



Libertad y Orden

BT

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATENTE DE INVENCION



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

06. 7814

TITULO. VACUNAS SEGURAS PARA VIRUS MUTANTES

VACUNAS VIRALES SEGURAS QUE CONTIENEN AL MENOS
DOS VIRUS MUTANTES DE LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE
Y METODOS PARA SU PREPARACION folio 50

SOLICITANTE PFIZER PRODUCTS INC

DIRECCIÓN Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, E.U.A.

APODERADO CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, Enero 27 de 2006

P2006/000013

SS

OLARTE RAISBECK


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Supervisión y Control
Radicación: 06007414. 00000000 Folios: 45
Fecha (ANI): 2006-01-27 16:24:25
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

28-02-2006

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II. Ver folio #49

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC

Dirección: Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE
Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

3

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/024011

Fecha Julio 26, 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/021034

Fecha Marzo 10, 2005

4

Título (54) VACUNAS SEGURAS PARA VIRUS MUTANTES Ver folio #50

Clasificación Internacional (51) A61K 39/12, A61K 39/15, 39/187

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Julio 29, 2003

(31) Número de Solicitud

60/490,834

5

Comprobante de pago No. 06-5,273

Fecha Enero 25, 2006

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.

☐

Documento de cesión del Inventor al solicitante o a su causante.

☐

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.

☐

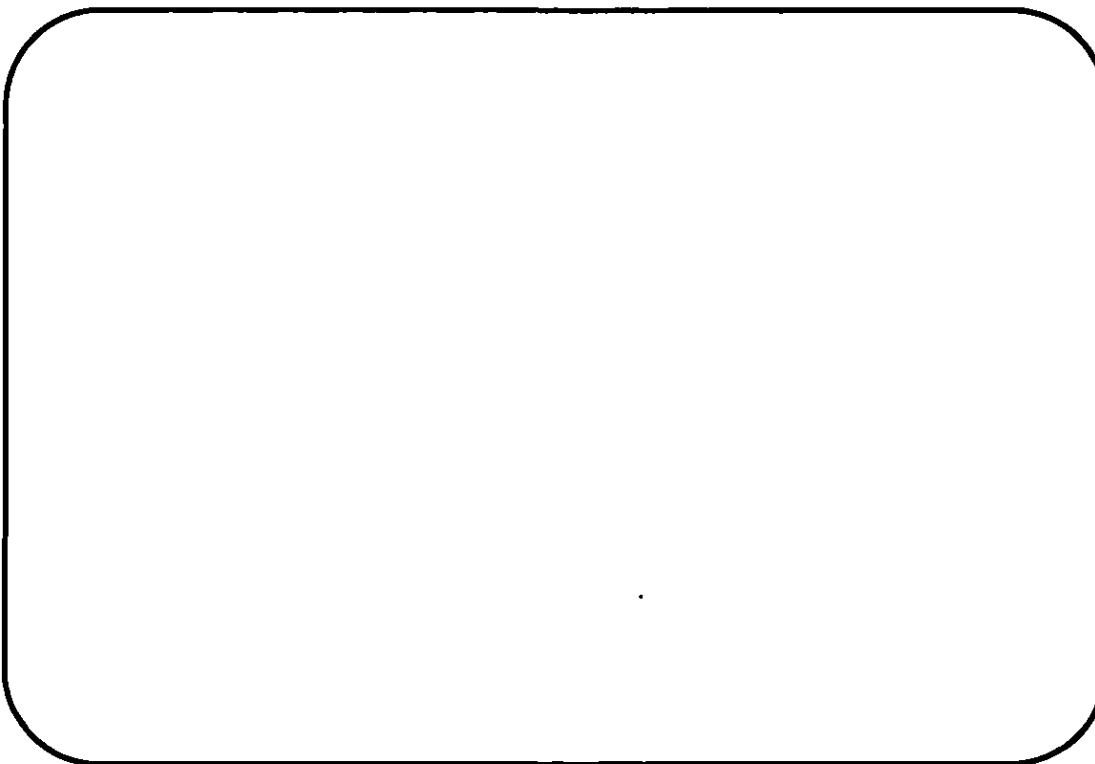
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: [Signature]

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

3

LISTA DE INVENTORES PCT/US2004/024011

SIAO-KUN WAN WELCH

9087 South 6th Street,
Kalamazoo, Michigan 49009,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

JAY GREGORY CALVERT

27 Stonybrook Road,
Gales Ferry, Connecticut 07335,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

MICHAEL K. O'HARA

1218 Oshtemo Trace,
Kalamazoo, Michigan 49009,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

XUEMEI CAO

97 Stockbridge Road,
Scituate, Massachusetts 02066
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 06007814 00000000 Folios: 45
Fecha (HND): 2006-01-27 18:34:26
Trámite : 411 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 9,273
FECHA : ENERO 25 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISDEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	45034985	24/01/2006	3,230,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. REENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50003-01-01 SOLICITUDES	1 TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

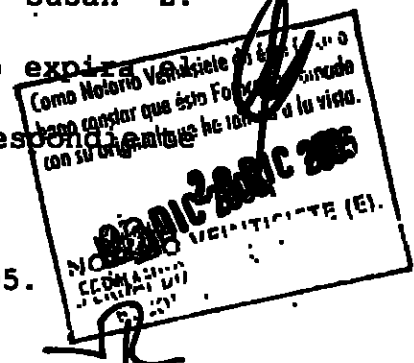
Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por **PFIZER PRODUCTS, INC.**, a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por **Grover F. Fuller, Jr.** el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de **Grover F. Fuller, Jr.**, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por **Susan Z. Killian**, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mi el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian



SERGIO ANDRES RUEDA IGLESIAS
C. C. 952
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS, INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No. 0138 D.F. 11.2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

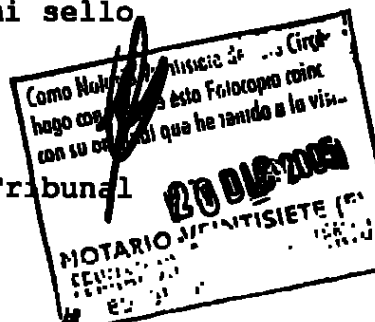
6

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.



SERGIO ANDRES RIJEDA IGLESIAS
C. C. B. N. 773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES / INGLES - ESPAÑOL
RESOLUCION No. 0138 DE FEBRERO 11, 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

APOSTILLA

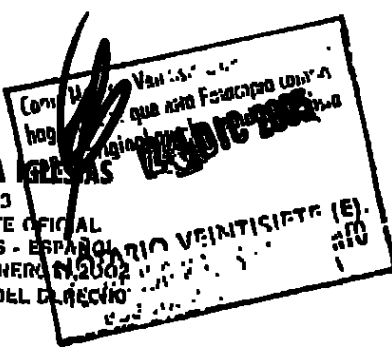
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
El presente documento público
2. Fue firmado por: Norman Goodman
3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado
4. Lleva el sello del Condado de Nueva York
Se certificó:
5. En Nueva York, Nueva York
6. El 22 de noviembre de 2005
7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York
8. Bajo el Número NYC-10404952A
9. Aparece Sello del Estado de Nueva York
10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
REGISTRACION No. 0138 DI FEBRERO 14, 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL D.E.P.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**

This public document

2. has been signed by **Norman Goodman**

3. acting in the capacity of **County Clerk**

4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York 6. the 22nd day of November 2005

7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York

8. No. NYC-10404952A

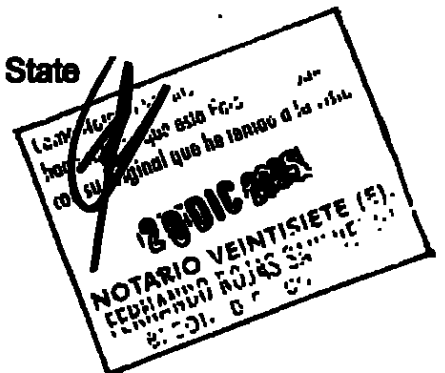
9. Seal/Stamp

10. Signature

James Bizzari

James Bizzari

Special Deputy Secretary of State



Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, declarar y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

PFIZER PRODUCTS INC.,

Signature/Firma:

By:

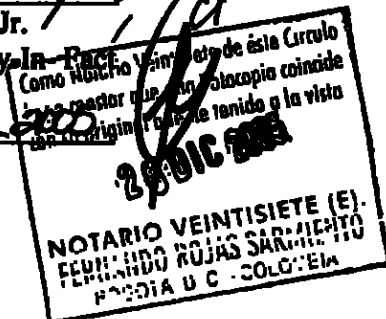
Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-in-Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

City/Country/Ciudad, País: New York, NY USA



State of New York
County of New York, } ss.:

467518

Form 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Section 106
Section 106
whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and official seal this

FEE PAID \$3.00

144-222605

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

10
11

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street
City New York
State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of **PFIZER PRODUCTS INC.**

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

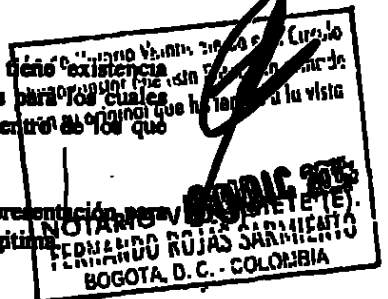
3. That **PFIZER PRODUCTS INC.**, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

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 encuentran dentro de los que comprenden su objeto social.

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

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



NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan P. Kilham



SUSAN P. KILHAM
Notary Public, State of New York
No. 012345678
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
Subscribed and sworn to before me
this 11th day of NOV. 2005
Susan P. Kilham

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 March 2005 (10.03.2005)

PCT

(18) International Publication Number
WO 2005/021034 A2

(51) International Patent Classification: A61K 39/12

(21) International Application Number:
PCT/US2004/024011

(22) International Filing Date: 26 July 2004 (26.07.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60490A34 29 July 2003 (29.07.2003) / US

GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, HU, IE, IT, LJ, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicants and
(72) Inventors: WELCH, Siao-Kun, Wan [US/US]; 9087 South 6th Street, Kalamazoo, MI 49009 (US). GALVERT, Jay, Gregory [US/US]; 27 Stonybrook Road, Gales Ferry, CT 06335 (US). O'HARA, Michael, E. [US/US]; 1218 Oaklawn Trace, Kalamazoo, MI 49009 (US). CAO, Xuesun [US/US]; 97 Stockbridge Road, Schuette, MA 02066 (US).

(74) Agent: GROLZ, Edward, W.; Scully, Scott, Murphy & Panser, 400 Garden City Plaza, Garden City, NY 11530 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HN, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SN, ST, SV, SY, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Declarations under Rule 4.17:

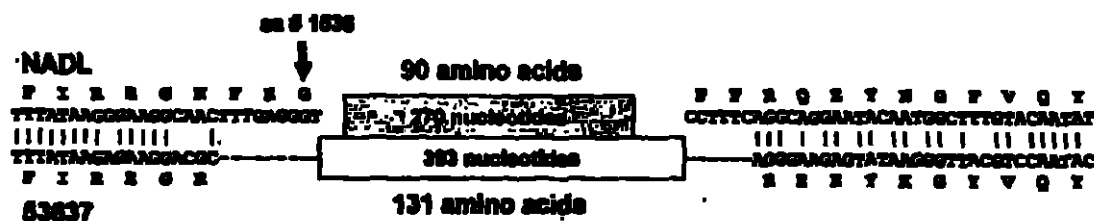
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(III)) for all designations
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(III)) for all designations
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(III)) for all designations
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(III)) for all designations

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SAFE MUTANT VIRAL VACCINES



(57) Abstract: The present invention provides safe vaccines and methods of preparing such vaccines. The vaccines of the present invention contain at least two live mutant viruses of the same family or nucleic acid molecules encoding such viruses, wherein each of the two viruses or the encoding nucleic acids contains a mutation that confers a desirable phenotype and the mutations in the viruses reside in the same genomic site such that the mutant viruses cannot recombine with each other to eliminate the mutations.

WO 2005/021034 A2

SAFE MUTANT VIRAL VACCINES

5 Field Of The Invention

The present invention relates generally to vaccines suitable for administration to animals against viral infections. More specifically, the present invention relates to safe vaccines and methods of preparing such vaccines. The vaccines of the present invention contain at least two live mutant viruses of the same family or nucleic acid molecules
10 encoding such viruses, wherein each of the viruses or the encoding nucleic acids contains a mutation that confers a desirable phenotype and the mutations in the viruses reside in the same genomic site such that the mutant viruses cannot recombine with each other to eliminate the mutations.

