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Luo, Yugang
Welch, Siao-Kun Wan
Yuan, Ying
Ankenbauer, Robert Gerard

<120> PESTIVIRUS QUIMÉRICOS

<130> PC33857A

<150> US 61/119,594

<151> 2008-12-03

<150> US 61/173,363

<151> 2009-04-28

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> T7 + NADL

<220>

<221> otras características

<223> Oligo B-5

<400> 1

gtggttaatac gactcactat agtatacgag aattagaaaa ggc

43

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Pestivirus

<220>

<221> otras características

<223> NADL

<220>

<221> gen

<222> (1)..(21)

<223> Oligo 84

<400> 2

gggggctgtt agaggtcttc c

21

<210> 3

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> G-Erns+NADL

<220>

<221> otras características

<223> Oligo 127

<223> Oligo 131

<400> 7

ggttccactg tggttatattc tctcccattg taacttgaaa caaaact

47

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

<213> Pestivirus

<220>

<221> otras características

<223> R-Erns

<220>

<221> gen

<222> (1)..(22)

<223> Oligo 132

<400> 8

gagaatataa cacagtggaa cc

22

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Pestivirus

<220>

<221> otras características

<223> R-Erns

<220>

<221> gen

<222> (1)..(22)

<223> Oligo 133

<400> 9

tgcattagct ccgaaccacg tt

22

<210> 10

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> R-Erns+NADL

<220>

<221> otras características

<223> Oligo 134

<400> 10

aacgtggttc ggagctaattg cagcttcccc ttactgtgat gtcg

44

<210> 11

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> P-Erns+NADL

87

<221> otras características
<223> NADL

<220>
<221> gen
<222> (1)..(23)
<223> Oligo 175

<400> 15
gttatcaata gtagccacag aat

23

<210> 16
<211> 22
<212> ADN
<213> Pestivirus

<220>
<221> otras características
<223> NADL

<220>
<221> gen
<222> (1)..(22)
<223> Oligo 177

<400> 16
tccaccctca atcgacgcta aa

22

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Pestivirus

<220>
<221> otras características
<223> CM5960

<220>
<221> gen
<222> (1)..(22)
<223> Oligo 237

<400> 17
ccctgaggcc ttctgttctg at

22

<210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Pestivirus

<220>
<221> otras características
<223> CM5960

<220>
<221> gen
<222> (1)..(23)
<223> Oligo P7

<400> 18
cacttgctcg aggtactact act

23

<210> 19

<210> 23
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> P-Erns+CM53637

<220>
<221> otras características
<223> Oligo 298

<400> 23
aacatgggtt ggggcacagg cagcaagtcc atactgtaaa gtg

43

<210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> Pestivirus

<220>
<221> otras características
<223> CM53637

<220>
<221> gen
<222> (1)..(27)
<223> Oligo 299

<400> 24
ttaatgccct ccctgtctct accacct

27

<210> 25
<211> 25
<212> ADN
<213> Pestivirus

<220>
<221> otras características
<223> CM53637

<220>
<221> gen
<222> (1)..(25)
<223> Oligo 300

<400> 25
aggatgagga tctagcagtg gatct

25

<210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> Pestivirus

<220>
<221> otras características
<223> CM53637

<220>
<221> gen
<222> (1)..(24)
<223> Oligo 303

<221> otras características
<223> Oligo 252

<400> 30
ttaagcgtat gtcctcaaacc acgtc 25

<210> 31
<211> 12307
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Erns chimeric virus

<220>
<221> otras características
<223> BVDV Tipo 1

<400> 31
gtatacgaga attagaaaag gctctcgtat acgtattggg caattaaaat aataattagg 60
cctaggggaac aaaagtcccc ctccagcgaag gccgaaaaga ggctagccat gcccttagta 120
ggactagcat aaagaggggg gtagcagcag tgggtgagttc gttggatggc ttaagccctg 180
agtacagggt agtcgtcagt ggttcgacgc cttggaataa aggtctcgag atgccacgtg 240
gacgagggca tgcccaaagc acatcttaac ctgagcgggg gtcgcccagg taaaagcagt 300
tctaaccgac tgttacgaat acagcctgat aggggtgctgc agaggccttc tgttctgcta 360
ctaaaaatct ctgctgtaca tggcacatgg agttgatcac aaatgaactt ttatacaaaa 420
cttacaaca aaaaccgctc aggggtggaag aacctgttta tgatcaggca ggtgatccct 480
tatttggtga aaggggagca gtccaccctc aatcgacgtt aaagctccca cacaagagag 540
gggaatgca tgtaccatc aacttggcat ctttaccaaa aaggggtgac tgcaggctcg 600
gtaatagcag aggacctgtg agcgggatct acttgaagcc agggccacta ttttaccagg 660
actataaggg tcccgtctat cacagggccc cgctggagct ctttgaagag ggaaccatgt 720
gtgaaacgac taaacggata gggagagtaa ctggaagtga cggaaagttg taccacatct 780
atgtgtgtat agatggatgt ataataataa aaagtgccac aagaagtcac caaagggtgc 840
ttaggtgggt ccataatagg cttaactgcc ctctatgggt cacaagttgc tcagacacga 900
aagaagaggg agcaacaaaa aagaaaacac agaaacccga cagactagag aaggggaaga 960
tgaaaatagt gccagagaa tccgaaaaag acagcaaac taaacctccg gatgctacaa 1020
tagtggtaga tggagttaaa taccaggtga agaagaaggg aaaaatcaag agtaagaaca 1080
ctcaggacgg cttgtaccat aacaaaaaca aaccgccgga atcacgtaag aaactggaaa 1140
aagcattgct ggcattggca ataataacta tagttttgtt tcaagttaca atgggagtga 1200
atataactca gtggaacctg gctgacgaag gcaccgaagg cgtacatagg gtcattgttg 1260
agagagggat aaatagaagt ttacatggca tatggcccca acagatatgc cacggaatcc 1320
caagctacaa cccaccaac agagagctct cgatgattgt cggaatgggt gatgcaagca 1380
ttagaacaaa ttatacctgc tgtaatctac agagacacga atggaacaaa catggctggt 1440
gcaattggta caacatcata ccatggatta aggtgatgaa ctacagccag aggaacctca 1500

ctgaaggcac	atatggcaaa	gagtgtgccg	taacgtgtag	gcacgacagc	atattagaca	1560
tcaatatagt	cactcaggcc	cgcaatcaac	ccacaatggt	aaccgggtgc	aaaataggaa	1620
agaacttttc	gttctcaggt	gaaattagag	aaaaaccatg	taattatgat	atccaaccag	1680
aggaaatact	acatttgcca	cacgaatgtg	gggagtggta	tagtgaaata	agccaccagg	1740
cggtcgacat	gataccta	gggttgagg	cctctagaaa	ttcagcagcc	aaagtcttga	1800
gttggatagg	gcgcaaattg	gaaaggatag	gaaagagagc	acaagcaaaa	tcaaaaacat	1860
ggtttggggc	acaggcagct	ccccctact	gtgatgtcga	tcgaaagatt	ggctacatat	1920
ggtatacaaa	aaattgtacc	cctgcctgct	tgcccaagaa	cacaaaaatt	gtcggccctg	1980
ggaagtttga	caccaacgca	gaggacggca	agatactaca	tgagatgggg	ggccacttgt	2040
cggaggtact	actactttct	ttagtgggtg	tgtccgactt	cgcaccggaa	acagccagcg	2100
caatgtacct	aatcctacat	ttttccatcc	cacaaagtca	cgttgacata	atggaatgtg	2160
ataagacca	gttgaacctc	acagtggagc	ttacaacagc	tgatgtaata	ccaggatcag	2220
tctggaacct	aggcaagtgg	gtatgtataa	gaccaaattg	gtggccttat	gagacaactg	2280
tggtgttggc	atttgaagag	gtgagccagg	tggtgaagtt	agtgttgagg	gcactcagag	2340
atttgacacg	catttggaac	gctgcaacaa	ctactgcttt	cttaatatgc	cttgtaaga	2400
tagtcagggg	ccagatggta	cagggcattc	tgtggctact	actgataaca	ggggtacaag	2460
gggacttgca	ttgcaaacct	gaattctcat	atgccatagc	aagggatgaa	agaattggtc	2520
aactgggggc	tgaaggcctt	actaccactt	ggaaggatta	ctgcctgaa	atgaaactgg	2580
aagacacaat	ggtcatagct	tggtgcaaag	atggtaagtt	tacgtacctc	ccaaggtgca	2640
cgagagaaac	cagatatctc	gcgatcttgc	atacaagggc	cttaccgacc	agtgtggtat	2700
tcaaaaaact	ttttgatggg	cgaaagcaag	aggatgtagt	cgaaatggac	gacaactttg	2760
aatttgact	ctgcccattg	gatgccaac	ccatagtaag	agggaaattc	aatacaacgc	2820
tgctgaacgg	accggccttc	cagatggtat	gccccatagg	atggacaggg	actgtaagct	2880
gtatgtcatt	caatatggac	accttagcca	caaccgtgat	acggacatat	agaaggtcca	2940
aaccattttc	tcataggcaa	ggctgtatca	cccaaaagac	tctgggggag	gatctccata	3000
actgcacct	cggaggaaat	tggacttggt	tgcttgga	cgtgctatta	tacaaagggg	3060
gctctattga	atcctgcaag	tggtgtggtt	atcaatttaa	agagagcgag	ggactaccac	3120
actaccccat	tggcaagtgt	agattagaga	atgagactgg	ttacagacta	gtagacgata	3180
cctcttgtaa	tagagaaggt	gtggccatag	taccacaagg	gacattacgg	tgcaagatag	3240
gaaaaactac	tatacaggtc	atagctatgg	ataccaaact	cgggcctatg	ccttgacagc	3300
catatgaaat	aatatcaagt	gaggggcctg	tagaaaggac	agcgtgtacc	ttcaactaca	3360
ctaaaacatt	aaaaaataag	tattttgagc	ccagagacag	ctacttccag	caatacatgc	3420
taaaaggaga	gtatcaatac	tggtttgacc	tggaggtaac	cgaccatcac	cgggattact	3480
ttgccgagtc	catattagtg	gtggtggtag	cctcctggg	tggcagatat	gtactttggt	3540
tactagttac	atacatggtc	ttatcagaac	agaaggcctc	agggactcag	tatggagcag	3600

gggaagtagt	gatgatgggc	aacttgctaa	cccataatga	cattgaagtg	gtgacatact	3660
tcttgctgtt	gtacctactg	ctgaggggaag	agagcgtaaa	gaagtgggtc	ttacttttat	3720
accacatctt	agtgtcacac	ccaatcaa	ctgtaactgt	gatcctattg	atgattgggg	3780
atgtggtaaa	ggcagactca	gggggccaag	ggtacttttg	gcaaatagac	ctctgtttta	3840
caatagttgt	actaatcatc	ataggtttta	tcatagccag	gcgtgacca	actatagtgc	3900
cactagtaac	aataatggca	gcactgaggg	tcactggatt	gacctaccag	cctggagttg	3960
acgtcgctat	ggcagtcatg	accataaccc	tactgatggg	tagctatgtg	acagattact	4020
ttagatataa	aagatgggta	cagtgcgttc	tcagcctggg	gtcaggggtg	ttcttgataa	4080
gaagccta	gcacctaggt	agaatagagg	tgccagaggt	aaccatccca	aactggagac	4140
cactaacttt	aatactgtta	tatttgatct	caacaaca	tgtaacaatg	tggaagggtg	4200
acatcgctgg	cttggtgttg	caatgcctgc	ctatcttatt	actggccaca	accttggtgg	4260
ccgacttctt	aacctcata	ctgatcctgc	ctacctatga	attgggttaa	ttatactacc	4320
tgaaaactgt	taggactgat	atagaaagaa	gttggccagg	ggggatagac	tgtacaagag	4380
ttgactccat	ctacgacatt	gatgagagtg	gagagggcgt	atatctcttt	ccatcaaggc	4440
agaaaggaca	gaggagcttt	tccatactct	tgccccttgt	caaagcaaca	ctgataagtt	4500
gcgtcagcag	taaatggcag	ctaataata	tgagttacct	aactttggac	tttatgtact	4560
acatgcacag	gaaagttata	gaagagatat	caggaggcac	caacatgata	tccagggttag	4620
tagcggcact	catagagctg	aactgggtcca	tggaagaaga	ggagagcaaa	ggcctaaaga	4680
agttttatct	attatctgga	agggttgagaa	acctaataat	aaaacataaa	gtaagaaatg	4740
agaccgtggc	ttcttggtac	ggggaggagg	aagtctacgg	tatgccaaag	atcatgacaa	4800
taatcaaggc	cagtacgctg	agtaagagca	agcactgcat	gatatgcact	gtatgtgaga	4860
gccgagagtg	gaaaggcggc	acctgcccaa	aatgtggacg	ccatgggaag	ccgataatgt	4920
gtgggatgtc	gctagcggat	tttgaagaaa	gacactataa	aagaatcttt	ataagggaag	4980
gtaactttga	gggtcctttc	aggcaagaat	acaatggcct	tgtacaatat	accgctaggg	5040
ggcaattact	tgtgagaaac	ttgcccgtag	tggaactaa	agtaaaaatg	ctcatggtag	5100
gcaaccttgg	agaagaaatt	ggtgatctgg	aacatcttgg	gtggatccta	agggggcctg	5160
ccgtgtgtaa	gaagatcaca	gagcacgaaa	aatgccacat	caatatactg	gataaactaa	5220
ctgcattttt	cgggatcatg	ccgaggggga	ctacaccag	agccccgggtg	aggttcccta	5280
cgagcttact	aaaagtgagg	aggggcctgg	agactggctg	ggcttacaca	caccaagggtg	5340
ggataagttc	agtcgaccat	gtaaccgccg	gaaaagacct	attgggtctgt	gacagcatgg	5400
gacggactag	agtgggtttg	caaagcaaca	acagggttgac	cgatgagaca	gaatatggcg	5460
tcaagactga	ctcaggatgc	ccagacgggtg	ccagatgtta	tgtgttaa	ccagagggctg	5520
tcaacatatc	aggatccaag	ggggcagtcg	tccacctcca	aaagacaggt	ggagaattca	5580
cgtgtgtcac	cgcacagggc	acaccggcct	ttttcgacct	aaaaaacttg	aaaggatggg	5640
caggattgcc	tatatcgaa	gcctccagcg	ggaggggtgg	tggcagagtc	aaagtaggga	5700

agaatgaaga	gtctaaacct	acaaaaataa	tgagtggaat	ccagaccgtc	tcaaagaaca	5760
cagcagatct	aactgagatg	gtcaagaaga	taaccagcat	gaacagggga	gacttcaagc	5820
agattacttt	ggcaacaggg	gcaggaaaaa	ccacagaact	cccaaaagca	gttatagagg	5880
aaataggaag	acacaagaga	gtattagttc	ttataccatt	aagggcagcg	gcagagtcag	5940
tttaccagta	tatgagatta	aaacacccaa	gcattctctt	taacctaaag	ataggggaca	6000
tgaaagaggg	ggacatggca	acggggataa	cctatgcata	atacgggtac	ttctgccaaa	6060
tgccccaacc	aaagctcaga	gctgctatgg	tagaatactc	atacatattc	ttagatgaat	6120
accattgtgc	cactcctgaa	caactggcaa	ttatcggaag	gatccacaga	ttttcagaga	6180
gtataagagt	cgtcgccatg	actgccacgc	cggcaggggc	ggtgaccaca	acaggtcaaa	6240
agcacccaat	agaggaattc	atagcccccg	aggtaatgaa	aggggaggat	cttggtagtc	6300
agttccttga	tatagcaggg	ttaaaaatac	cagtggatga	gatgaaaggt	aatatgttgg	6360
tttttgtacc	cacgagaaac	atggcagtag	aggtggcaaa	gaagctaaaa	gctaagggct	6420
ataattctgg	atactattac	agtggagagg	atccagccaa	tctgagagtt	gtaacatcgc	6480
agtctcccta	tgtaatcgtg	gccacaaatg	ctattgaatc	aggagtgaca	ctaccagatt	6540
tggacacggt	tgtagacacg	gggctgaaat	gtgaaaagag	ggtgagggta	tcatcaaaga	6600
tacccttcat	cgtaacaggt	cttaagagga	tggccgtgac	tgtgggtgag	caggctcagc	6660
gtaggggcag	agtaggtaga	atgaaacccg	ggagatatta	tagaagccag	gaaacagcaa	6720
ccgggtcaaa	ggactaccac	tatgacctct	tgcaggcaca	aagatacggg	attgaggatg	6780
gaatcaacgt	aacgaagtcc	tttagggaga	tgaattacga	ttggagccta	tacgaggagg	6840
acagcctact	aataaccag	ttggaaatac	taaataatct	actcatctca	gaagacttgc	6900
cagccgctgt	taagaatata	atggccagga	cagatcaccc	agagccaatc	caacttgcac	6960
acaacagcta	tgaagtccag	gtcccgggtc	tgttcccaaa	aataaggaat	ggagaagtca	7020
cagacaccta	cgaaaattac	tcgtttctaa	acgccagaaa	gttaggggag	gatgtaccgc	7080
tgtatatcta	tgccactgaa	gatgaggatc	tggcagttga	cctcttaggg	ctagactggc	7140
cagatcctgg	gaaccagcag	gtagtggaga	ctggcaaagc	actgaagcaa	gtgaccgggt	7200
tgtcctcggc	tgaaaatgcc	ctactagtgg	ctttatttgg	gtacgtaggt	tatcaggctc	7260
tctcaaagag	gcattgtcca	atgataacag	acatatatac	catcgaggac	cagagactag	7320
aagacaccac	ccacctccag	tatgcaccca	acgccataaa	aaccgaaggg	acagagactg	7380
aactgaaaga	actggcgctc	ggtgacgtgg	aaaaaatcat	gggagtcatt	tcagattatg	7440
cagccggggg	actggagttt	gtgaaatccc	aagcagaaaa	gataaaaaca	gcacctttgt	7500
ttaaagaaaa	cgtagaagct	gcaaaagggg	acgtccaaaa	attcattgac	tcattaattg	7560
aaaataaaga	tgcaataatc	agatatgggt	tgtgggggaa	acacactgca	ctatacaaaa	7620
gcatagctgc	aagactggga	cacgaaacag	cgtttgccac	actggtgtta	aaatggctag	7680
cttttgaggg	ggaatcagtg	ccagaccaca	tcaagcagac	ggcagttgat	ttagtggctc	7740
attatgtgat	gaataagcct	tccttcccag	gcgacaccga	aacacagcaa	gaagggaggc	7800