15 Background Of The Invention

The virus family *Flaviviridae* consists of the genera *Pestivirus*, *Flavivirus* and *Hepacivirus*. The genus *Pestivirus* is represented by the species Bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1), BVDV-2, classical swine fever virus, and Border disease virus. The virions of the family members encapsulate positive-strand RNA genomes of about 9.5 to 12.3 kb. The
20 genomic RNAs contain contiguous long open reading frames (ORFs), which are translated into polyproteins that are processed by cellular and viral proteases to give rise to the mature viral proteins. For members of *Pestivirus*, the ORF encodes a polyprotein of about 3000 amino acids, which is cotranslationally and posttranslationally processed to the following mature viral proteins (from 5' to 3'): N^{pro}, C, E^{pro}, E1, E2, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, and
25 NS5B.

Two biotypes are found among some members of *Pestivirus* based on their effect on tissue culture cells, namely cytopathogenic (cytopathic or cp) and noncytopathogenic (noncytopathic or ncp). Genome analyses revealed insertions of cellular sequences, sometimes accompanied by duplication of viral sequences, genomic rearrangements, and/or
30 deletions of viral sequences in the genomes of cp pestiviruses, but not in the RNAs of the corresponding ncp pestiviruses. This suggests that cp pestiviruses are evolved from ncp pestiviruses by RNA recombination.

BVDV is a widely distributed pathogen of cattle. BVDV-1 usually produces only mild diarrhea in immunocompetent animals, whereas BVDV-2 can produce thrombocytopenia,
35 hemorrhages and acute fatal diseases. BVDV is capable of crossing the placenta of pregnant cattle and may result in the birth of persistently infected (PI) calves (Malmquist, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 152:763-768 (1988); Ross, et al., *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188:618-619 (1986)). Viremic calves are immunotolerant to the virus and persistently viremic for the rest of their lives. They provide a source for outbreaks of mucosal disease (Less, et al., *Dtsch.*

Tieraerztl. Wschr. 81:481-487 (1974)) and are highly predisposed to infection with microorganisms causing diseases such as pneumonia or enteric disease (Barber, et al., *Vet. Rec.* 117:459-484 (1985)). Viruses of either genotype may exist as one of the two biotypes, cp or ncp. The cp phenotype correlates with the expression of NS3, since cells infected with either cp or ncp BVDV both express NS2-3, whereas NS3 is detected only after infection with cp BVDV. NS3 is colinear to the C-terminal part of NS2-3. The expression of NS3 appears to be a result of genomic alterations observed for cp BVDV.

Presently available viral vaccines include killed or attenuated live viral vaccines, live-vectored vaccines, subunit vaccines, and DNA or RNA vaccines. See Roth et al., "New

Technology For Improved Vaccine Safety And Efficacy", *Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice* 17(3): 585-597 (2001). Attenuation of viruses can be achieved by UV irradiation, chemical treatment, or high serial passage *in vitro*. The number, position and nature of mutations induced by these methods are unknown absent genomic sequence analyses. Attenuation can also be achieved by making defined genetic alterations, for example, specific deletion of viral sequences known to confer virulence, or insertion of sequences into the viral genome. One concern with respect to the use of attenuated live viral vaccines is that attenuated mutant viruses have the potential to recombine *in vivo* to eliminate the attenuating mutation(s) thereby restoring virulence. For example, in the presence of a virulent (wild type) field strain, attenuated viruses having deletions in the viral genome have the potential to recombine with the virulent strain to restore the deleted sequence. See, e.g., Roth et al., *supra*. Cytopathic pestiviruses having cellular insertions have also been observed to give rise to noncytopathic viruses in cell culture by deletion of the cellular sequences, possibly through RNA recombination. See, e.g., Baroth et al., "Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus", *Virology*, 278(2): 458-66, (2000), and Becher et al., "RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease", *Journal of Virology* 75(14): 6256-64 (2001). Where it is desired to include two attenuated mutant viruses from the same species, genus or family in a vaccine composition, there is a concern that the two viruses may recombine in the vaccinated animal thereby eliminating the attenuating mutations. See, e.g., Glazenburg et al., "Genetic recombination of pseudorabies virus: evidence that homologous recombination between insert sequences is less frequent than between autologous sequences", *Archives of Virology*, 140(4): 671-85 (1995).

There remains a need to develop safe and effective vaccines that protect animals against viral infections.

Summary Of The Invention

The present invention provides safe vaccines which contain at least two live mutant viruses of the same family or nucleic acid molecules encoding such viruses, wherein each virus or the encoding nucleic acid contains a mutation that confers a desirable phenotype,

and the mutations in the viruses reside in the same genomic site such that the mutant viruses cannot recombine with each other to eliminate the mutations.

The present invention also provides a method of preparing a safe viral vaccine by selecting or constructing two or more live mutant viruses of the same family, genus or species, wherein each virus contains a mutation that confers a desirable phenotype, and the mutations in the viruses reside in the same genomic site such that the mutant viruses can not undergo homologous recombination to eliminate the mutations.

The present invention further provides a method of protecting an animal against viral infections by administering to the animal a vaccine composition of the present invention.

10

Brief Description Of The Drawings

Figure 1. Alignment of the cellular insertions and flanking viral sequences from the NS2-3 regions of BVDV-1 strain NADL and BVDV-2 strain 63637.

Detailed Description Of The Invention

It has been uniquely recognized in accordance with the present invention that live mutant viruses of the same family, which contain mutations at the same genomic site of the viruses, cannot recombine with one another to eliminate the mutations.

Accordingly, in one embodiment, the present invention provides safe vaccine compositions containing at least two, i.e., two or more, live mutant viruses of the same family, or nucleic acid molecules encoding such viruses, wherein the mutations in the viruses reside in the same genomic site such that the mutant viruses cannot recombine with each other to eliminate the mutations.

In another embodiment, the present invention provides a method of preparing a safe viral vaccine, as described hereinabove. Specifically, a safe vaccine is prepared by selecting or constructing two or more live mutant viruses of the same family, genus or species, wherein each virus contains a mutation that confers a desirable phenotype (for example attenuation of virulence, alteration of cellular tropism or biotype, alteration of species tropism, or expression of a foreign gene cassette), and the mutations in the viruses reside in the same genomic site such that the mutant viruses can not undergo homologous recombination with each other to eliminate the mutations.

The term "vaccine" or "vaccine composition" refers to a composition containing live mutant viruses which, upon inoculation into an animal, induces a complete or partial immunity to the pathogenic version of the viruses, or alleviates the symptoms of diseases caused by the pathogenic versions of the viruses. The protective effects of a vaccine composition against a virus are normally achieved by inducing 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 viral infection, amelioration of the

35

13
14

symptoms, or accelerated elimination of the viruses from the infected subjects, are indicative of the protective effects of the vaccine composition.

By "animal" is meant to include birds, for example, chickens, turkeys, domestic waterfowl, and any mammal, for example, cattle, sheep, swine, goats, dogs, cats, and horses.

The term "viruses", "viral isolates" or "viral strains" as used herein refer to viral particles or virions that contain viral genomic DNA or RNA, associated proteins, and other chemical constituents (such as lipids).

By "nucleic acid molecule encoding a virus" or "nucleic acid molecule of a virus" is meant the genomic nucleic acid molecule of the virus, either in the form of RNA or DNA.

By "mutation" is meant to include deletion, insertion or substitution of one or more nucleotides, or a combination thereof. In accordance with the present invention, the mutation preferably confers a desirable phenotype, for example attenuation of virulence, alteration of cellular tropism or biotype, alteration of species tropism, or expression of a foreign gene cassette. Especially preferred mutations are mutations that confer attenuated virulence.

By "attenuation" is meant that the virus has lost some or all of its ability to proliferate and/or cause disease in an animal infected with the virus. For example, an attenuated virus can be a virus that is unable to replicate at all or is limited to one or a few rounds of replication, or restricted in cell or tissue tropism, when present in an animal in which a wild type pathogenic version of the attenuated virus can replicate.

An attenuated virus may have one or more mutations in a gene or genes that are involved in pathogenicity of the virus. Such mutations are also referred to herein as "attenuating mutation(s)". An attenuated virus can be produced from the wild type, pathogenic virus by UV irradiation, chemical treatment, or high serial passage of the wild type, pathogenic virus *in vitro*. Alternatively, an attenuated virus can be produced from the wild type, pathogenic virus by making specific deletion of viral sequences known to confer virulence, insertion of sequences into the viral genome, or making one or more point mutations in the viral genome. An attenuated virus can be a viral isolate obtained from an animal, which isolate is derived from the wild type, pathogenic version of the virus through events other than artificial means, e.g., events that have occurred in a host animal such as recombination.

The two or more live mutant viruses present in the vaccine compositions of the present invention contain mutations that reside in the same genomic site. By "same genomic site" is meant that when the genomic nucleotide sequences of the viruses are aligned, the mutations in the viral genomes overlap with one another such that there is no opportunity for homologous recombination between and among the viral genomes to eliminate the mutations. In other words, when the genomic nucleotide sequences of the viruses are aligned, there is at least one contiguous portion of the aligned sequences where the

sequences in the aligned viral genomes are mutant sequences. There are a number of computer programs that compare and align nucleic acid sequences which one skilled in the art may use. The sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in a nucleic acid sequence for optimal alignment with a second nucleic acid sequence). For example, the NBLAST and XBLAST programs as described in Altschul, et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, the Gapped BLAST program as described in Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, and the PSI-Blast program as described in Altschul et al., 1997, *supra*. When utilizing BLAST, Gapped BLAST, and PSI-Blast programs, the default parameters of the respective programs (e.g., XBLAST and NBLAST) can be used (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Generally speaking, the concept of the present invention, i.e., including in the same vaccine composition two or more live mutant viruses of the same family having mutations at the same genomic site, applies to mutant viruses from any family where the viral genomes have sufficient sequence identity to permit homologous recombination. It has been shown that a nucleotide identity as short as 15 nucleotides can lead to efficient homologous recombination (Nagy and Bujaraid, *J. Virol.* 69:131-140, 1995).

The present invention applies especially to viruses of the *Flaviviridae* family. The *Flaviviridae* family consists of the genera *Pestivirus*, *Flavivirus* and *Hepacivirus*. The viruses of the *Flaviviridae* family members encapsulate positive-strand RNA genomes of about 9.5 to 12.3 kb. The genomic RNAs containing contiguous long open reading frames, which are translated into polypeptides that are processed by cellular and viral proteases to give rise to the mature viral proteins.

Preferably, the mutant viruses of the vaccine composition of the present invention are from the same genus, either the same or different species.

In a preferred embodiment, the vaccine composition of the present invention contains two or more live mutant viruses from the *Pestivirus* genus. The genus *Pestivirus* is represented by the species Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1 (BVDV-1), Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2 (BVDV-2), classical swine fever virus, and Border disease virus. The ORF encodes a polypeptide of about 3000 amino acids, which is co-translationally and post-translationally processed to the following mature viral proteins (from 5' to 3'): N^{pro}, C, E^{pro}, E1, E2, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B.

Ordinarily, BVDV has a genome in the form of RNA. RNA can be reverse-transcribed into DNA for use in cloning. Thus, references made herein to nucleic acid and BVD viral sequences encompasses both viral RNA sequences and DNA sequences derived from the viral RNA sequences. For convenience, genomic sequences of BVDV as depicted in the SEQUENCE LISTING hereinbelow only refer to the DNA sequences. The corresponding RNA sequence for each is readily apparent to those of skill in the art.

In a more preferred embodiment, the vaccine composition of the present invention contains a cytopathic BVDV-1 and a cytopathic BVDV-2, wherein the mutations in both

14
15
viruses associated with the cytopathic biotype reside in the same genomic site such that the two mutant viruses cannot recombine to eliminate the mutations.

BVDV-1 and BVDV-2 represent two closely related genotypes of BVDV. The nucleotide sequences of the two viruses share about 70% identity over the entire genome, and slightly higher percent identity within the NS2-3 region. It is believed that the percent identity between the viral genomes of BVDV-1 and BVDV-2, at least in the NS2-3 region, is sufficient to permit homologous recombination.