gattcgtcgc	tagcctgttc	atctccgcac	tggcaaccta	cacatacaaa	acttgggaatt	7860
accacaatct	ctctaaagtg	gtggaaccag	ccttggctta	cctcccctat	gctaccagcg	7920
cattaaaaat	gttcacccca	acgcggctag	agagcgtggt	gatactgagc	accacgatat	7980
acaaaacata	cctctccata	aggaagggga	agagtgatgg	attgctgggc	acggggatca	8040
gtgcagccat	ggaaatcctg	tcacaaaacc	cagtgtcggg	gggtatatct	gtgatgttgg	8100
gggtaggggc	cattgctgcg	cacaacgcta	ttgagtccag	tgaacagaaa	aggaccctac	8160
ttatgaaggt	gttcgtaaag	aacttcttgg	atcaggetgc	aacggatgag	ctggtaaaag	8220
aaaacccaga	gaaaattata	atggccttat	ttgaagcagt	ccagacaatt	ggtaaccccc	8280
tgagactaat	ataccacctg	tatgggggtt	actacaaagg	ttgggaggcc	aagggaactat	8340
ctgagaggac	agcaggcaga	aacttattca	cattgataat	gtttgaagcc	ttcgagttaa	8400
tagggatgga	ctcagaagga	aaaataagga	acctgtccgg	aaattacatc	ttggatctga	8460
tatacggcct	acacaagcag	atcaacagag	ggctgaagaa	aatagtactg	gggtgggctc	8520
ctgcaccctt	tagttgtgac	tggaccctta	gcgacgagag	gatcagattg	ccaacagaca	8580
actatttgag	ggtagaaacc	aggtgcccat	gtggttatga	gatgaaagcg	ttcaaaaatg	8640
taggtggcaa	gcttaccaaa	gtggaggaga	gcgggccttt	cctatgtaga	aacagacctg	8700
gtaggggacc	agtcaactac	agagtcacca	agtattacga	tgacaacctc	agagagataa	8760
aaccggtagc	aaagttggaa	ggacaggtgg	agcactacta	taaaggggtc	acagcaaaaa	8820
ttgactacag	taaaggaaaa	acgctcttgg	ctactgacaa	gtgggagggtg	gaacatgggtg	8880
tcattgaccag	gttagctaag	agatatactg	gggttgggtt	caatgggtgca	tacttaggtg	8940
atgagcccaa	tcaccgtgat	ctagtggaga	ggaactgtgc	gactataacc	aaaaacacag	9000
tacagtttct	aaaaatgaag	aaggggtgtg	cattcaccta	tgacctgacc	atctccaatc	9060
tgaccaggct	tattgaacta	gtacacagga	acaatcttga	agagaaggaa	atacccaccg	9120
ttacagtcac	tacatggcta	gcttacacct	tcgtgaatga	agacgtaggg	actataaaac	9180
cagtactagg	agagagggta	atccccgacc	ctgtagttag	tgtcaactta	caaccagagg	9240
tccaagtgga	tacatcagag	gtcgggatca	caataattgg	aagggaaacc	ctgatgacaa	9300
cgggggtgac	acctgtattg	gaaaaagtag	agcctgacgc	tagcaacaac	caaagctcag	9360
tgaagattgg	gttggataag	ggtaattacc	cagggcctgg	aatacagaca	catacactaa	9420
cagaagaaat	acacgacagg	gatgcaagac	ccttcatcat	gatcctgggc	tcaaagaatt	9480
ccatgtcaaa	tagggcaaag	actgctagaa	acataaatct	gtacacagga	aatgacccca	9540
gggaaataag	agacttgatg	gctgcagggc	gcatgttagt	agtagcactg	agggatgtcg	9600
accctgagct	ttctgaaatg	gtcgacttca	aggggacctt	ccttagatagg	gaggccctgg	9660
aggctctaag	tctcgggcaa	cctaaaccta	agcaggtcac	caaggcagct	attagggatt	9720
tgattgaaca	ggaaaaacag	gtggagatcc	ctaactgggt	tacatcagat	gaccacagtat	9780
ttttggaagt	ggccataaga	aatgataagt	actacttagt	aggagatgtt	ggagaggtaa	9840
aagatcaagc	taaaacactt	ggggccacgg	atcagacaag	aattgtaaag	gaggtaggct	9900

caaggacgta	taccatgaag	ctatctagtt	ggttcctcca	agcatcaaaa	aaacagataa	9960
gtttaactcc	actgtttgag	gaattgttgt	tacggtgccc	acctgcaact	aagagcaata	10020
aggggcacat	ggcatcagct	taccaattgg	cacagggtaa	ctgggagccc	ctcggttgcg	10080
gggtgcacct	aggtaccata	ccagctagaa	gggtgaagat	acacccatat	gaagcttacc	10140
tgaggttgaa	agatttttta	gaagaagaag	agaagaaacc	tagggttaag	gatacagtaa	10200
taagagagca	caacaaatgg	atacttaaaa	aaataagggt	tcaaggaaac	ctcaacacca	10260
agaaaatgct	caaccccg	aaactatctg	aacagttgga	caggagggg	cgaaaagga	10320
acatctacaa	ccaccagatt	ggtaccataa	tgtcaagtgc	aggcataagg	ctggagaaat	10380
tgccaatagt	aagggcccaa	accgacacta	aaacctttca	tgaggcaata	agagataaga	10440
tagacaagag	tgagaaccgg	caaaatccag	aattgcacaa	caaattgttg	gagatttttc	10500
acacaatagc	ccaacccg	ctgaaacaca	cttacggtga	ggtgacgtgg	gagcaacttg	10560
aggcagggat	aaataaaaaa	ggggcagcag	gctttctgga	gaagaagaac	atcggggaag	10620
tattggattc	agaaaaacac	ctggtggaac	aattggtcag	ggatctgaag	gccgggagaa	10680
agataaaata	ttatgaaact	gcaataccaa	aaaatgagaa	aagagatgtc	agcgatgact	10740
ggcaggcagg	ggacctggtg	gatgagaaga	ggccaagagt	tattcaatac	cctgaagcca	10800
agacaaggct	agccatcact	aaggctcatgt	ataactgggt	gaaacagcag	cccgttggtg	10860
ttccaggata	tgaaggaaag	acccctttgt	tcaacatctt	tgataaagtg	agaaaggaat	10920
gggacttggt	caatgagcca	gtggccgtaa	gttttgacac	caaagcctgg	gacacacaag	10980
tgactagtag	ggatctgcaa	cttatcggag	aaatccagaa	atattactat	aggaaggagt	11040
ggcacaagtt	cattgacacc	atcaccgacc	acatgacaga	agtgccagtt	ataacagcag	11100
atggtgaagt	atatataaga	aatgggcaga	gaggtagtgg	ccaaccagac	acaagtgcag	11160
gcaacagcat	gttaaattgtc	ctaacaatga	tgtacgcttt	ctgcgaaagc	acaggggtcc	11220
cgtacaagag	tttcaacagg	gtggcaagga	tccatgtctg	tggggatgat	ggcttcttaa	11280
taactgaaaa	agggttaggg	ctgaaatttg	ctaacaaagg	gatgcagatt	cttcacgaag	11340
caggcaaacc	tcagaagata	acggaagggg	aaaagatgaa	agttgcctat	agatttgagg	11400
acatagagtt	ctgttcccat	accccggtcc	ctgttaggtg	gtccgacaat	accagtagtc	11460
acatggccgg	gagagacacc	gctgtgatac	tatcaaagat	ggctacaaga	ttggattcaa	11520
atggagagag	gggtaccaca	gcatatgaaa	aagcggtagc	cttcagtttc	ttgctgatgt	11580
attcctggaa	cccgttggtt	aggaggattt	gcctgttggt	actttcgcaa	cagccagaga	11640
cagacccatc	caaacaggcc	acttattatt	acaaagggtga	tccaataggg	gcctataaaag	11700
atgtgatagg	tcggaatcta	agtgaactaa	agagaacagg	cttcgagaaa	ttggcaaatac	11760
taaacctaag	cctgtccaca	ttagggatct	ggactaagca	cacaagcaaa	agaataatta	11820
atgactgtgt	tgccattggg	aaagaagaag	gcaactggct	agttaacgcc	gacaggctga	11880
tatccagcaa	aactggccac	ttatacatat	ctgataaggg	ctttacatta	caaggaaagc	11940
attatgagca	actacagcta	agaacagaga	caaaaccggt	catgggggtc	gggactgaga	12000

gatacaagtt ggggccata gtcaatctgc tgctgagaag gttgaaagtt ctgctcatga	12060
cggccgctcg tgccagcagc tgagacaagt gtatatattg taaataaatt aacccatgta	12120
catattgtat ataaatatag ttgggatcgt ccacctcaag aagacgacac acccaacacg	12180
cacagctaaa cagtagttaa gattatctac ctcaagataa cactacattt aatgcacaca	12240
gcacttttagc tgtatgagga tacgcccagc gtctacagtt ggactaggga agacctctaa	12300
cagcccc	12307

<210> 32
 <211> 12663
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Virus quimérico Erns

<220>
 <221> otras características
 <223> BVDV Tipo 2

<400> 32	
gtatacgaga ttagctaaag tactcgtata cggattggac gtcaacaaat ttttttaatt	60
ggcaacgtag ggaactttcc cctcagcgaa ggccgaaaag aggctagcca tgcccttagt	120
aggactagca aaaatagggg actagcggta gcagtgaagt cattggatgg ccgaaccctt	180
gagtacaggg gagtcgtcaa tggttcgaca ctccattggg tgaggagtct cgagatgcca	240
tgtggacgag ggcatgccc cggcacatct taacctatgc ggggggttgca tgggtgaaag	300
cgctattcat ggcgttatgg acacagcctg ataggggtgta gcagagacct gctattccgc	360
tagtaaaaac tctgctgtac atggcacatg gagttgtttt caaatgaact tttatacaaa	420
acataaaac aaaaaccagc aggcgtcgtg gaacctgttt acgacgtcaa cgggcgtcca	480
ctgtttggag agagcagtga cttgcacccg cagtccacgc taaaactacc acaccaacga	540
ggtagtgcca acatcctgac caatgctagg tccctaccgc ggaaagggtga ctgccggaga	600
ggtaatgtgt atggagcggg gagtggcatc tatatcaagc caggaccgat ctactaccag	660
gattatgcgg agcctgtcta ccatagagcc ccattagaac tatgtaggga ggcaagtatg	720
tgcgaaacaa ctaggagagt tggcagagtg accggtagtg atgggaaatt atatcatatc	780
tacatctgca tagatgggtg tatcctcctg aagagggcga ctaggaatca accagaagtc	840
ctaaaatggg tatacaacag attagattgt cttttatggg tccactagctg ctccgatgaa	900
gggagtaaga gtgctacaag taagaagcag cctaagccag ataggataga aaaaggcaag	960
atgaaaatag ccccaaaga gacagaaaaa gattgcaaaa ccagaccccc cgacgcgact	1020
atagtagtag aaggggttaa gtaccaggtg aagaaaaaag gaaaggtaag gggaaaaaat	1080
actcaagatg ggttgatatc caacaagaat aagccccctg aatcaagaaa gaaattggaa	1140
aaggcactac tagcttgggc catcttggca gcggttctgc ttcagctggt aacaggagtg	1200
aatataactc agtggaaacct ggctgacgaa ggcaccgaag gcgtacatag ggtcatgttt	1260

gagagagggga	taaatagaag	tttacatggc	atatggcccc	aacagatatg	ccacggaatc	1320
ccaagctaca	accccaccaa	cagagagctc	tcgatgattg	tcggaatggg	tgatgcaagc	1380
attagaacaa	attatacctg	ctgtaatcta	cagagacacg	aatggaacaa	acatggctgg	1440
tgcaattggg	acaacatcat	accatggatt	aaggatgatga	actacagcca	gaggaacctc	1500
actgaaggca	catatggcaa	agagtgtgcc	gtaacgtgta	ggcacgacag	catattagac	1560
atcaatatag	tcactcaggc	ccgcaatcaa	cccacaatgt	taaccgggtg	caaaatagga	1620
aagaactttt	cgttctcagg	tgaaattaga	gaaaaacat	gtaattatga	tatccaacca	1680
gaggaaatac	tacatttgcc	acacgaatgt	ggggagtggg	atagtgaat	aagccaccag	1740
gcggctcgaca	tgatcactaa	tggttggag	gcctctagaa	attcagcagc	caaagtcttg	1800
agttggatag	ggcgcaaatt	ggaaaggata	ggaaagagag	cacaagcaaa	atcaaaaaca	1860
tggtttgggg	cacaggcagc	aagtcctac	tgtaaagtgg	agaggaagat	cggttacatc	1920
tggtatacaa	aaaactgcac	tccagcttgc	cttccaagaa	acactaaaat	aataggcccc	1980
gggaagtttg	ataccaacgc	cgaagatgga	aaaatactcc	atgagatggg	ggggcacctc	2040
tcagaatttg	tcctattgtc	tttgggtggt	ctgtctgact	ttgccccaga	aaccgcgagt	2100
gccatctact	tggttctaca	ttttgcgac	ccgcaaaacc	acgttgatgt	agacacatgc	2160
gacaagaacc	agctgaattt	aacggtcgca	actacagtag	cagaggctcat	accagggaca	2220
gtgtggaacc	tagggaagta	tgtctgcata	agaccagact	ggtggccata	tgagacgacg	2280
acagtcttcg	tcttagagga	agcagggcaa	gtaatcaaat	tggggctaag	ggccatcaga	2340
gacttaacta	ggatatggaa	tgctgccacc	accacagctt	tcctaattctt	tttagtgaaa	2400
gcactaaggg	gacaactaat	ccaagggcta	ttgtggctga	tgctaataac	aggagcacag	2460
ggtttccctg	aatgcaaaga	gggcttccaa	tatgccatat	ctaaagacag	aaaaatgggg	2520
ttactgggac	cagagagctt	aactacaaca	tggcacctcc	ccaccaaaaa	aatagtggac	2580
tccatggtaa	gtgtatggg	tgaaggaaaa	gacttaaaaa	tattaaaaac	gtgcacaaag	2640
gaagagaggt	acctagtggc	tgtgcacgag	agagccttat	caaccagtgc	cgaagtttatg	2700
cagatcagtg	atgggacaat	aggcccagac	gtgatagata	tgctgatga	ctttgagttt	2760
ggactctgcc	cttgtgactc	aaaaccagtg	ataaagggca	aatttaatgc	cagcttactg	2820
aatggaccag	ctttccagat	ggtatgccc	caggggtgga	ctggtacagt	agaatgcacc	2880
ctagtgaacc	aagacacctt	ggacacaact	gtcattagga	catatagaag	aactaccca	2940
tttcagcggg	gaaaatggg	tacctatgaa	aaaataatag	gggaagatat	ccatgaatgc	3000
attctaggtg	gaaactggac	atgcataacc	ggtggccaca	gcgggttgaa	agacggacct	3060
atcaagaagt	gtaagtggg	tggtatgac	ttcgtcaact	cagagggact	accacactac	3120
ccaataggca	agtgcattg	catcaatgag	agtgggtaca	ggtatgtaga	tgacacctct	3180
tgcatagagg	gtgggtgagc	catagttcca	actggcaccg	taaagtgtag	aataggtaac	3240
gtcacgggtg	aagttatcgc	tactaacaat	gatctgggac	ccatgccttg	cagcccagct	3300
gaagtgatag	caagtgaagg	accagtggaa	aagactgcat	gcacattcaa	ctattcaagg	3360

actctaccta	ataagtatta	tgagccaagg	gaccggtact	tccaacaata	catgttaaaa	3420
gggggggtggc	aatattgggt	cgacctggat	tctgtagacc	accacaaaga	ctactttctca	3480
gagttcataa	tcatagcagt	ggtcgcccttg	ttgggtggta	agtacgtact	atggctcttg	3540
ataacataca	caatactgtc	tgagcagatg	gctatgggcg	ctggagtgag	tactgaagag	3600
atagtcatga	taggcaactt	gctgacacac	agtgatattg	aggttgtggg	ctatttcctt	3660
cttctgtact	taatagttaa	agaggaactg	gtgaggaaat	gggttatact	ggtataccac	3720
atccttgtag	ctaaccctat	gaaaacaact	ggggtcatct	tactaatgct	agggggagtg	3780
gtgaaggcca	gcagaatcaa	tgctgatgac	caaagtgcta	tggacccatg	ctttcttctc	3840
gtgacagggtg	tagtggtctg	tttgatgac	gctagaagag	aacctgccac	cttaccactg	3900
attgtagcat	tgctagcaat	aagaacatca	ggattcctac	tgtccgctag	cattgatgta	3960
actgtagcag	tagtattaat	tgtacttttg	ctggctagct	acgtaacaga	ctactttaga	4020
tataaaaagt	ggcttcaatt	ctcatttagt	ctgatagctg	gtatctttat	tataaggagc	4080
ttgaaacata	tcaaccagat	ggaggtacca	gaaatatcta	tgccaaagtg	gagacctcta	4140
gctcttgtct	tcttctatat	aacatctaca	gcaataacca	ctaattggga	cattgactta	4200
gcaggcttcc	tgctgcaatg	ggcgccagca	gtgatcatga	tggctaccat	gtgggcagac	4260
tttttgactc	tgatcatagt	cctgcccagt	tacgagttat	ctaagcttta	cttcctaaag	4320
aacgtcagga	cagacgtgga	aaagaactgg	ctcggaagg	tgaatacag	acagatcagt	4380
tcagtttatg	acatctgtga	cagtgaggaa	gcagtgtacc	tatttccatc	aaggcataag	4440
agtggaagca	ggccagatth	catattacc	tttttgaaag	ccgtgttaat	aagctgcac	4500
agcagccaat	ggcaaaggt	ttacatttct	tacctaatc	tggaaatcac	atactatatg	4560
cacaggaaaa	tcatagatga	ggtgtcagga	ggagcaaatt	ttctatcaag	acttatagca	4620
gccatcatag	aattaaattg	ggccatagat	gatgaggaat	gtaaagggt	gaagaaactg	4680
tatctcttgt	caggagaggt	gaagaattta	atagttaaac	ataaggtaag	aaatgaagcc	4740
gtccacagat	ggtttgggtga	ggaggaaata	tatggggcac	ccaagggtgat	caccatcata	4800
aaagctagta	ccctaagtaa	aaacaggcac	tgcataatct	gcacgatctg	tgaagggaaa	4860
gaatggaacg	gagccaactg	cccaaagtgt	ggaagacaag	gaaagcccat	aacatgtgga	4920
atgacactcg	cagactttga	ggagaaacat	tacaaaaaga	tatttataag	agaaggacgc	4980
caagaagcaa	tgaatacgat	gatgtgcagc	cgatgccagg	gaaagcatag	gaggtttgaa	5040
acggaccggg	aacctaaag	tgccagatac	tgtgctgagt	gtaataggct	gcatectgct	5100
gaggaagggtg	acttttgggc	agagtcaagc	atgttggggc	tcaaaatcac	ctactttgcg	5160
ctgatggatg	gaaagggtga	tgatatcaca	gagtgggctg	gatgccagcg	tgtgggaatc	5220
tccccagata	cccacagagt	cccttgtcac	atctcatttg	gttcacggat	gccaggcacc	5280
agtgggcggc	agagagctac	tccagatgcc	cctcctgctg	accttcagga	tttcttgagc	5340
cggatctttc	aagtacccc	aggccagatg	tccagggaag	agtataagg	ttacgtccaa	5400
tacacagcca	gaggacaact	ctttctgagg	aacctgccaa	ttctagcgac	gaagatgaag	5460