BVDV-1 usually produce only mild diarrhea in animals, whereas BVDV-2 are viruses with high virulence which can produce thrombocytopenia, hemorrhages and acute fatal disease (Corapi et al., *J. Virol.* 63: 3834-3843; Bolin et al., *Am. J. Vet. Res.* 53: 2157-2163; Pellerin et al., *Virology* 203: 280-288, 1994; Ridpath et al., *Virology* 205: 66-74, 1994; Carman et al., *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 27-35, 1998). The two types of viruses have distinct antigenicity determined by a panel of MAbs and by cross-neutralization using virus-specific antisera raised in animals (Corapi et al., *Am. J. Vet. Res.* 51: 1388-1394, 1990). Viruses of either genotype may exist as one of the two biotypes, cytopathogenic (cytopathic or cp) or noncytopathogenic (noncytopathic or ncp). Cp viruses induce cytopathic effects (e.g., cell lysis) on cultured cells, while noncytopathic viruses do not.

It is desirable to prepare vaccines that provide protection against both BVDV-1 and BVDV-2. However, because of the high degree of sequence identity between the two viruses, there is a possibility that a live cytopathic BVDV-1 and a live cytopathic BVDV-2 included in the same vaccine composition, could recombine with each other in the vaccinated animal to yield noncytopathic viruses. Recombination between BVDV-1 and BVDV-2 has been documented. See, e.g., Ridpath et al., *Virology* 212: 259-262 (1995). Infection of the fetus in pregnant cattle with ncp viruses before immunocompetence develops can result in the fetus remaining viremic through the period of gestation and the subsequent birth of a calf that remains persistently viremic. Such a calf can die of mucosal disease upon superinfection with a cp BVDV. Accordingly, the vaccine compositions provided by the present invention, which contain live cp BVDV-1 and live cp BVDV-2 having mutations at the same genomic site, are especially desirable for protecting animals against both BVDV-1 and BVDV-2.

In one embodiment, BVDV cp isolates obtained from animals can be used in the vaccine composition of the present invention. Cp isolates of both BVDV-1 and BVDV-2 have been reported and are available to those skilled in the art, e.g., BVDV-1 NADL (ATCC# VR1422 or VR-534), BVDV-2 53837 strain (deposited with the ATCC as PTA-4859), and type 2 field isolates such as those described by Ridpath and Neill, *J. Virol* 74:8771-8774, (2000). Cp isolates reported so far typically contain an insertion of a heterologous sequence, e.g., an ubiquitin coding sequence (Genbank accession number M96887 or De Moorloze et al., *J. Gen. Virol.* 74:1433-1438, (1993)), a bovine NEDD8 coding sequence (Baroth et al.,

supra), or a *Bos taurus* DnaJ1 coding sequence (as described in the Examples hereinbelow), among others.

5 In another embodiment, a cp BVDV is generated by making defined alterations in the BVDV genome, e.g., by deleting specific viral sequences, inserting sequences into a specific viral genomic site, or making one or more substitutions, or combinations thereof.

Where a cp BVDV is generated by inserting a heterologous (i.e., foreign to the virus) sequence into a specific genomic site, the nature of the sequence to be inserted is generally not critical to the present invention. In addition, the insertion is not limited to any particular site so long as the insertion results in an attenuated phenotype. As heterologous sequences
10 in cp isolates are often found in the NS2-3 region, the NS2-3 region, especially the part surrounding the putative NS2-3 cleavage site which corresponds to, e.g., amino acid residues # 1679 to #1680 of the BVDV-1 NADL strain (the numbering is based on the published genomic sequence Genbank accession No. M31182, SEQ ID NO: 4), is a preferred location for insertions.

15 An cp BVDV-1 can be generated by making a defined genomic alteration that mimics the mutation identified in a cp BVDV-2 isolate obtained from an animal, such that these viruses have mutations associated with the cp biotype in the same genomic site. Similarly, a cp BVDV-2 can be generated by way of making a defined genomic alteration that mimics the mutation identified in a cp BVDV-1 isolate obtained from an animal.

20 In a preferred embodiment, the vaccine composition of the present invention contains NADL (a cp BVDV-1 isolate), and BVDV-2 53637 (a cp BVDV-2 isolate), where the two cp isolates each contain a mutation at the same genomic site which results in the cytopathic biotype. The genomic sequence of the BVDV-1 NADL strain is set forth in SEQ ID NO: 4, and the BVDV-2 53637 strain was deposited with the ATCC as PTA-4859. Both
25 isolates contain an insertion in the NS2-3 region. The attenuated cp BVDV-1 contains an insertion of a *Bos taurus* DnaJ1 coding sequence 3' of the thymidine at nucleotide position # 4893 (NADL sequence numbering), which is the third nucleotide of the codon encoding the glycine residue at amino acid position 1538. The attenuated cp BVDV-2 contains an insertion of a *Bos taurus* DnaJ1 coding sequence at the same genomic site.

30 According to the present invention, the cp BVDV isolates employed in the present vaccine composition have been attenuated and are therefore nonpathogenic. Methods of attenuation are known to those skilled in the art and are also described hereinbelow.

In another embodiment, the vaccine composition of the present invention contains an attenuated BVDV-1 and an attenuated BVDV-2, wherein the attenuating mutations in both
35 viruses reside in the same genomic site such that the two mutant viruses cannot recombine to eliminate the attenuating mutations.

An attenuated BVDV is generated by UV irradiation, chemical treatment, or high serial passage of the pathogenic version of the virus *in vitro*. Sequence analysis can be conducted in order to determine the nature and genomic location of mutations generated by

15
16

these methods. The mutation can be in the form of a deletion, insertion or substitution of one or more nucleotides, or a combination thereof. Alternatively, an attenuated BVDV is generated by making defined alterations in the BVDV genome, e.g., by deleting specific viral sequences, inserting sequences into a specific viral genomic site, or making one or more substitutions, or combinations thereof.

As described above, the live mutant viruses for use in the vaccine composition of the present invention can be from the same family, genus or species, where the viral genomes have sufficient sequence identity to permit homologous recombination. Additional examples of combinations of viruses appropriate for use in the vaccine composition of the present invention include, but are not limited to, combinations of different types of poliovirus, combinations of multiple live mutant strains of infectious bronchitis virus, combinations of multiple live mutant strains of Newcastle disease virus, combinations of Canine adenovirus - 1 and canine adenovirus-2, combinations of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4, combinations of multiple live mutant strains of influenza virus, combinations of multiple live attenuated strains of Feline calicivirus, combinations of multiple serotypes of Rotavirus, combinations of multiple serotypes of Rhinovirus, combinations of multiple serotypes of Foot and Mouth Disease virus, combinations of the European and North American genotypes of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, combinations of standard and variant strains of infectious bursal disease virus.

In accordance with the present invention, although viral particles are the preferred form for use in the vaccines, nucleic acid molecules encoding mutant viruses of the same family, genus or species, can be used directly in vaccines as well. The DNA or RNA molecule can be present in a "naked" form or it can be combined with an agent which facilitates cellular uptake (e.g., liposomes or cationic lipids). Vaccines and vaccination procedures that utilize nucleic acids (DNA or mRNA) have been well described in the art, e.g., U.S. Patent No. 5,703,055, U.S. Patent No. 5,580,889, U.S. Patent No. 5,589,488, International Patent Publication WO 98/35562, and by Ramsey et al., 1997, *Immunol. Cell Biol.* 75:360-363; Davis, 1997, *Cur. Opinion Biotech.* 8: 635-640; Manickan et al., 1997, *Critical Rev. Immunol.* 17: 139-154; Robinson, 1997, *Vaccine* 15(8): 785-787; Robinson et al., 1998, *AIDS Res. Hum. Retr.* 12(5): 455-457; Lal and Bennett, 1998, *Critical Rev. Immunol.* 18:449-484; and Vogel and Server, 1995, *Clin. Microbiol. Rev.* 8(3): 406-410, all of which are incorporated herein by reference.

In addition to two or more live mutant viruses from the same family, genus or species, the vaccine compositions can include other antigenic component. Other antigenic components appropriate for use in accordance with the present invention include, but are not limited to, antigens prepared from pathogenic bacteria such as *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parvulus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus anthracis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma galinaceum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycobacterium*

bovis, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridia* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Campylobacter* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Listeria monocytogenes*, *Rickettsia rickettsii*, *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Chlamydia* spp., *Brucella* spp., *Vibrio* spp., *Salmonella enterica* serovars, *Leptospira* spp.; pathogenic fungi such as *Candida*; protozoa such as *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Babesia* spp., *Giardia* spp.; helminths such as *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Fasciola*; either in the form of an inactivated whole or partial cell preparation, or in the form of antigenic molecules obtained by genetic engineering techniques or chemical synthesis. Additional antigens include pathogenic viruses such as Marak's disease virus, infectious bursal disease virus, Newcastle's disease virus, chicken anemia virus, fowlpox virus, avian leukosis virus, infectious laryngotracheitis virus, reticuloendothelial virus, canine parvovirus, canine distemper virus, canine herpesvirus, canine coronavirus, canine parainfluenza-3, feline panleukopenia virus, feline herpes virus, feline calicivirus, feline immunodeficiency virus, feline infectious peritonitis virus, equine herpesvirus, equine arteritis virus, equine infectious anemia virus, Eastern equine encephalitis virus, Western equine encephalitis virus, Venezuelan equine encephalitis virus, West Nile virus, transmissible gastroenteritis virus, 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, African swine fever virus, Porcine parvovirus, PRRS virus, Porcine circovirus, Influenza virus, swine vesicular disease virus, Techen fever virus, Pseudorabies virus, either in the form of modified live (attenuated) viral preparation, an inactivated whole or partial virus preparation, or in the form of antigenic molecules obtained by genetic engineering techniques or chemical synthesis. When additional attenuated live viruses are used, such additional viruses should preferably be from a family different from that of the two principal attenuated viruses, as described above.

In a preferred embodiment, the present invention provides a vaccine composition which contains an attenuated cp BVDV-1 derived from the BVDV-1 NADL strain, an attenuated cp BVDV-2 derived from the BVDV-2 53637 strain, where the two cp isolates each contain a mutation associated with the cp biotype at the same genomic site, and at least one (i.e., one or more) of the following antigenic component, either in inactivated or modified live form: bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza virus-3, *Campylobacter fetus*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, or *Mannheimia haemolytica*.

In addition, the vaccine compositions of the present invention can include one or more veterinary-acceptable carriers. As used herein, "a veterinary-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives, 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. Stabilizers include albumin, among others. The vaccine compositions can further include one or more other immunomodulatory agents such as, e.g., interleukins, interferons, or other cytokines

5 Adjuvants suitable for use in the vaccine compositions 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 co polymer (CytoRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), AMPHIGEN® adjuvant, saponin, Quil A, cholesterol, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), or other saponin fractions, monophosphoryl lipid A, Avidine lipid-amine adjuvant, heat-labile enterotoxin from *E. coli* (recombinant or otherwise), cholera toxin, or muramyl dipeptide, among many others.

10 Typically, a live mutant virus is present in a vaccine at an amount of about 1×10^8 and about 1×10^9 virus particles per dose, with a veterinarily acceptable carrier, in a volume of between about 0.5 and about 5 ml. The precise amount of a virus in a vaccine composition effective to provide a protective effect can be determined by a skilled veterinarian. Where the DNA or RNA molecule of the virus is used in the vaccine, the amount of the nucleic acids should generally be between about 0.1 µg/ml and about 5.0 mg/ml.

15 The vaccine compositions of the present invention can be made in various forms depending upon the route of administration. For example, the vaccine compositions 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 compositions are typically maintained at about 4°C, and can be reconstituted in a stabilizing solution, e.g., saline or and HEPES, with or without adjuvant.

20 The vaccine compositions of the present invention can be administered to an animal for treating or preventing a disease caused by the pathogenic versions of the viruses in the vaccine compositions. Therefore, methods of vaccinating an animal against a disease caused by a virus are also provided by the present invention.

25 In practicing the present methods, a vaccine composition of the present invention is administered to an animal preferably via parenteral routes, although other routes of administration can be used as well, such as e.g., by oral, intranasal, intramuscular, intra-lymph node, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, rectal or vaginal administration, or by a combination of routes. Boosting regimens may be required and the dosage regimen can be adjusted to provide optimal vaccination.

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

EXAMPLE I**Determination Of The Position Of The Cellular Insertion In BVDV2 Strain 53637**

A portion of the sequence of the NS2-3 region from BVDV2-53637 was determined,
5 In order to identify and map the location of any cellular insertions in the region. A 670 base
RT-PCR product was amplified from viral RNA, using forward primer 53637U1 (5'-
CGTCCACAGATGGTTTGGT-3'; SEQ ID NO: 1) and reverse primer 53637L (5'-
GGCTATGTATTGGACGTAACCC-3'; SEQ ID NO: 2). The RT-PCR product was purified
and submitted for sequence analysis (SEQ ID NO: 3). When aligned with BVDV1-NADL
10 (Genbank accession number M31182, SEQ ID NO: 4), striking similarities were observed
(FIGURE 1). Both viruses contain an in-frame insertion derived from the *Bos taurus* DnaJ1
gene. In the case of NADL, the insertion is 90 amino acids (270 nucleotides) in length and is
located between glycine-1536 and proline-1627 in the NADL polyprotein. These coordinates
correspond to glycine-1536 and proline-1537 in non-cytopathic BVDV1 strains such as SD-1
15 (Genbank accession number AAA42860, SEQ ID NO: 6), indicating that the genome
alteration in NADL is a simple insertion with no concomitant deletion or duplication of flanking
viral sequences. Like BVDV1-NADL, there is an insertion of a portion of the *Bos taurus*
DnaJ1 gene in BVDV2-53637. The cellular insertion is longer (131 amino acids, 393
nucleotides), being extended in both directions relative to the insertion in BVDV1-NADL. The
20 location of the cellular insertion within the NS2-3 region is identical in the two viruses. Unlike
BVDV1-NADL, the BVDV2-53637 insertion is accompanied by a deletion of 5 amino acids
(15 nucleotides) of flanking viral sequences. Three amino acid residues are absent flanking
the 5' end of the insertion, while two amino acid residues are absent flanking the 3' end of
the insertion. Because the cellular insertions are at the same genome position in the two
25 vaccine viruses, they cannot undergo homologous recombination to delete the insertion to
generate a non-cytopathic chimeric virus.

Example II

30 **Attempts To Detect Non-Cytopathic BVDV Viruses**
In Co-Passaged BVDV1-NADL / BVDV2-53637 Cultures

In order to determine whether the two vaccine viruses are capable of recombining to
generate detectable levels of non-cytopathic BVDV, the viruses were co-cultivated on
susceptible cells and a sensitive hemi-nested RT-PCR assay was used to detect potential
35 non-cytopathic viruses from among an excess of longer cytopathic products that still contain
the cellular insert. To increase the probability of intertypic recombination *in vitro*, each virus
was inoculated simultaneously onto confluent BK-6 cells in 6-well plates at a multiplicity of
infection of 2-4 (12 replicates per experiment). After 2 - 3 days of co-cultivation the cells
were frozen and thawed twice, and cell debris was removed by low speed centrifugation.
40 The resulting supernatant fluid was then used as inoculum for the next passage. A total of

17
18

seven serial passages were conducted in several studies. During the passages BVDV1-NADL grew more rapidly than BVDV2-53637, but the type II virus was still detectable after seven passages using nested RT-PCR. A sensitive hemi-nested RT-PCR assay was employed in an attempt to detect any non-cytopathic virus.

5 In first round RT-PCR, forward primers 53637U1 (SEQ ID NO: 1) or NADL4744 (5'-CGTGGCTTCTTGGTACGGG-3', SEQ ID NO: 7) were used in conjunction with reverse primers 53637L (SEQ ID NO: 2) or NADL5305 (5'-AGCGGTATATTGTACAAAGCCA-3', SEQ ID NO: 8). All four combinations of forward and reverse primers were used in order to detect BVDV1, BVDV2, and intertypic recombinants. The expected size of RT-PCR product was 562 bp for cytopathic BVDV1-NADL and 670 bp for cytopathic BVDV2-53637. Non-cytopathic viruses, if present at detectable levels, would be expected to yield first round products of 282 bp (BVDV1-NADL) or 277 bp (BVDV2-53637). Intertypic recombinants should be similar in size to one of the parents, or of intermediate length, depending on the location of the recombination site. Non-cytopathic BVDVs were never detected following first round RT-PCR.

To increase the sensitivity of detecting non-cytopathic BVDV in the presence of a large excess of cytopathic BVDV, a restriction enzyme digestion step was included before the nested PCR to destroy the larger NS2-3 templates derived from the cytopathic viruses. A combination of *MspI* and *DraI* was selected based on the observation that they cut within the *Bos taurus* *DnaJ1* insert but do not cut the flanking viral sequences. In second round (hemi-nested) PCR, forward primers 53637U2 (5'-TGCACGATCTGTGAAGGGAAAGAA-3', SEQ ID NO: 9) or NADL4844 (5'-TGCAGTGTATGTGAGGGCCGAGAG-3', SEQ ID NO: 10) were used in conjunction with the same two reverse primers 53637L or NADL5305. Appropriate primer combinations were used to attempt to detect intertypic recombinants as well as BVDV1 and BVDV2. The expected size of RT-PCR product is 482 bp for cytopathic BVDV1-NADL and 570 bp for cytopathic BVDV2-53637 (present at low levels due to incomplete digestion of the cytopathic BVDV RT-PCR products). Non-cytopathic viruses, if present at detectable levels, would be expected to yield second round products of 192 bp (BVDV1-NADL) or 177 bp (BVDV2-53637). Intertypic recombinants should be similar in size to one of the parents, or of intermediate length, depending on the location of the recombination site. Non-cytopathic BVDVs were never detected following second round PCR. In a few individual reactions, aberrant bands of various sizes were seen. All bands between 100 and 300 bp were considered to be potential non-cytopathic products and were submitted for DNA sequence analysis. In every case the aberrant band was the result of false priming during PCR. There was no evidence of non-cytopathic virus in any of the studies.

What is claimed is:

1. A vaccine composition comprising at least two live mutant viruses of the same family, wherein each virus contains a mutation in the viral genome, and the mutations in the viruses reside in the same genomic site such that the mutant viruses cannot recombine with each other to eliminate the mutations.
2. The vaccine composition of claim 1, wherein said family is the family of *Flaviviridae*.
3. The vaccine composition of claim 1, wherein said two live mutant viruses are both from the genus of *Pestivirus*.
4. The vaccine composition of claim 1, wherein the two mutant live viruses consist of a mutant BVDV-1 and a mutant BVDV-2.
5. The vaccine composition of claim 4, wherein the two mutant live viruses consist of a cytopathic (cp) BVDV-1 and a cp BVDV-2, and are both attenuated.
6. The vaccine composition of claim 5, wherein the cp BVDV-1 and the cp BVDV-2 both comprise a mutation in the NS2-3 region that results in a cytopathic biotype.
7. The vaccine composition of claim 6, wherein the cp BVDV-1 is BVDV-1 NADL, and the cp BVDV-2 is BVDV-2 83637.
8. The vaccine composition of claim 4, further comprising at least one of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza virus-3, *Campylobacter fetus*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, or *Mannheimia haemolytica*.
9. The vaccine composition of claim 1, further comprising a veterinary-acceptable carrier.
10. A method of preparing a safe viral vaccine comprising selecting or constructing two live mutant viruses of the same family, wherein each virus contains a mutation and the mutations in the viruses reside in the same genomic site such that the mutant viruses can not undergo homologous recombination to eliminate the mutations.
11. The method of claim 10, wherein said mutation is selected from a deletion, an insertion, a substitution, or a combination thereof.

18
19

12. The method of claim 10, wherein said mutation confers a phenotype selected from attenuation of virulence, alteration of cellular tropism or biotype, alteration of species tropism, expression of a foreign gene cassette, or a combination thereof.
13. The method of claim 10, wherein said family is the family of *Flaviviridae*.
14. The method of claim 10, wherein said two live mutant viruses are from the genus of *Psittivirus*.
15. The method of claim 10, wherein the two mutant live viruses consist of a mutant BVDV-1 and a mutant BVDV-2.



49
20

SEQ ID NO		DESCRIPTION
	1	forward primer 53637U1
	2	reverse primer 53637L
5	3	670 bp RT-PCR product from the NS2-3 region of BVDV2 strain 53637
	4	genomic sequence of BVDV1-NADL (Genbank accession number M31182)
	5	polyprotein sequence of BVDV1-NADL (Genbank accession number AAA42854)
	6	polyprotein sequence of non-cytopathic BVDV1 strain SD-1 (Genbank accession number AAA42860)
10	7	forward primer NADL4744
	8	reverse primer NADL6306
	9	forward primer 53637U2
15	10	forward primer NADL4844

SEQ NO: 1

cgtccacagatggttttgg

SEQ NO: 2

ggctatgtattggacgtaaccc

SEQ NO: 3

cgctccacagatggttttggtagggaggaatatatggyggcaccgaaggtgatcaccatcataaaagctagtac
cctaagtaaaaaacaggcactgcataatctgcacgatctgtgaagggaaagastggaacggagcnaactgccc
aaagtgtggaagacaaggaaagcccataacatgtggaatgacactogagactttgaggagaaacattacaa
aaagatatattataagagaaggacgccaagaagcaatgaatacagatgatgtgcagocgatgccagggaaagca
tagggaggtttgaaacggacccgggaacctaaagagtgcagatactgtgctgagtgtaataggctgcacctgc
tgagggaaggtgacttttgggcagagtcagcatgtttgggocctcaaaatcacctaactttgogctgatggatgg
aaaggtgtatgatatacagagtggtgtggatgccagotgtgggaatctcccoagataccacagagtgccc
ttgtcacatctcattttggttcacggatgocaggcaccagtggggcggcagagagctactccagatgcccctcc
tgctgaccttcaggattttcttgagccggatctttcaagtaacccccaggccagatgtccagggaaagagtataa
gggttacgtccantacatagcc

SEQ ID: 4

gtatacagaga	attagaaaag	gcactogtat	acgtatttggg	caattaaaaa	taataattag
gcctagggaa	caaatccctc	tcagogaagg	ccgaaaagag	gctagccatg	cccttagtag
gactagcata	atgagggggg	tagcaacagt	ggtgagttcg	ttggatggct	taagccctga
gtacagggta	gtcgtcagtg	gttcgacgcc	ttggaataaa	ggtctcgaga	tgccacgtgg
acgagggcat	gcccnaagca	catcttaacc	tgagcggggg	tcgccoaggt	aaaagcagtt
ttacccgact	gttacgaata	cagcctgata	gggtgctgca	gaggccact	gtattgctac
taaaaatctc	tgctgtacat	ggcacatgga	gttgatcaca	aatgaaottt	tatacaaaac
atacaaaaca	aaacccgtcg	gggtggagga	acctgtttat	gatcaggcag	gtgatccctt
atttgggtgaa	aggggagcag	tocacootca	atcgacgcta	asgtccccac	acaagagagg
ggaacgcgat	gttccaaacca	acttggcatc	cttaccaaaa	agaggtgact	gcaggtcggg
taatagcaga	ggacctgtga	gcgggatcta	cctgaagcca	gggccactat	tttaccagga
otataaaggt	cccgtotatc	acagggcccc	gctggagctc	tttgaggagg	gatocattgt
tgaacagact	aaacggatag	ggagagtaac	tggaaagtga	ggaaagctgt	accacattta
tgtgtgtata	gatggatgta	taataataaa	aaagtccacg	agaagttaac	aaaggggtgt
caggtgggtc	cataatagga	ttgactgccc	tctatgggtc	acaaottgct	cagacacgaa
agaagagggg	gcaacaaaaa	agaaaacaca	gaaacccgac	agactagaaa	gggggaaat
gaaatagtg	cocaaagaat	ctgaaanaag	cagcaaaact	aaacctccgg	atgctacaat
agtgggtgaa	ggagtcaaat	accaggtgag	gaagaagggg	aaanccanga	gtaaaaacac
tcaggacggc	ttgtaccata	acaaaaacaa	acctcaggaa	tcacgcaaga	aactggaaaa
agcattgttg	gogtgggcaa	taatagctat	agttttgttt	caagttacaa	tggvageaaa
cataacacag	tggaaacctac	aagataatgg	gacggaaggg	atacaacggg	caatgttcca
aaaggggtgt	aatagaagtt	tacatggaat	ctggccagag	aaatctgtta	ctggogtccc
ttcccatcta	gccaccgata	tagaactaaa	aacaattpat	ggtatgatgg	atgcaagtga
gaagaccaac	tacacgtgtt	gcagacttca	acgcatgag	tggaacaang	atggttgggt
caactggtac	aatattgaac	cctggattct	agtcatgaat	agaacccaag	ccaatctcac
tgagggacaa	ccaccaaggg	agtgcgcagt	cacttgtagg	tatgataggg	ctagtgaact
aaacgtggta	acacaagcta	gagatagccc	cacaccctta	acaggttgca	agaaaggaaa
gaacttctcc	tttgaggcca	tattgatgcy	gggcccctgc	aactttgaaa	tagctgcaag
tgatgtatta	ttcaaaagaac	atgaacgcat	tagtatgttc	caggatacca	ctctttacct
tgttgacggg	ttgaccaact	ccttagaagg	tgccagacaa	ggaacogcta	aactgacaa
ctggttaggc	aagcagctcg	ggatactagg	aaaaaagttg	gaaanonaag	gtaagacgtg
gtttggagca	tacgtgtctt	ccccttactg	tgatgtcgat	cgcaaaattg	gctaootatg
gtatacaaaa	aattgcacoc	ptgcctgott	acccaagaac	acaaaaattg	tcggccctgg
gaaatttggc	accaatgcag	aggacggcaa	gatattacat	gagatggggg	gtcacttgte
ggaggtacta	ctactttctt	tagtgggtgt	gtccgacttc	gcacoggaaa	cagctagtgt