ctattaatgg	tggggaacct	cggcgcagaa	gttggcgacc	tggaacatct	aggatgggta	5520
ctgagagggc	cagccgtgtg	caaaaaaatt	accaaccatg	agaagtgcc	cgtaaacatc	5580
atggataagc	taactgcatt	ttttggaatc	atgcctagag	gcacaacccc	tagggcacct	5640
gtgaggttcc	ccacagcact	attgaaagtg	agaagggggc	tagagacggg	atgggcttac	5700
acacaccaag	gagggatcag	ctcggtagac	catgtcacag	cgggaaagga	tttactggtg	5760
tgtgacagta	tgggcaggac	cagggttgtc	tgtcatagta	acaataagat	gactgacgag	5820
actgagtatg	gcatcaagac	cgactcaggg	tgccccgaag	gcgcgagggtg	ttacgtgcta	5880
aaccacagaag	ctgttaacat	ttctggcaca	aaaggagcta	tggtacacct	ccagaaaact	5940
gggggggagt	tcacatgtgt	cactgcctca	gggaccccgg	ctttcttcga	tctaaaaaat	6000
ctaaaaggct	ggtccgggct	gccaatTTTT	gaagcatcca	gtggcaggggt	ggttggtagg	6060
gtgaaagtcg	gcaagaatga	ggattccaag	cccaccaaac	taatgagcgg	aatccagaca	6120
gtgtctaaga	gccagacgga	cctagcggac	atcgtaaaga	aattgactag	tatgaacaga	6180
ggagagttca	aacagataac	attagccact	ggggcaggaa	aaactacgga	actgccaaagg	6240
tcggttatag	aggagatagg	gaggcacaaa	agggctcttag	tcctgatacc	attgagagcg	6300
gcagcagagt	cagtgtatca	gtatatgaga	gtgaagtacc	caagtatatc	tttcaatttg	6360
agaataggag	atatgaagga	aggtgatatg	gccaccggta	tcacttacgc	ctcatatggg	6420
tacttttgtc	agcttcctca	gccc aaactg	agagctgcc	tggtagagta	ttcatatata	6480
ttcttagatg	agtaccactg	tgctacaccc	gagcaattag	caataattgg	aaagatacac	6540
aggtttgctg	aaaatcttag	agtggtagca	atgacagcaa	ccccagctgg	aacggtcaca	6600
acgactggtc	agaaacaccc	tatagaggag	ttcatagccc	cagagggtgat	gaagggtgaa	6660
gatctaggta	gtgaataactt	ggatattgca	gggttgaaga	taccgactga	agagatgaaa	6720
ggcaacatgc	tcgtgttcgt	gccaaactagg	aacatggcag	tagaaacagc	taagaaattg	6780
aaggcaaaag	ggtacaactc	cggatactat	tacagtgggg	agaaccacga	aaacttgagg	6840
gtggtgacct	cacaatcccc	gtatgtggta	gtagccacca	atgccataga	gtcagggtgtg	6900
acattaccag	acttagacac	agttgtagac	actggactaa	aatgtgagaa	gaggggtgagg	6960
atatcttcaa	aaatgccctt	cattgtaaca	ggacttaaga	gaatggcagt	cacaatagga	7020
gagcaagccc	agcgcagggg	gagagtagga	agagtcaagc	caggtaggta	ctataggagt	7080
caagaaacag	cttcagggtc	aaaagattac	cattacgacc	tactacaagc	ccagagggtac	7140
ggaatagaag	atggaattaa	tgtaacaaag	tcattcaggg	agatgaacta	tgattggagc	7200
ctttatgaag	aggacagctt	gatgataact	caactcgagg	tccttaacaa	cctccttata	7260
tcagaagacc	tgctgcccgc	agtgaagaac	atcatggccc	ggaccgatca	cccagaaccc	7320
atacaactgg	cctataacag	ttatgaaaac	caagttccag	tgctgttccc	aaagatcaaa	7380
aatgggtgagg	tgacagacag	ttatgagaat	tacacatacc	tcaatgcaag	aaaactagga	7440
gaggacgtgc	cggcgtatgt	gtacgccacg	gaggatgagg	atctagcagt	ggatcttctg	7500
ggtatggatt	ggccggaccc	aggcaaccaa	caggtggtag	agacagggag	ggcattaaag	7560

caagtaactg gcttatccac agcagaaaat gccctcttga tagccttatt cggttacgtc	7620
gggtaccaga cgctttcaaa aaggcacata cccatgatta ctgacatcta tacacttgaa	7680
gaccacagac ttgaggacac aaccacctc cagtttgccc caaacgctat aaggaccgac	7740
ggcaaggact cagagttgaa agaattagct gtgggagacc ttgataaata tgtggacgca	7800
ctggtagact actccaaaca agggatgaaa tttatcaaag tccaagctga aaaggtcaga	7860
gactcccagt ctacaaagga aggcttgcaa aatattaagg agtatgtgga taagtttata	7920
caatcactaa cagagaataa ggaggagatc atcaggatg gactatgggg agttcacaca	7980
gcactctaca aaagcttggc agcgagactg gggcatgaaa cagcttttgc aacttttagtg	8040
gtaaaatggc tggcttttgg gggcgaaacg gtatctgctc acatcaagca agtagcagtt	8100
gatctagtag tatactatat catcaacaaa ccctccttcc ctggagatac agagacccaa	8160
caagagggga ggaggtttgt ggctagtctt tttatatctg cactagcaac atacacatat	8220
aaaacctgga attacaacaa tctgcaacgg gttgtcgaa ctgccttagc ttacctccca	8280
tatgctacaa gtgccttgaa gttgttcgca cccacaagat tagagagtgt ggtcactctc	8340
agttctacaa tttacaagac atacctctct ataagggaagg gtaagagcga cggcttgtta	8400
ggtacaggca taagtgcagc catggagatc ctaaaccaaa acccaatctc agtaggtata	8460
tctgtgatgc tgggggtagg tgccatcgcc gcccataatg caatagaatc tagtgaacag	8520
aaaagaactt tgctgatgaa ggtcttttga aaaaattttt tggaccaagc agcgacagat	8580
gagctagtca aagagaaccc tgaaaaata atcatggctc tatttgaagc agtccagacc	8640
ataggaaacc ccctaagact catctaccat ctgtacgggg tgtactataa ggggtgggaa	8700
gcaaaagaac tcgcagagaa aactgctggc cgcaacttat tcacattgat tatgtttgaa	8760
gcctttgagc ttttaggtat ggactcagaa ggaaagataa gaaacttgctc aggcaactac	8820
atactggact taatcttcaa tttgcataat aaattaaaca agggctctca aaaactagtc	8880
cttgggtggg ctccagcacc tttcagctgt gattggacac caagtgatga gaggataagc	8940
ttaccccata acaactactt aagggtagaa accaggtgtc cttgtggcta tgagatgaag	9000
gcaataaaaa atgttgctgg taaattgaca aaagttgaag aaaaggggccc ctctctatgc	9060
aggaatagat tagggagagg acctccaaac ttcaaagtaa caaagttcta tgatgatgac	9120
ttgaaagaag tcaagccagt agctaggcta gaaggccagg tggacctcta ttacaaggga	9180
gtaacagcaa agttagacta caacaatggg aaagtactgt tagctaccaa caagtgggag	9240
gtggaccacg ctttcttgac cagattagta aagaagcaca cagggatagg ttttaaagggt	9300
gcatatttgg gtgacagacc agaccatcaa gatcttgtcg atagagattg tgcaactata	9360
acgaagaact cagtacagtt cctaaaaatg aagaaagggt gcgctttcac atatgacctc	9420
acaatctcta accttgtcag gcttattgaa ctagtccata agaacaattt acaagaaaga	9480
gagatcccca ccgtgacagt aactacttgg cttgcatatt cttttgtcaa tgaagacctg	9540
gggactatca agcctgtatt gggggagaaa gtcacccag aaccccccca ggagttgagt	9600
ctccaacca ctgtgggact agtcaccact gagacagcaa taaccataac aggggaggct	9660