348

cactgacaag	tgggaggtgg	aacatggtgt	cataaccagg	ttagctaaga	gatatactgg
ggtcggggttc	aatggtgcat	acttaggtga	cgagcccaat	caccgtgctc	tagtggagag
ggactgtgca	actataacca	aaaacacagt	acagtttcta	aaaatgaaga	aggggtgtgc
gttcacctat	gacctgacca	tctccaatct	gaccaggctc	atcgaactag	tacacaggaa
caatcttgaa	gagaaggaaa	taccaccgcg	tacggtcacc	acatggctag	cttacacctt
cgtgaatgaa	gacgtaggga	ctataaaacc	agtactagga	gagagagtaa	tccccgaccc
tgtagttgat	atcaatttac	aaccagaggt	gcaagtggac	acgtcagagg	ttgggatcac
aataattgga	agggaaaccc	tgatgacaac	gggagtgaca	cctgtcttgg	aaaaagtaga
gcctgacgcc	agcgacaacc	aaaactcggg	gaagatcggg	ttggatgagg	gtaattaccc
agggcctgga	atacagacac	atacactaac	agaagaaata	cacaacaggg	atgcgaggcc
cttcatcatg	atcctgggct	caaggaattc	catatcaaat	agggcaaaga	ctgctagaaa
tataaatctg	tacacaggaa	atgaccccg	ggaaatacga	gacttgatgg	ctgcagggcg
catgttagta	gtagcactga	gggatgtcga	ccctgagctg	tctgaaatgg	tcgatttcaa
ggggactttt	ttatgatagg	aggccctgga	ggctctaagt	ctcgggcaac	ctaaaccgaa
gcaggttacc	aaggaaagctg	ttaggaatth	gatagaacag	aaaaaagatg	tggagatccc
taactggttt	gcatcagatg	acccagtatt	tctggaagtg	gccttaaaaa	atgataagta
ctacttagta	ggagatgttg	gagagctaaa	agatcaagct	aaagcacttg	gggccacgga
tcagacaaga	attataaaag	aggtaggctc	aaggacgtat	gccatgaagc	tatctagctg
gttctctaag	gcatcaaaca	aacagatgag	tttaactcca	ctgtttgagg	aattgttgct
acggtgcca	cctgcaacta	agagcaataa	ggggcacatg	gcatcagctt	accaattggc
acagggtaac	tgggagcccc	tcggttgccg	ggtgcaccta	ggtacaatac	cagccagaag
ggtgaagata	caccatatag	aagcttacct	gaagttgaaa	gatttcatag	aagaagaaga
gaagaaacct	agggttaagg	atacagtaat	aagagagcac	aacaaatgga	tacttaaaaa
aataaggttt	caaggaaacc	tcaacaccaa	gaaaatgctc	aaccagggga	aactatctga
acagttggac	agggaggggc	gcaagaggaa	catctacaac	caccagattg	gtactataat
gtcaagtgca	ggcataaagg	tggagaaatt	gccaatagtg	agggcccaaa	ccgacaccaa
aacctttcat	gaggcaataa	gagataagat	agacaagagt	gaaaaccggc	aaaatccaga
attgcacaac	aaattgttgg	agattttcca	cacgatagcc	caaccacccc	tgaacacac
ctacggtgag	gtgacgtggg	agcaacttga	ggcgggggta	aatagaaagg	gggcagcagg
cttcttgagg	aagaagaaca	tcggagaagt	attggattca	gaaaagcacc	tggtagaaca
attggtcagg	gatctgaagg	ccgggagaaa	gataaaatat	tatgaaactg	caataccaaa
aaatgagaag	agagatgtca	gtgatgactg	gcaggcaggg	gacctgggtg	ttgagaagag
gccaagagtt	atccaatacc	ctgaagccaa	gacaaggcta	gccaatcacta	aggtcatgta
taactgggtg	aaacagcagc	ccgttgtgat	tccaggatat	gaaggaaaga	cccccttggt
caacatcttt	gataaaagtga	gaaaggaatg	ggactcgttc	aatgagccag	tggccgtaag
ttttgacacc	aaagcctggg	acactcaagt	gactagtaag	gatctgcaac	ttattggaga
aatccagaaa	tattactata	agaaggagtg	gcacaagttc	attgacacca	tcaccgacca
catgacagaa	gtaccagtta	taacagcaga	tggtgaagta	tataataaga	atgggcagag
agggagcggc	cagccagaca	caagtgtctg	caacagcatg	ttaaatgtcc	tgacaatgat
gtacggcttc	tgcgaaagca	caggggtacc	gtacaagagt	ttcaacaggg	tggcaaggat
ccacgtctgt	ggggatgatg	gcttcttaat	aactgaaaaa	gggttagggc	tgaattttgc
taacaaaggg	atgcagattc	ttcatgaagc	aggcaaacct	cagaagataa	cggaagggga
aaagatgaaa	gttgccctata	gatttgagga	tatagagtcc	tgttctcata	ccccagtcct
tgttaggtgg	tccgacaaca	ccagtgtgta	catggccggg	agagacaccg	ctgtgatact
atcaaagatg	gcaacaagat	tggattcaag	tggagagagg	ggtaccacag	catatgaaaa
agcggtagcc	ttcagtttct	tgctgatgta	ttcctggaac	ccgcttggtt	ggaggatttg
cctgttggtc	ctttcgcaac	agccagagac	agacccatca	aaacatgcca	cttattatta
caaagtgatg	ccaatagggg	cctataaaga	tgtaataggt	cggaatctaa	gtgaactgaa
gagaacaggc	tttgagaaat	tggcaaatct	aaaccctaagc	ctgtccacgt	tgggggtctg
gactaagcac	acaagcaaaa	gaataattca	ggactgtgtt	gccattggga	aagaagaggg
caactggcta	gttaagcccg	acaggctgat	atccagcaaa	actggccact	tatacatacc
tgataaaggc	tttacattac	aaggaaagca	ttatgagcaa	ctgcagctaa	gaacagagac
aaacccggtc	atgggggttg	ggactgagag	atacaagtta	ggtcccatag	tcaatctgct
gctgagaagg	ttgaaaattc	tgctcatgac	ggccgtcggc	gtcagcagct	gagacaaaat
gtatatattg	taaataaatt	aatccatgta	catagtgtat	ataaatatag	ttgggaccgt
ccacctcaag	aagacgacac	gcccacacag	cacagctaaa	cagtagtcaa	gattatctac
ctcaagataa	cactacattt	aatgcacaca	gcacttttagc	tgtatgagga	tacgcccgcg
gtctatagtt	ggactagggg	agacctctaa	cag		

27
12

aaaagatcta ctggtctgtg acagcatggg acgaactaga gtggtttgcc aaagcaacaa
caggttgacc gatgagacag agtatggcgt caagactgac tcaggttgcc cagacggtgc
cagatgttat gtgttaaatc cagaggocgt taacatatca ggatccaaag gggcagtcgt
tcacctocaa aagacaggtg gaganattcac gtgtgtcacc gcatcaggca caccggcttt
cttcgacctg aaaaacttga aaggatgggc gaatgaagag totanaocta cctccagcgg
gaggggtggt ggcagagtca aagtaggga agcagacctg accgagatgg caaaaataat
gagtggaa to cagaccgtct caaaaaacag gattactttg gcaacagggg tcaagaagat
aaccagcatg aacaggggag acttcaagca gataggaaga cacaagagag caggcaaaac
cacagaactc ccaaaagcag ttatagagga ctaccagtat atgagattga tattagtctc
tataccatta agggcagcgg cagagtoagt gaaagagggg gacatggcaa aacacccaag
ctctcttttt tacgggtact tctgccaaat tagatgaata cggggataac cctgggtatgt
agaatactca tacatattct tttcagagag caggtcaaaa ttggtagtca otgctatggt
tatcgggmaag atccacagat tttcagagag gagggtcaaaa tttgtatgta aactggcaat
agcaggggtcg gtgaccacaa caggtcaaaa gttccttgat gaccccaata ctgccacgcc
ggtaaatgaaa ggggaggatc ttggtagtca gttccttgat tagccccga tagccccga
agtggatgag atgaaaggca atstgttggg ttttgtacca acgagaacaa tggcagtaga
ggtagcaaaag aagctaaaag ctaagggcta taactctgga tactattaca gtggagagga
tccagccaat ctgagagttg tgacatcaca atcccootat gtaatcgtgg ctacaatgc
tattgaatca ggaagtacac accagattt ggacaoggtt gtagacaggg ggttgaatg
tgaaaagagg gtgaggggtat oatcaaaat acccttcac gtaacaggoc ttaagaggat
ggcctgact gtgggtgago agggcagcgg taggggcaga gtaggtagag tgaacccgg
gaggtattat agggcgaag aacagcaaac gagggtcaaa gactaccact atgaacctt
gcagggcaca agatacggga ttgaggatgg aatcaacgtg acgaaatcct ttaggggat
gaattacgat tggagcotat acgaggagga cagcctacta ataacccagc tgggaantact
aaataatcta ctcatctcag aagacttgc accogotgt caacagctat gaagtcagg
tgatoacca gagccaatcc aacttgcata caacagctat gaagtcagg tccoggtcct
attccaaaa ataaaggaatg gagaagtcac agacacotac gaaattact cgtttctaaa
gtctagaaag tttagggagg atgtgcccgt gtatatotac gctactgaag cgtttctaaa
ggcagttgac ctcttagggc tagactggcc tgatcctggg gtaactgaa tagtgagac
tggtaaagca ctgaagcaag tgaccgggtt gtoctcggct aaccagcagg tactagtggc
tttattttggg tatgtgggtt accaggctct catgtcccaa tgataacaga
catatatacc atcgaggacc agagaotaga cactcctcag atgcacccaa
cgccatamaa accgatggga ctggcgtcgg ctggcgtcgg gtgaogtgg
aaaaatcatg gtagccattt ctccctctatg ttaaatccca ttaaatccca
agcagaaaag ataaaaacag ctaactgagca gagaagccg caaaagggta
gttccaaaaa ttcattgact ctaactgagca gagaagccg caaaagggta
gtggggaaaca ctaactgagca gagaagccg caaaagggta
gtttgccaca ctagtgttaa gtaggtgatt ctaactgagca gagaagccg
caagcaggcg gcagttgatt acacagcaag atgaacccg caaaagggta
tgactcogag acacagcaag atgaacccg caaaagggta
ggcaacctac acatacaaaa ctttgaatta atgaacccg caaaagggta
cctggcttac ctccctctatg ctaccagcgc agaccacgt ccttccag
gagcgtggtg atactgagca ccaagatata cagaccacgt ccttccag
gagtgtgga ttgctgggtg cggggataag gtaggttggg gtaggttggg
agtatcggta ggtatatctg tgatgttggg gtaggttggg gtaggttggg
tgagtccagt gaacagaaan ggaccctact tatgaaggtg aaaccagaa
tcaggctgca acagatgagc tggtaaaaga gagactaata taocacctgt
tgaagcagtc cagacaattg gtaacccoot agagaggaca gtagaggaca
ctacaagggt tgggaggcca aggaactatc agggatggac atacggcta
attgataatg tttgaagcct tggatttgat ggcaccttt tgaccttt
cctgtccgga aattacattt ggtgggccc caacagacaa ctatttgagg
gotgaagaaa atggtactgg atgaaagctt tcaaaaatgt aggtggcaa
tgactatgag atgaaagctt tcaaaaatgt aggtggcaa taggggaca
cgggcctttc ctatgtagaa gagacctgg gagagataaa accagtagca
gtattacgat gacaaacctc gagagataaa accagtagca accagtagca
gcactactac aaaggggtca cagcaaaaat tgactacagt aaagggaaaa

virehknwil	kkirfqgnln	tkkmlnpgkl	seqldregrk	rniynhqigt	imssagirle
klpivraqtd	tktfheaaird	kidksenrqn	pelhnkillei	fhtiaqptlk	htygevtweq
leagvnrkga	agflekknig	evldsekhiv	eqlvrdlkag	rkikyetai	pknekrdvsd
dwqagdlyve	krprviqype	aktrlaitkv	mynwvkqgpv	vipgyegktp	lfnifdkvrk
ewdsfnepva	vsfdtkawdt	qvtskdliqi	geiqkyyykk	ewhkfiddit	dhmtevpvit
adgevyirng	qrgsqgpdts	agnsmnlvlt	mmygfcestg	vpyksfnrva	rihvcgddgf
litekglgik	fankgmqilh	eagkpqkite	gekmbvayrf	ediefcshtp	vpvrwsdnts
shmagrdtav	ilskmatrld	ssgergttay	ekavafsfll	myswnplvrr	icllvlsqqp
etdpskhaty	yykgdpigay	kdvigrnlse	lkrtgfevla	nlslslstlg	vtkhtskri
iqdcvaigke	egnwlvpdr	lissktghly	ipdkgftlqg	khyeqlqlrt	etnpvmgvg
eryklgpivn	lllrrkill	mtavgvss			

SEQ ID NO: 6 .

melitnelly	kykqkpvqv	eepvydqagn	plfgergaih	pqstlklphk	rgernvptsl
aslpkrgdcr	sgnskpvsg	iykpgplfy	qdykpvpyhr	aplelfeegs	mcettkrigr
vtgsdglklyh	iyicidgcit	vksatrshqr	vlrwvhnrl	cplwvtscsd	tkeegatkkk
qqkqdrlekq	rmkivpkese	kdsstkppda	tivvdgvkyq	vkkgkvksk	ntqdglyhkn
nkppesrkkk	ekallawail	avvlievtmg	enitqwnlqd	ngtegiqram	fqrgrvnrslh
giwpekictg	vpshlatdve	lktihgmmda	sektnytccr	lqrhewnkhg	wcnwyniepw
ilimnrtqan	ltegqpprec	avtcrydrds	dlnvvtqard	sptpltgckk	gknfsfagvl
trgpcnfeia	asdvlfkehe	ctgvfqtah	ylvdgvtnsl	esarqgtakl	ttwlgkqlgi
lgkklenksk	twfgayaasp	ycdvdrkigy	iwftknctpa	clpkntkiig	pgkfdtnaed
gkilhemggh	lsevllslv	vlsdfapeta	samylihfs	ipqshvdiid	cdktqlnliti
elttadvipg	svwnlgkyvc	irpdwvpyet	aavlafeevg	qvkvivlral	rdltriwnaa
tttaflvcli	kmvrgqvvgg	ilwllitgv	qghldckpey	syaiakndrv	gplgaegltt
vwkdyshemd	ledtmviawc	kggkftylsr	ctretrylai	lhrsralptsv	vfkklfegqk
qedtveshdd	fevglcpcda	kpiivrgkfst	tlngpafqm	vcpigwtgtv	scmlanrdtl
dtavvrtyrr	svpfpyrqgc	itqktlgedl	ydcalggnt	cvtgdqsryt	ggliesckwc
gykfqkseg	phypigkcr	nnetgyrlvd	dtscdregva	ivphglvkck	igdtvtqvvia
tdtklgmpmc	kpheisseg	piektactfn	ytrtlknkyf	eprdsyfqqy	mlkgdyqywf
dlevtdhhrd	yfaesilvvv	vallggryvl	wllvtymvls	eqkasgaqyg	agevmmgnl
lthdnvevvt	yffllyillr	eesvkkvll	lyhilvahpl	ksvivilmi	gdvvkadpgg
qgylgqidvc	ftmvviiiig	liiarrdpti	vplitivasl	rvtgtltyspg	vdaamaviti
tilmvsyvtd	yfrykrwlqc	ilslvsgvfl	irclihlgri	etpevtipnw	rpltlilfyl
isttvvtmwk	idlagillqg	vpilllittl	wadfltlili	lptyelvkl	yltkiktadie
kswlgglldy	rvdsiydvde	sgegvylfps	rqaqknfsm	llplvratli	scvsskwqli
ymaylsvdfm	yymhrkviie	isggtnmisr	ivaalielnw	smeeeeskgl	kkfyllsgrl
rnliikhkvr	netvagwyge	eevygmpkim	tiikastlnk	nkhciictvc	egrkwkggtc
pkcgrhgkpi	tcgmsladfe	erhykrifir	egnfegpfrq	eyngflqyta	rgqlflrnlp
ilatkvkmlm	vgnlgeevgd	lehlgwilrg	pavckkitech	erchinildk	ltaffgimpr
gttprapvrf	ptsllkvrrg	letgwaythq	ggissvdhvt	agkdllvcds	mgrtrvvcqs
nnkltdey	gvktdsgcpd	garcyvlnpe	avnisgskga	vvhlgktgge	ftcvtasgtp
affdlknkkg	wsglpifeas	sgrvvgrvk	gkneeskptk	imgiqtvsk	ntadltemvk
kitsmnrqdf	kqitlatgag	kttelpkavi	eeigrhkrvl	vliplraaae	svyqymrikh
psisfnlrig	dmkegdmag	ityasygyfc	qmpqpklaaa	mveysyifld	eyhcatpeql
aiigkihrfs	esirvvamta	tpagsvtttg	qkhpieefia	pevmegedlg	sqfldiaglk
ipvdemkgm	lvfvptrnma	vevakklak	gynagyyysg	edpanlrvt	sqspyvivat
naiesgvtlp	dldtvvdtgl	kcekrvrsvs	kipfivtgk	rmavtvgeqa	qrrgrvgrvk
pgryyrsqet	atgskdyhyd	llqaqrygie	dginvtksfr	emnydwslye	edsllitgle
ilnnllised	lpaavknima	rtdhpepiql	aynsyevqvp	vlfpkirnge	vtqtyenysf
lnarklgedv	pvyiyatede	dlavdligld	wdpnqgqv	etgkalkqva	glssaenall
valfgvygyq	alskrhvpml	tdiytiedqr	ledthlqya	pnaiktegte	telkelasgd
vekingaisd	yaagglfdvk	sqaekiktap	lfkenveaar	gyvqklidsl	iedkdviiry
glwgthtaly	ksiaarlqhe	tafatlvkw	lafggetvsv	hirqaavdlv	vyvmnkpsf
pgdtetqqeg	rrfvaslfis	alatytyktw	nynnlsvvve	palaylpyat	salkmftptr
lesvvilstt	iyktylsirk	gksdgllgtg	isaameilsq	npvsvgisvm	lgvgaiiaahn

SEQ ID: 5

malitnelly ktykqkpvqv eepvydqagd plfgergavh pqtiklphk rgerdvptnl
aslpkrqdcv sgnargpvsq iylkpgplfy qdykspvyhr splelfeegs moettkrigr
vtgedgklyh iyvcidgcli iksatrsyqr vfrvhnrid cplwvttced tkeegatkkk
tqkpdrlxrg kskivpkese kdscttkppda tivvagvkyq vrkkgktkak ntqdglyhmk
nkpqasrkkl ekallawail aivlfqvtmg enitqwnlqd ngtegiqran fqrgrvrsih
giwpekictg vpslatdie lktihgmada sektaytccr lqrhawnkhg wcnwyniepw
ilvnrvtqan lteggpprec avtcrydras dinvvtqard sptpltgckk gknfsagil
mrgpcnfeia aadvlfkabe risafqdttl ylvdgltasl egarqgtaki ttwlgkqlgi
lgkklenskak twfgaynaap yodvdrkigy lwytknctpa clpkntkivg pgkfgtnaed
gkilhemggh laevlllsiv vladfapeta svayliihfs ipqshvdmad cdkqtqnliv
elttaevipg svwnlgkyvc irpnwpyet tvvlafeevs qvklvlral rdltriwnaa
tttaflvciv kivrsgwvqg ilwllilitgv qghldckpof syaiakderi gqilgaegltt
twkayspgmk ledtawiauc edgklmlylqr ctrettrylai lhtalrptav vkklfdgrk
qedvwmndn fefglcpoda kpiivrgknt tlinqpafqm vcpigwtgtv actsfmdtli
attvrtzyrr skpfphrqqc itqnlgedl hncilggvwt cvpgdqilyk gysieschwv
gyqfkaeegl phypigkckl enetgyrlvd stscnregva ivpggtlkck igkttvqvla
mdtklgmpc rpyeiiiseg pvektactfn ytktlmkkyf eprdeyfqy mkggyqvuf
dlavtdhhrd yfaasilvvv valggryvl wlvtyavls eqkalgiqyg sgevwmagul
lthnnievtv yfllilyllir eesvkkvll lyhilvvhpi ksvivilmi qdvkadamg
qeylgkidlc fttvvlivig liiarrdpti vplvtimaal rvtelthqpg vdiavavnti
tlinwavytd yfrykklvqc ilalvsavfl iraliylgri empvrtipnw rpltlillyl
isttivrtrk vdvagillqc vplllivtli wadfltlili iptyalvkly iktvrtcte
rswlggidyt rvdaiyvda sgegvylyps rqaqgnfsi lplikatli scvaskvli
ymayltldfa ymhrkvise seggtiisr lvaalielnv smeeeskgi kkfyllsgrl
rnlikhkvz netvaswyge eevygmkim tiikastlak srhoictvc egrewtggtc
pkcgrhgkpi tccmsladfe erhykrifir egnafegmoar oqgkhrfem drepksaryc
seemrlhpae egdfwaesam lglkityfal mdgkvydite wagoqrvgis pdthrvpchi
sfgrampfrq eynqfvqyta rglflrnlp vlatkvmlm vgnlgaaign lehlgwilyg
pavckkith ekchinildk ltaffgimpr gttprapvrf ptallkvrrg letawaythq
ggissvdhvt agkdllvods mgrtrvvcqs nrxltdeyey gvktdagcpd garcyvinpe
svniagskga vvhkqktgga ftevtasgtp affdlnkkg veglplfeas agrvgrvkv
gmeeesqtk imaqiqtvak nraditawvk kitamrgdf kqitlatgag ktteipkavi
eeigrhkrvl vliplrass svyqyarikh paisfnlrig dakagdmag ityasyyyc
qmpqkiras mveysyifld eyhcatpeql aiaqkihrfs esirvanta tpagvtttg
qkhpiefia pevmbgedlg sqfldiaglk ipvdeakgm lvfvptrma vevakkikak
gynagyyysg edpanlrvt sqsyyvivat naiesgvtip dldtvidtgi kcekrvrva
kipfivtqli mnavtvgega qzrgvrvrk pgzyrasat atgskdyhyd llaqagryie
dginvtkufr emnydwslve edellitgle innallised lpaavknime rtdhpepiql
ayneyevqvp vlfpkirnga vtdtyenyaf lnarklgedv pyiyatode dladvllgld
wpdpnqgqv etgkalkqvt glassenall valfgyygyq alskrhvpmi tdiytiedqr
ledtthlqya pnaiktgdte talkeasgd vekimgaiad yaaggleafv squeakikta
lfknaeasak gyvqkfidsi lenkeeiiry glwgthtaly ksiaarlghe tafatlvikv
lafggesvad hvkqaavdlv vyyvankpsf pgsdetqqeg xrfvaalfis alatytyktv
nyhnlakvve palaylpyat salkmftptr leavvilstt iyktylsark gkedgllgtg
issaneillas npvsvgievm lgvgaiaahn aiesseqkrt llnkvfvknf ldqaatdelv
kenpekima lfeavqtign pirllyhlyg vyykgweake leertagrpi ftlimfeafe
llgmdagqki rnlsgnyild liyglbkqin rglkkmvlgw spapfscdwt pederiript
dnylrvtetrc pcgyamakfk avggkltkve eaggplcmr pgrgpnvyrv tkyyddnlre
ikpvakleqg vahyykgvta kidyskgkal latdkwevah gvitrakry tgvqfngayl
gdapnhrailv erdcattikm tvqflmkkg caftyditis nltrelvkh rnnleekaip
tatvttwlay tfvnedvgti kpvlgervip dpvvdinlq evqvdtsavg itiigretlm
ttgvtpvlek vepdasdcqn avkigldagn ypgpgiqtht ltecihards rpfimilger
nsienrakta rninlytgnd prairdlmas gmlvvalrd vdpelssavd fhgtfldrea
lealslgqpk pkqvtkesvr nlieqkkdve ipnwfasddp vflavalknd kyylvgdvge
lkdqakalga tdqtriikev gartyamkle swflkasnkq maltplfeel llrcppatke
nkghmasayq laqgnwepig cgvhlgtipa rrvkihpyea ylkklkfise eekkrvkd