gaagtgatga	cgacagggat	cacaccagtg	gtagagatga	aagaagaacc	tcagctggac	9720
caccagtcaa	ctaccctaaa	ggtaggggta	aaggaagggg	aatatccagg	gccaggagtt	9780
aaccctaacc	atttagtaga	ggtgatagat	gagaaagatg	acaggccttt	tgtcctaatt	9840
atcggtaca	aaggttctac	ctcgaacaga	gcaagaacgg	ccaagaatat	acggctgtac	9900
aaaggaaaca	acccaagaga	gatcagggat	ctgatgagcc	aaggaagaat	attaacggtt	9960
gctctaaaag	agttggaccc	ggaattaaaa	gaattagtag	attacaaggg	gacctttctc	10020
aataggaag	ctttagaagc	cctaagctta	ggtaagccaa	ttaagaggaa	aaccacagca	10080
gcaatgatca	ggaggttaat	agagccagag	ggtgaggagg	aactaccaga	ttggttccaa	10140
gcggaagaac	ccctatTTTT	ggaagcaaaa	atacagaatg	acttatacca	cctaattggc	10200
agtgttgata	gtataaaaag	caaagcaaag	gaattagggg	ccacagataa	cacaaagata	10260
gtgaaggaag	tcggggctag	gacctatacg	atgaaattga	gtagctggag	cacacaagtt	10320
actaaaaaac	agatgagttt	agccccctctc	tttgaagagc	tgttattaaa	gtgccctcca	10380
tgtagtaaaa	tttcaaaggg	acatatgggtg	tcagcatacc	aactggctca	aggaaactgg	10440
gaaccctcg	ggtgtggggg	ctatatggga	accataccag	ctaggcgtct	caagatccac	10500
ccttatgagg	cttaccttaa	actcaaagag	ctgctggaag	ttgaatcttc	gaggatcacc	10560
gcaaaagaat	ccatcataag	agaacataac	acctggattc	tgcggaaggt	gagacatgag	10620
gggaacctaa	gaactaaatc	aatgattaac	cctgggaaaa	tatcagatca	gctatgcaga	10680
gacggacaca	aaagaaacat	atataataag	atcataggct	caacaatggc	ctctgctggt	10740
attaggctgg	agaaactgcc	agtagtccga	gccc aaactg	acacaaccag	tttccaccaa	10800
gccataagag	aaaaaattga	taaaccagaa	aacaagcaga	ccctgaatt	gcatgaagaa	10860
ctaatgaagg	ttttcgactg	cttaaagatc	ccagagctga	aggaatcgta	tgatgaagtt	10920
tcattgggaac	aattagaagc	aggaataaac	cgtaaggggtg	cagcaggtta	tctagagagt	10980
aagaacatag	gggaagtgct	agacacagag	aaacacatag	tagagcagct	gatcaaggat	11040
ctgaggaagg	ggaagaagat	taagtactat	gaaacagcca	ttccaagaa	tgagaagaga	11100
gacgtcagcg	acgactggga	agccggagac	ttcgttgatg	aaaagaaacc	aagagtaatc	11160
cagtaccctg	acgccaaggt	gagactggca	attacaaaaa	tgatgtacaa	atgggtaaag	11220
caaaaaccag	tggtgatacc	cggtatgaa	ggaaaaacac	cactatttga	catattcaac	11280
aaagtgaaga	aggaatggga	ttcattccag	gaccccgtag	cagtgaagctt	tgacaccaa	11340
gcgtgggata	cacaagtcac	cagtagagac	ctaatgttga	taagggatat	ccagaaatat	11400
tatttcaaga	gaagtacaca	caaattttta	gatacaataa	cagaacacat	ggtagaagta	11460
cctgtcatta	cagcagacgg	tgaagtttac	ataaggaatg	gtcagagggg	tagtggccaa	11520
cccacacaa	gtgctggtaa	tagtatgttg	aatgtcctaa	ccatgatata	tgctttctgt	11580
aaaagtacag	gcatacctta	caggggatcc	agcagagtgg	caagaatcca	tgtgtgtggt	11640
gatgatggct	ttctgataac	agaaagagga	ctggggctga	aattctctga	gaagggtatg	11700
cagatattac	atgaggccgg	gaagccccag	aaaataactg	aaggggacag	aatgaaagtg	11760

gcatacacat	ttgaggacat	cgagttttgt	tccatacac	cgtaccagt	cagatgggca	11820
gataacacca	gtagttacat	ggcagggagg	agcacagcca	ctatactagc	taagatggca	11880
accaggttgg	attccagcgg	agagaggggt	agcacagctt	atgagaaggc	cgtagccttc	11940
agcttccttt	tgatgtactc	atggaatccc	gtagttagaa	ggatctgctt	actggtgttg	12000
tcacagtttc	cagaaatata	cccatccaaa	aacacaatat	actactacca	aggggatccc	12060
atagctgcgt	acagagaagt	gataggtaaa	cagctgtgtg	aactgaaaag	aacaggattt	12120
gagaagctgg	ctgggtctgaa	tttgagtatg	accactctag	gcctctggac	aaaacattct	12180
agtaaaagac	taatccaaga	ctgtgtagag	ataggtaaga	gagaaggtaa	ctggttagtt	12240
aatgctgaca	gactgattgc	aggaaagact	gggaagtttt	acatcccaag	cactgggtgc	12300
actctgttgg	gaaaacatta	tgaggaaatt	aacttaaagc	aaaaggcggc	acaaccgccg	12360
atagaggggg	ttgacagata	taagttgggc	cccatagtta	atgtaatctt	gagaaggctg	12420
aggggtgatgc	tgatgacagt	tgccagcgga	agctggtaaa	tccgtccgga	gcctcgtgcc	12480
ctcgtcaag	gttttaattg	taaatattgt	aaatagacag	ctaagatatt	tattgtagtt	12540
ggatagtaat	gtagtgatag	tagatacccc	aatttaacac	tacctccaat	gcactaagca	12600
ctttagctgt	gtgagggtta	ctcgacgtcc	acggttggac	tagaggatgc	ctctgacagc	12660
ccc						12663



A global bioscience nonprofit organization dedicated to biological standards and biodiversity

IP, Licensing and Services
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 USA
Telephone: (800) 638-6597
Facsimile: (703) 334-2932
Internet: <http://www.atcc.org>

**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Pfizer Inc.
Kendall W. King
7000 Portage Road
Kalamazoo, MI 49001

Deposited on Behalf of: Pfizer Inc.

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: April 02, 2009

<u>Identification Reference by Depositor:</u>	<u>ATCC ®Patent Deposit Designation:</u>	
Recombinant pestivirus (Flaviviridae-pestivirus -Bovine Viral diarrhea virus)	UC 25547	PTA-9938
Recombinant pestivirus (Flaviviridae-pestivirus -Bovine Viral diarrhea virus)	UC 25548	PTA-9939
Recombinant pestivirus (Flaviviridae-pestivirus -Bovine Viral diarrhea virus)	UC 25549	PTA-9940

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and



A global bioscience nonprofit
organization dedicated to biological
standards and biodiversity

IP, Licensing and Services
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 USA
Telephone: (800) 638-6597
Facsimile: (703) 334-2932
Internet: <http://www.atcc.org>

they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.

The deposit was tested April 23, 2009 and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Latha Ramakrishnan
Digitally signed by Latha Ramakrishnan
DN: cn=Latha Ramakrishnan, o=ATCC,
ou=IP Licensing and Services,
email=lramakrishnan@atcc.org, c=US
Date: 2009.04.23 14:28:49 -04'00'

April 23, 2009

Date

ATCC® Patent Depository

cc: Martha Gammill
Ref: Docket or Case No. PC33857

9

PC33857

1/1

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.204 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-2	International Application No.	PCT/IB2009/055291
0-3	Applicant's or agent's file reference	PC33857

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	paragraph number	12
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	ATCC American Type Culture Collection
1-3-2	Address of depositary institution	10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
1-3-3	Date of deposit	23 April 2009 (23.04.2009)
1-3-4	Accession Number	ATCC PTA-9938/ PTA-9939/ PTA-9940
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designations

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	



A global bioscience nonprofit
organization dedicated to biological
standards and biodiversity

IP, Licensing and Services
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 USA
Telephone: (800) 638-6597
Facsimile: (703) 334-2932
Internet: <http://www.atcc.org>

**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Pfizer Inc.
Kendall W. King
7000 Portage Road
Kalamazoo, MI 49001

Deposited on Behalf of: **Pfizer Inc.**

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: **April 02, 2009**

Identification Reference by Depositor:

ATCC®Patent Deposit Designation:

Recombinant pestivirus (Flaviviridae-pestivirus -Bovine Viral diarrhea virus)	UC 25547	PTA-9938
Recombinant pestivirus (Flaviviridae-pestivirus -Bovine Viral diarrhea virus)	UC 25548	PTA-9939
Recombinant pestivirus (Flaviviridae-pestivirus -Bovine Viral diarrhea virus)	UC 25549	PTA-9940

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and

Doc ID: 20127
Revision: 1
Effective Date: 11/06/2008

98



A global bioscience nonprofit
organization dedicated to biological
standards and biodiversity

IP, Licensing and Services
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 USA
Telephone: (800) 638-6597
Facsimile: (703) 334-2932
Internet: <http://www.atcc.org>

they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.