23
24

aiessseqkrt llnkvfvknf ldqaatdelv kenpekima lfeavqtign pirliyhlyg
vyykgweake lsertagrni ftlimfeafe ligmdsegki rnlsgnyild lihglhkqin
rglkkivlgw apapfscdwt pederiript daylrvetkc pogyemkalk nvsqkitkve
esgpficrnz pgrgpnvnyrv tkyyddnlre irpvaklegq vahyykgvta ridyskgkttl
latdkweveh gtltzrltkry tgvqfrgayl gdepohrdlv erdcattitkn tvqfllmkkq
caftydltis nltrlielvh rnalookaip tatvttwlay tfvnedvgti kpvlgervip
dpvvdinlqp evqvdtsevg itligkaava ttgvtpvmaek vepdttdmqs svkigldegn
ypggpgvqtht lveeihnkda rpfimvlgek samsrakta rninlytgnd preirdmae
grilvalrd idpdliselvd fkgtfldrea lealslgqpk pkqvtkasir dlikeexqve
ipdwfteddp vfldiamkhd kyhligdvea vldqekalga tdqtrivkev gertytnkle
svfiqasakq maltpifeal ilroppatks nkgbmssayq laqgnwepig cgvhlgtvpa
zrvkmhpyea yllkkdlves eekkpriidt virehknvil kkikfggnln tkkmlnpgkl
seqldregbk rniynnqist vnasagirla kipivraqtd tksfheaird kidkneorqn
pelhmkllai fhtiadpalk htygevtveq leaginrkga agfleknig evldsekhly
eqldrdikag rkiryyetai pknekrdsed dwagadlvde kkpriqvype aktrlatitkv
mynwvkqppv vipgyegktp lfnifnkvrk ewdlfnepva vafdtkawdt qvtardlhl
gaiqkyyyrk ewhkfiddit dhavexpvit adgevyirng qrgagqpdtz agnamlvlt
miyafceatg vpykafurva kihvcgddgf litekglgik fankgagilh eaghpqkile
gekukvaykf adiefcahtp vpvrvsdnts symagrdtav ilekmatrid esgergttay
ekavafefll myswnplvrr icllivlsqrp etapstqTTY yykgdpigay hdvigrnise
lkrtgfekle alalaletlg lvtkhtskri iqdcvaigka egwlvnadr lisektghly
ipdkgftlqg khyeqllga etapvagvgt eryklgpiyn lllrrlkvll naavgass

SEQ ID NO: 7
cgtggcttcttgggtacggg

SEQ ID NO: 8
agcgggtatattgtacaaagcca

SEQ ID NO: 9
tgcaagatctgtgaagggaagaa

SEQ ID NO: 10
tgcaatgtatgtgagggccgagag

24
25**Campo de la Invención**

La presente invención se refiere generalmente a vacunas adecuadas para la administración a animales frente a infecciones víricas. Más específicamente, la presente invención se refiere a vacunas seguras y métodos para preparar dichas vacunas. Las vacunas de la presente invención contienen al menos dos virus mutantes vivos de la misma familia o moléculas de ácido nucleico que codifican dichos virus, en las que cada uno de los virus o los ácidos nucleicos codificadores contiene una mutación que confiere un fenotipo deseable y la mutaciones en los virus están en el mismo sitio genómico, de manera que los virus mutantes no pueden recombinarse el uno con el otro para eliminar las mutaciones.

Fundamento de la Invención

La familia vírica *Flaviviridae* consiste en los géneros *Pestivirus*, *Flavivirus* y *Hepacivirus*. El género *Pestivirus* está representado por las especies del virus de diarrea vírica Bovina 1 (BVDV-1), BVDV-2, virus de la peste porcina clásica y virus de la enfermedad de Border. Los viriones de los miembros de la familia encapsulan genomas de RNA de hebra positiva de aproximadamente 9,5 a 12,3 kb. Los RNA genómicos contienen largas estructuras contiguas de lectura abierta (ORF) que se traducen en poliproteínas que se procesan mediante proteasas celulares y víricas para dar lugar a las proteínas víricas maduras. Para los miembros de *Pestivirus*, el ORF codifica una poliproteína de aproximadamente 3900 aminoácidos que se procesa de manera co-traslacional y post-traslacional a las siguientes proteínas víricas maduras (de 5' a 3'): N^{pro}, C, E^{pro}, E1, E2, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

Entre algunos miembros de *Pestivirus* se encuentran dos biotipos basados en su efecto en las células de cultivo de tejido, llamados citopatogénico (citopático o cp) y no citopatogénico (no citopático o ncp). Los análisis del genoma revelan inserciones de secuencias celulares, algunas veces acompañadas por duplicación de secuencias virales, reagrupamientos genómicos y/o eliminaciones de secuencias virales en los genomas de pestivirus cp, aunque no en los RNA de los correspondientes pestivirus ncp. Esto sugiere que los pestivirus cp se desarrollan a partir de los pestivirus ncp mediante recombinación de RNA.

El BVDV es un patógeno del ganado ampliamente distribuido. El BVDV-1 normalmente produce sólo diarrea ligera en animales inmunocompetentes, mientras que el BVDV-2 puede producir trombocitopenia, hemorragias y enfermedad fatal aguda. El BVDV es capaz de cruzar la placenta de ganado preñado y puede dar por resultado el nacimiento de terneros infectados de forma persistente (PI) (Malmquist, *J. Am. Vet.*

Med. Assoc. 152:763-768 (1968); Ross, et al., *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188:618-619 (1986)). Los terneros virémicos son inmunotolerantes al virus y virémicos de manera persistente para el resto de sus vidas. Proporcionan una fuente para la epidemia de enfermedad de mucosa (Lless, et al., *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 81:481-487 (1974)) y
5 están altamente predispuestos a la infección con microorganismos que provocan enfermedades tales como neumonía y enfermedad entérica (Barber, et al., *Vet. Rec.* 117:459-464 (1985)). Pueden extraer virus de cualquier genotipo como uno de los dos biotipos, cp o ncp. El fenotipo cp correlaciona con la expresión de NS3, ya que las células infectadas con BVDV, o bien cp o ncp, expresan ambas el NS2-3, mientras que el
10 NS3 se detecta sólo después de la infección con BVDV cp. El NS3 es colineal a la parte C-terminal del NS2-3. La expresión del NS3 parece ser un resultado de alteraciones genómicas observadas para el BVDV cp.

Las vacunas virales disponibles en la actualidad incluyen vacunas virales muertas o de vida atenuada, vacunas de vectores vivos, vacunas de sub-unidades y vacunas de DNA o RNA. Véase Roth et al., "New Technology For Improved Vaccine Safety And Efficacy", *Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice* 17(3):585-597 (2001). La atenuación de los virus puede lograrse mediante radiación UV, tratamiento químico, o alto paso en serie *in vitro*. El número, posición y naturaleza de las mutaciones inducidas por estos métodos son desconocidas ausentes los análisis de secuencia
20 genómica. La atenuación puede lograrse también haciendo alteraciones genéticas definidas, por ejemplo, la eliminación específica de secuencias virales conocidas por provocar virulencia, o la inserción de secuencias en el genoma viral. Una preocupación respecto al uso de vacunas virales de vida atenuada es que los virus mutantes atenuados tienen el potencial de recombinarse *in vivo* para eliminar la(s) mutación(es)
25 atenuante(s), restaurando así la virulencia. Por ejemplo, en presencia de una cepa de campo virulenta (tipo salvaje), los virus atenuados que tienen eliminaciones en el genoma viral tienen el potencial de recombinarse con la cepa virulenta para restaurar la secuencia eliminada. Véase, por ejemplo, Roth et al., *supra*. Los pestivirus citopáticos que tienen inserciones celulares se han observado que también dan lugar a virus no
30 citopáticos en cultivo celular mediante la eliminación de las secuencias celulares, posiblemente mediante la recombinación de RNA. Véase, por ejemplo, Baroth et al., "Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus", *Virology*, 278(2):456-66, (2000), y Becher et al., "RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease", *Journal of Virology* 75(14):6256-65 (2001). Donde se desea incluir dos virus mutantes atenua-

dos de la misma especie, género o familia en una composición de vacuna, hay una preocupación de que los dos virus puedan recombinarse en el animal vacunado eliminando así las mutaciones atenuantes. Véase, por ejemplo, Glazenburg et al., "Genetic recombination of pseudorabies virus: evidence that homologous recombination between Insert sequences is less frequent than between autologous sequences", *Archives of Virology*, 140(4):671-85 (1995).

Permanece una necesidad de desarrollar vacunas seguras y eficaces que protejan a los animales frente a infecciones víricas.

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona vacunas seguras que contienen al menos dos virus mutantes vivos de la misma familia o moléculas de ácido nucleico que codifican dichos virus, en las que cada virus o el ácido nucleico codificador contiene una mutación que confiere un fenotipo deseable, y las mutaciones en los virus están en el mismo sitio genómico, de manera que los virus mutantes no puedan recombinarse el uno con el otro para eliminar las mutaciones.

La presente invención proporciona también un método para preparar una vacuna viral segura seleccionando o construyendo dos o más virus mutantes vivos de la misma familia, género o especie, en el que cada virus contiene una mutación que confiere un fenotipo deseable, y las mutaciones en los virus reside en el mismo sitio genómico, de manera que los virus mutantes no pueden sufrir recombinación de homólogos para eliminar las mutaciones.

La presente invención proporciona además un método para proteger a un animal frente a infecciones víricas administrando al animal una composición de vacuna de la presente invención.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1. Alineación de las inserciones celulares y secuencias virales de flanco de las regiones NS2-3 de la cepa BVDV-1 NADL y la cepa BVDV-2 53637.

Descripción Detallada de la Invención

Únicamente se ha reconocido de acuerdo con la presente invención que los virus mutantes vivos de la misma familia que contienen mutaciones en el mismo sitio genómico de los virus, no pueden recombinarse con cualquier otro para eliminar las mutaciones.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona composiciones de vacuna seguras que contienen al menos dos, es decir, dos o más, virus mutantes vivos de la misma familia, o moléculas de ácido nucleico que codifican di-

chos virus, en los que las mutaciones en los virus están en el mismo sitio genómico, de manera que los virus mutantes no pueden recombinarse el uno con el otro para eliminar las mutaciones.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar una vacuna viral segura, como se describe en adelante. De forma específica, una vacuna segura se prepara seleccionando o construyendo dos o más virus mutantes vivos de la misma familia, género o especie, en la que cada virus contiene una mutación que confiere un fenotipo deseable (por ejemplo, atenuación de la virulencia, alteración de tropismo celular o biotipo, alteración del tropismo de la especie, o expresión de un módulo de genes extraños), y las mutaciones en los virus están en el mismo sitio genómico, de manera que los virus mutantes no pueden sufrir recombinación de homólogos el uno con el otro para eliminar las mutaciones.

El término "vacuna" o "composición de vacuna" se refiere a una composición que contiene virus mutantes vivos que, mediante inoculación en un animal, induce una inmunidad completa o parcial a la versión patogénica de los virus o alivia los síntomas de enfermedades provocadas por las versiones patogénicas de los virus. Los efectos protectores de una composición de vacuna frente a un virus se alcanzan normalmente induciendo en el sujeto una respuesta inmune, o bien una respuesta inmune mediada por células o humoral, o una combinación de ambas. Hablando generalmente, las incidencias eliminadas o reducidas de infección vírica, la mejora de los síntomas o la eliminación acelerada de los virus de los sujetos infectados, son indicativas de los efectos protectores de la composición de vacuna.