The deposit was tested **April 23, 2009** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Latha Ramakrishnan

Digitally signed by Latha Ramakrishnan
DN: cn=Latha Ramakrishnan, o=ATCC,
ou=IP, Licensing and Services,
email=lramakrishnan@atcc.org, c=US
Date: 2009.04.23 14:28:45 -04'00'

April 23, 2009

ATCC® Patent Depository

Date

cc: Martha Gammill
Ref: Docket or Case No. PC33857

99

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/IB2009/055291

International filing date (day/month/year)
23.11.2009

Priority date (day/month/year)
03.12.2008

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C12N7/04 C07K14/18 C12N15/86 A61K39/12 C07K16/10 G01N33/50

Applicant
PFIZER INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

2
£

Authorized Officer

Chambonnet, F

Telephone No. +31 70 340-2897



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/IB2009/055291

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2009/055291

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>2-4 8-25</u>
	No: Claims	<u>1 5-7 26-29</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-29</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-29</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial
applicability; citations and explanations supporting such statement**

V.1. Reference is made to the following documents:

- D1: RONECKER S, ZIMMER G, HERRLER G, GREISER-WILKE I, GRUMMER B.: "Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains." J GEN VIROL., vol. 89, no. 9, September 2008 (2008-09), pages 2114-2121, XP002569579
- D2: VAN GENNIP <A> H G P ET AL: "Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E<RNS> or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 4-5, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 447-459, XP004218115 ISSN: 0264-410X
- D3: DONG XN, CHEN YH.: "Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines." VET MICROBIOL., vol. 125, no. 1-2, 13 May 2007 (2007-05-13), - 15 November 2007 (2007-11-15) pages 150-156, XP002569580
- D4: BEER M, REIMANN I, HOFFMANN B, DEPNER K.: "Novel marker vaccines against classical swine fever." VACCINE., vol. 25, no. 30, 4 January 2007 (2007-01-04), - 26 July 2007 (2007-07-26) pages 5665-5670, XP002569581
- D5: DE SMIT A J ET AL: "Chimeric (marker) C-strain viruses induce clinical protection against virulent classical swine fever virus (CSFV) and reduce transmission of CSFV between vaccinated pigs" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 11-12, 8 December 2001 (2001-12-08), pages 1467-1476, XP004313961 ISSN: 0264-410X
- D6: US-A-6 001 613 (DONIS RUBEN O [US] ET AL) 14 December 1999 (1999-12-14)
- D7: GRIPSHOVER E.M. ET AL.: "variation in erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine diarrhoea virus" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 125, 2007, pages 11-21, XP002569582
- D8: GREGO E, USLENGHI F, STRASSER M, LUZZAGO C, FRIGERIO M, PELETTI S, ROSATI S.: "Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine viral diarrhoea antibody based on Erns glycoprotein expressed in a baculovirus system." J VET DIAGN INVEST., vol. 19, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 21-27, XP002569583
- D9: REIMANN I ET AL: "An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against

lethal infection with classical swine fever virus" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 322, no. 1, 25 April 2004 (2004-04-25), pages 143-157, XP004500339 ISSN: 0042-6822

D10: VILCEK S ET AL: "Pestiviruses in wild animals" VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 116, no. 1-3, 25 August 2006 (2006-08-25), pages 1-12, XP024935730 ISSN: 0378-1135 [retrieved on 2006-08-25] cited in the application

V.2. Teachings from the prior art

Document D1 studies the role of BVDV glycoproteins E^{ms}, E1 and E2 in viral entry using VSV- pseudotyped viruses. Complementation of a recombinant vesicular stomatitis virus (VSV) with BVDV glycoproteins resulted in infectious pseudotyped viruses. To elucidate the specific role of each of the single envelope glycoproteins during viral entry, pseudotypes were generated bearing the BVDV envelope proteins in different combinations. Pseudoviruses that contained E1 and E2 but not E^{ms} were infectious, indicating that E^{ms} is dispensable for virus entry. VSV/BVDV pseudotypes with chimeric proteins (the ectodomain of the BVDV glycoprotein and the transmembrane domain of the VSV-G protein) were not infectious. Figure 1 shows the construction of recombinant glycoproteins, in particular chimeric E^{ms}, with the signal peptide of VSV-G sequence. E^{ms}-specific mAb BVD/C12 is used (see page 2115, col 1 last paragraph). Infectious delta-G-VSV-E1-E2, delta-G-VSV-E^{ms}-E1-E2 and delta-G-VSV E^{ms}-MAT-E1-E2 were generated and constitute chimeric pestiviruses comprising BVDV which does not express its homologous E^{ms} protein (delta-G-VSV-E1-E2) and further wherein said chimeric pestivirus expresses a heterologous synthetic respectively E^{ms} with the signal peptide of VSV-G (delta-G-VSV-E^{ms}-E1-E2) and E^{ms}-MAT protein further comprising the membrane anchor (MA) and cytoplasmatic tail (T) of the VSV-G (delta-G-VSV-E^{ms}-MAT-E1-E2).

Document D2 concerns chimeric pestiviruses for vaccination of pig against Classical Swine Fever Virus (CSFV). Discriminated vaccines (DIVA) or marker vaccines are disclosed. Chimeric CSFV/BVDV wherein the CSFV strain C antigenic region E2 and/or the complete E^{ms} are replaced by the analogous sequence of BVDV are studied.

Document D3 reviews CSF vaccines disclosed in **documents D2 and D4 to D5**. D3 also cites BVDV vectors (§ 3.1.4.). BVDV/CSFV and BVDV/BDV chimeric vaccine strains have been constructed based on BVDV strain CP7 avirulent for pigs. In the two

chimeric strains, the entire E2 coding region of strain CP7 is replaced by that of CSFV strain Alfort (CP7-E2Alf) or BDV (Border Disease Virus) strain Gifhorn (CP7-E2Gif).

D6 teaches the engineering of BVDV vectors for vaccine development (see col 1, lines 65-67), and indicates that reverse genetics approaches using an infectious molecular clone of the BVDV genome may contribute to the development of rationally-designed safe and efficacious vaccines (col 1, l 48-50). D6 discloses explicitly the construction of an infectious molecular clone of BVDV, its subsequent modification to introduce a sequence tagged site and the production of a chimeric virus expressing a surface glycoprotein from a different strain, manipulating the BVDV genome *in vitro* and its potential effectiveness for reverse genetic analyses of pestivirus are described hereinafter (see col 1, l 52-58, claims 11, 12). The engineered vectors may be useful for the development of attenuated or avirulent virus strains for use as live vaccines, the addition of foreign sequences encoding proteins of immunological interest, such as proteins from other viruses, the development of marker vaccines with a characteristic deletion which allows the discrimination between vaccinated and infected animals by retrospective serological tests; the development of sequence-tagged BVDV vaccines and the creation of suitable chimeric viruses (col 2, l 39-63). The exemplified tag is the substitution of WT E2/gp53 with sequences from Singer strain (col 9). Interspecies chimeras with other pestivirus are mentioned (col 12, l 35) but the substitution/deletion of E^{ms} is not suggested.

D7 and D8 relate to ELISA detection of anti-BVDV antibodies based on baculovirus-produced E^{ms}.

D9 discloses a chimeric BVDV pestivirus wherein after deletion of E2 the analogous part of CSFV was inserted and its use as marker vaccine against CSF in pigs.

D10 reviews pestiviruses in wild animals.

V.3. Novelty

The document D1 discloses (the references in parentheses applying to this document) chimeric pestiviruses comprising BVDV which does not express its homologous E^{ms} protein, and wherein said chimeric pestivirus expresses a heterologous synthetic

respectively E^{ms} (see Figure 1, and page 2115, left-hand column, 4th paragraph and page 2116, right-hand column, 2d paragraph).

Hence the the subject-matter of independent claims 1, 5 to 7 is known.

The document D1 discloses the E^{ms}-specific mAb BDV/C12 (see page 2115, left-hand column, last paragraph and page 2116, right-hand column, 2d paragraph).
The document D2 discloses E^{ms}-ELISA that specifically detect CSFV E^{ms} and BVDV E^{ms} for discriminating between the infection with a WT pestivirus and vaccination with a chimeric pestivirus comprising as marker an heterologous E^{ms} in place of the homologous sequence (see from page 452, right-hand column, paragraph 3.3. to page 453, left-hand column, second paragraph and tables 1 and 3). Document D4 discloses also serological detection specific for E^{ms} from CSFV (see table 1) as well as document D5 (see 2.5.3., Tables 1, 2b and 3).

Hence the subject-matter of independent claims 26 to 29 is known.

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of independent claims 1, 5 to 7, 26 to 29 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

The subject-matter of claims 2 to 4 and 8 to 24 appears novel over the available prior art (Article 33(1) PCT)

V.4. Inventive step

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1 to 29 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT for the following reasons.

The **document D6** is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 2, and discloses (the references in parentheses applying to this document) chimeric BVDV viruses useful as marker vaccines against BVDV which allows the discrimination between vaccinated and infected animal by retrospective serological tests, for example a chimeric virus expressing a surface glycoprotein from a different

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2009/055291

strain, in particular interspecies chimeras with other pestivirus are mentioned (col 12, l 35). The example provides a chimeric BVDV pestivirus which does not express its homologous E2 protein but expresses a heterologous **E2** protein which carry epitopes present in the Singer strain.

The subject-matter of claims 2 to 4 therefore differs from this known chimeric BVDV pestivirus in that said chimeric pestivirus **expresses a heterologous E^{ms} protein** with at least one E^{ms} epitope different from the BVDV homologous E^{ms} protein.

The technical effect is that there is high antibody titers induced against (heterologous) E^{ms}, that allow to discriminate between cattle vaccinated with the chimeric BVDV and animals infected with wild type BVDV, without impairing the efficiency of the live vaccine, because on one hand E^{ms} is dispensable for BVDV entry and on the other hand antibodies against E^{ms} have a limited virus neutralizing activity.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing an efficient live marker vaccine for controlling the spread of BVDV.

The solution proposed in dependent claims 2 to 4 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons :

The general solutions of claims 2 to 4 consist in chimeric BVDV viruses **expressing a heterologous E^{ms} protein** with at least one E^{ms} epitope different from the BVDV homologous E^{ms} protein, in particular replacing the E^{ms} of a vaccine BVDV strain with the E^{ms} gene from a pestivirus selected from the group of giraffe pestivirus (G-E^{ms}), reindeer pestivirus (R-E^{ms}) or pronghorn antelope pestivirus (P-E^{ms}).

However, these features have already been employed for the same purpose in a similar **chimeric pestivirus which does not express its homologous E^{ms} protein and expresses a heterologous E^{ms} protein derived from another pestivirus** for the purpose of vaccinating efficiently animals against the backbone pestivirus and allowing the use of heterologous E^{ms} as marker determinant to discriminate between vaccinated and naturally infected animals (see document D2, page 5667, paragraph 2.4.). It would be obvious to the person skilled in the art, namely when the same result is to be achieved, to apply these features with corresponding effect to a chimeric pestivirus which comprises a BVDV according to document D6, thereby arriving at a chimeric

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2009/055291

pestivirus which comprises a BVDV which does not express its homologous E^{ms} protein and expresses a heterologous E^{ms} protein derived from another pestivirus wherein at least one E^{ms} epitope is different from the original BVDV one.

The same reasoning applies, *mutatis mutandis*, to the subject-matter of the corresponding independent claims 8, 13, 14, 20-24 are also considered not inventive.

Dependent claims 9 to 13, 15 to 17 and 25 do not contain features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of inventive step, see documents D2 to D9 and the corresponding passages cited in the search report.

V.5. Patentability :

Claims 21, 22 and 23 relate to methods for treatment of the animal body.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VIII : Clarity, support and disclosure

Claim 2 relates to a chimeric pestivirus which comprises a BVDV which does not express its homologous E^{ms} protein and expresses a heterologous E^{ms} protein derived from another pestivirus selected from the group of a reindeer pestivirus, a giraffe pestivirus or a pronghorn antelope pestivirus.

In the light of document D10, cited by the applicant, it appears that at the time of the invention only one known reindeer pestivirus (BDV-2), one known giraffe pestivirus (giraffe genotype) and one known pronghorn antelope pestivirus (pronghorn genotype) were disclosed.

Hence claim 2 is only supported (Article 6 PCT) for chimeric pestivirus which comprises a BVDV which does not express its homologous E^{ms} protein and expresses a

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2009/055291

heterologous E^{ms} protein derived from another pestivirus selected from the group of the reindeer BDV-2 pestivirus, the giraffe genotype pestivirus or the pronghorn antelope genotype pestivirus.

Moreover, the underlying application only discloses (Article 5 PCT) the construction of chimeric pestiviruses replacing the E^{ms} of the vaccine BVDV-NADL strain with the G-E^{ms} gene from the giraffe pestivirus, the R-E^{ms} from the reindeer pestivirus and P-E^{ms} pronghorn antelope pestivirus. The underlying application does not provide any concrete data concerning the vaccine efficacy and the diagnostic assays showing the presence of antibodies to at least one E^{ms} epitope which is present in the chimeric pestivirus of said vaccine but which is not present in wild-type Bovine Viral Diarrhea Virus. Therefore claims 8 to 27 are not supported (Article 6 PCT) on their whole scope by an enabling description (Article 5 PCT).

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC33857	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2009/055291	International filing date (day/month/year) 23/11/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 03/12/2008
Applicant PFIZER INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. 1.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS WITH A MODIFIED ERNS PROTEIN

5. With regard to the abstract,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB2009/055291

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☒ on paper

☒ in electronic form
 - b. (time)

☒ in the international application as filed

☒ together with the international application in electronic form

☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB2009/055291

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of Item 5 of the first sheet)

The present invention relates to chimeric pestiviruses having utility as immunogenic compositions and vaccines wherein said chimeric pestivirus comprises a bovine viral diarrhea virus which does not express its homologous Erns protein, further wherein said chimeric pestivirus expresses a heterologous Erns protein derived from another pestivirus, or a natural, synthetic or genetic variant of said heterologous Erns protein. Also described herein are methods and kits for treating or preventing the spread of bovine viral diarrhea virus infection, as well as methods and kits for differentiating between vaccinated and wild-type infected animals.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N7/04 C07K14/18 C12N15/86 A61K39/12 C07K16/10
G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RONECKER S, ZIMMER G, HERRLER G, GREISER-WILKE I, GRUMMER B.: "Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains." J GEN VIROL., vol. 89, no. 9, September 2008 (2008-09), pages 2114-2121, XP002569579 the whole document ----- -/--	1,5-7, 26,28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2010

Date of mailing of the international search report

17/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN GENNIP H. G. P. ET AL: "Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E<RNS> or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 4-5, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 447-459, XP004218115 ISSN: 0264-410X	26-29
Y	the whole document	1-29
X	DONG XN, CHEN YH.: "Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines." VACCINE, vol. 25, no. 2, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 205-230, XP002569580	26-29
Y	paragraph [3.1.4.] - paragraph [3.2.2.] paragraph [02.3]	1-29
X	BEER M, REIMANN I, HOFFMANN B, DEPNER K.: "Novel marker vaccines against classical swine fever." VACCINE., vol. 25, no. 30, 4 January 2007 (2007-01-04), pages 5665-5670, XP002569581 4th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, Oslo, 25-29 June 2006	26-29
Y	paragraph [2.4.]; figures 1,2; table 1 paragraph [0003] - paragraph [0004]	1-29
X	DE SMIT A J ET AL: "Chimeric (marker) C-strain viruses induce clinical protection against virulent classical swine fever virus (CSFV) and reduce transmission of CSFV between vaccinated pigs" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 11-12, 8 December 2001 (2001-12-08), pages 1467-1476, XP004313961 ISSN: 0264-410X	26-29
Y	the whole document	1-29
----- -/--		

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 001 613 A (DONIS RUBEN O [US] ET AL) 14 December 1999 (1999-12-14) column 1, line 45 - line 58; claims 1,8-13,21 column 2, line 51 - line 57 column 12, line 21 - line 44 -----	1-29
X	GRIPSHOVER E.M. ET AL.: "variation in Erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine diarrhoea virus" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 125, 2007, pages 11-21, XP002569582 the whole document -----	26,27
X	GREGO E, USLENGHI F, STRASSER M, LUZZAGO C, FRIGERIO M, PELETTI S, ROSATI S.: "Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine viral diarrhoea antibody based on Erns glycoprotein expressed in a baculovirus system." J VET DIAGN INVEST., vol. 19, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 21-27, XP002569583 the whole document -----	27,29
A	REIMANN I ET AL: "An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 322, no. 1, 25 April 2004 (2004-04-25), pages 143-157, XP004500339 ISSN: 0042-6822 the whole document -----	1
A	VILCEK S ET AL: "Pestiviruses in wild animals" VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 116, no. 1-3, 25 August 2006 (2006-08-25), pages 1-12, XP024935730 ISSN: 0378-1135 [retrieved on 2006-08-25] cited in the application the whole document ----- -/--	2

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEHRLE F, RENZULLO S, FAUST A, BEER M, KADEN V, HOFMANN MA.: "Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines." J GEN VIROL., vol. 88, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 2247-2258, XP002569584 the whole document	1
A	US 6 015 795 A (VAN DEN HURK JAN [CA] ET AL) 18 January 2000 (2000-01-18) the whole document	1

117

PC1/182009/055291

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6001613	A	14-12-1999	NONE	
US 6015795	A	18-01-2000	NONE	

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 11-068897 - -00000-0000	ES
---	---	-----------

PATENTE DE INVENCION ☐

M.

Fecha: 2011-06-02 16:53:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 118

10

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
Pfizer INC.

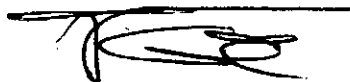
REFERENCIA	Radicación No.	11 068897
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/055291
	Fecha inicio fase nacional	03/07/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

E 1 2422

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

11 AGO. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11