Por "animal" se pretende incluir pájaros, por ejemplo, pollos, pavos, aves acuáticas domésticas, y cualquier mamífero, por ejemplo, ganado vacuno, oveja, cerdo, cabras, perros, gatos y caballos.

La terminología "virus", "aislados virales" o "cepas virales" como se usa en este documento, se refiere a partículas virales o viriones que contienen DNA o RNA genómico vírico, proteínas asociadas y otros constituyentes químicos (tales como lípidos).

Por "molécula de ácido nucleico que codifica un virus" o "molécula de ácido nucleico de un virus" se entiende la molécula de ácido nucleico genómico del virus, o bien en forma de RNA o de DNA.

Por "mutación" se pretende incluir la eliminación, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos, o una de sus combinaciones. De acuerdo con la presente invención, la mutación confiere preferiblemente un fenotipo deseable, por ejemplo, atenuación de la virulencia, alteración del tropismo celular o biotipo, alteración del tropismo

28
29

de la especie o expresión de un módulo de gen extraño. Las mutaciones especialmente preferidas son mutaciones que confieren virulencia atenuada.

Por "atenuación" se entiende que el virus ha perdido algo o toda su capacidad de proliferar y/o provocar enfermedad en un animal infectado con el virus. Por ejemplo,
5 un virus atenuado puede ser un virus que no es capaz de replicarse del todo o está limitado a uno o a algunos círculos de replicación, o restringido en el troplasma celular o de tejido, cuando está presente en un animal en que una versión patogénica de tipo salvaje del virus atenuado pueda replicarse.

Un virus atenuado puede tener una o más mutaciones en un gen o genes que
10 están implicados en la capacidad patogénica del virus. Dichas mutaciones también se refieren en este documento como "mutación(es) atenuante(s)". Un virus atenuado puede producirse a partir del virus patogénico de tipo salvaje mediante radiación UV, tratamiento químico, o el alto paso en serie de virus patogénico de tipo salvaje *in vitro*. De manera alternativa, un virus atenuado puede producirse a partir del virus patógeno
15 de tipo salvaje, haciendo una eliminación específica de secuencias virales conocidas para conferir virulencia, inserción de secuencias en el genoma viral, o haciendo mutaciones en uno o más puntos en el genoma vírico. Un virus atenuado puede ser un aislado vírico obtenido de un animal, cuyo aislado se deriva de la versión patogénica de tipo salvaje del virus a través de acontecimientos diferentes a medios artificiales, por
20 ejemplo, acontecimientos que han ocurrido en un animal anfitrión tal como la recombinación.

Los dos o más virus mutantes vivos presentes en las composiciones de vacuna de la presente invención contienen mutaciones que están en el mismo sitio genómico. Por "mismo sitio genómico" se entiende que cuando las secuencias genómicas de nucleótidos de los virus se alinean, las mutaciones en los genomas víricos traslapan con
25 cualquier otra tal que no hay oportunidad para la recombinación de homólogos entre los genomas víricos para eliminar las mutaciones. En otras palabras, cuando las secuencias genómicas de nucleótidos de los virus se alinean, hay al menos una parte contigua de las secuencias alineadas donde las secuencias en los genomas víricos
30 alineados son secuencias mutantes. Hay un número de programas informáticos que comparan y alinean secuencias de ácidos nucleicos que puede usar un experto en la técnica. Las secuencias se alinean con propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una secuencia de ácido nucleico para la óptima alineación con una segunda secuencia de ácido nucleico). Por ejemplo, los programas
35 NBLAST y XBLAST como se describen en Altschul, et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-

410, el programa Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, y el programa PSI-Blast como se describe en Altschul et al., 1997, *supra*. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Generalmente hablando, el concepto de la presente invención, es decir, incluyendo en la misma composición de vacuna dos o más virus mutantes vivos de la misma familia que tienen mutaciones en el mismo sitio genómico, se aplica a virus mutantes de cualquier familia donde los genomas víricos tienen suficiente identidad secuencial para permitir la recombinación de homólogos. Se ha mostrado que una identidad de nucleótidos tan corto como 15 nucleótidos puede llevar a la eficaz recombinación de homólogos (Nagy y Bujarski, *J. Virol.* 69:131-140, 1995).

La presente invención se aplica especialmente a virus de la familia *Flaviviridae*. La familia *Flaviviridae* consiste en los géneros *Pestivirus*, *Flavivirus* y *Hepacivirus*. Los viriones de los miembros de la familia *Flaviviridae* encapsulan genomas RNA de hebra positiva de aproximadamente 9,5 a 12,3 kb. Los RNA genómicos que contienen largas estructuras contiguas de lectura abierta, que se traducen en poliproteínas que se procesan mediante proteasas celulares y víricas para dar lugar a las proteínas víricas maduras.

Preferiblemente, los virus mutantes de la composición de vacuna de la presente invención son del mismo género, de especies o bien iguales o diferentes.

En una realización preferida, la composición de vacuna de la presente invención contiene dos o más virus mutantes vivos del género *Pestivirus*. El género *Pestivirus* se representa por las especies del Virus de Diarrea Vírica Bovina Tipo 1 (BVDV-1), Virus de Diarrea Vírica Bovina Tipo 2 (BVDV-2), virus de peste porcina clásica y virus de la enfermedad de Border. El ORF codifica una poliproteína de aproximadamente 3900 aminoácidos, que se procesa de forma co-translacional y post-translacional a las siguientes proteínas víricas maduras (de 5' a 3'): N^{pro}, C, E^{pro}, E1, E2, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

Normalmente, el BVDV tiene un genoma en forma de RNA. El RNA puede transcribirse en forma inversa a DNA para usar en la clonación. Así, las referencias hechas en este documento a secuencias de ácido nucleico y BVD viral abarcan tanto secuencias de RNA como secuencias de DNA vírico derivadas de las secuencias de RNA vírico. Por conveniencia, las secuencias genómicas de BVDV como se representan en el LISTADO DE SECUENCIA posterior, sólo se refieren a las secuencias de

DNA. La secuencia de RNA correspondiente para cada uno es fácilmente aparente para los expertos en la técnica.

En una realización más preferida, la composición de vacuna de la presente invención contiene un BVDV-1 citopático y un BVDV-2 citopático, en los que las mutaciones en ambos virus asociadas con el biotipo citopático están en el mismo sitio genómico, por lo que los dos virus mutantes no pueden recombinarse para eliminar las mutaciones.

BVDV-1 y BVDV-2 representan dos genotipos estrechamente relacionados de BVDV. Las secuencias de nucleótidos de los dos virus oscilan aproximadamente en el 70% de la identidad sobre el genoma total, y un porcentaje de identidad ligeramente superior dentro de la región NS2-3. Se cree que el porcentaje de identidad entre los genomas virales de BVDV-1 y BVDV-2, al menos en la región NS2-3, es suficiente para permitir la recombinación de homólogos.

Los BVDV-1 normalmente producen sólo diarrea ligera en los animales, mientras que los BVDV-2 son virus con alta virulencia que pueden producir trombocitopenia, hemorragias y enfermedad fatal aguda (Corapi et al., *J. Virol.* 63:3934-3943; Bolln et al., *Am. J. Vet. Res.* 53:2157-2163; Pellerin et al., *Virology* 203:260-268, 1994; Ridpath et al., *Virology* 205:66-74, 1994; Carman et al., *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:27-35, 1998). Los dos tipos de virus tienen distintas antigenicidades determinadas por un panel de Mab y por neutralización cruzada usando antisuero específico para el virus obtenido en animales (Corapi et al., *Am. J. Vet. Res.* 51:1388-1394, 1990). Los virus de cualquier genotipo pueden existir como uno de los dos biotipos, citopatogénico (citopático o cp) o no citopatogénico (no citopático o ncp). Los virus cp inducen efectos citopáticos (por ejemplo, lisis celular) en células cultivadas, mientras que los virus no citopáticos no.

Es deseable preparar vacunas que proporcionen protección tanto frente a BVDV-1 como a BVDV-2. Sin embargo, por el alto grado de identidad secuencial entre los dos virus, hay una posibilidad de que un BVDV-1 citopático vivo y un BVDV-2 citopático vivo incluidos en la misma composición de vacuna pudieran recombinarse uno con el otro en el animal vacunado para dar virus no citopáticos. Se ha documentado la recombinación entre BVDV-1 y BVDV-2. Véase, por ejemplo, Ridpath et al., *Virology* 212:259-262 (1995). La infección del feto en una vaca preñada con virus ncp antes de desarrollarse la inmunocompetencia puede dar por resultado que el feto permanezca virémico a lo largo del periodo de gestación y el posterior nacimiento de un ternero que permanece virémico de forma persistente. Dicho ternero puede morir de enfermedad

8
32

mucosa por superinfección con un BVDV cp. Por consiguiente, las composiciones de vacuna proporcionadas mediante la presente invención, que contiene BVDV-1 cp vivo y BVDV-2 cp vivo que tienen mutaciones en el mismo sitio genómico, son especialmente deseables para proteger animales tanto frente a BVDV-1 como a BVDV-2.

5 En una realización, los aislados de BVDV cp obtenidos a partir de animales, pueden usarse en la composición de vacuna de la presente invención. Los aislados cp tanto de BVDV-1 como de BVDV-2 se han presentado y están disponibles para los expertos en la técnica, por ejemplo, BVDV-1 NADL (ATCC n° VR-1422 o VR-534), BVDV-2 cepa 53637 (depositada con el ATCC como PTA-4859), y aislados de campo
10 tipo 2 tales como los descritos por Riddpath y Neill, *J. Virol* 74:8771-8774 (2000). Los aislados cp presentados tan lejos, contienen típicamente una inserción de una secuencia heteróloga, por ejemplo, una secuencia que codifica la ubiquitina (número de adquisición del Genbank M98887 o De Moerloose et al., *J. Gén. Virol.* 74:1433-1438 (1993)), una secuencia que codifica la NEDD8 bovina (Baroth et al., *supra*), o una
15 secuencia que codifica el *DnaJ1 Bos taurus* (como se describe en los Ejemplos posteriores), entre otros.

En otra realización, un BVDV cp se genera haciendo alteraciones definidas en el genoma de BVDV, por ejemplo, eliminando secuencias virales específicas, insertando secuencias en un sitio genómico viral específico, o haciendo una o más sustituciones,
20 o sus combinaciones.

Donde se genera un BVDV cp insertando una secuencia heteróloga (es decir, extraña al virus) en un sitio genómico específico, la naturaleza de la secuencia a insertar generalmente no es crítica para la presente invención. Además, la inserción no está limitada a cualquier sitio particular mientras la inserción de por resultado un fenotipo
25 atenuado. Ya que las secuencias heterólogas en aislados cp se encuentran a menudo en la región NS2-3, la región NS2-3, especialmente la parte circundante al sitio putativo de división de NS2-3 que corresponde a, por ejemplo, residuos de aminoácidos n° 1679 a n° 1680 de la cepa BVDV-1 NADL (la numeración se basa en la secuencia genómica publicada con n° de adquisición del Genbank M31182, SEQ ID NO: 4), es una
30 posición preferida para las inserciones.

Un BVDV-1 cp puede generarse haciendo una alteración genómica definida que imita la mutación identificada en un aislado de BVDV-2 cp obtenido de un animal, de modo que estos virus tengan mutaciones asociadas con el biotipo cp en el mismo sitio genómico. De manera similar, un BVDV-2 cp puede generarse por medio de ge-

nerar una alteración genómica definida que imite la mutación identificada en un aislado de BVDV-1 cp obtenido de un animal.

En una realización preferida, la composición de vacuna de la presente invención contiene NADL (un aislado de BVDV-1 cp) y BVDV-2 53637 (un aislado de BVDV-2 cp), donde cada uno de los dos aislados de cp contienen una mutación en el mismo sitio genómico que da por resultado el biotipo citopático. La secuencia genómica de la cepa BVDV-1 NADL se propone en SEQ ID NO: 4, y la cepa BVDV-2 53637 se depositó con el ATCC como PTA-4859. Ambos aislados contienen una inserción en la región NS2-3. El BVDV-1 cp atenuado contiene una inserción de una secuencia 3' de la timidina que codifica DnaJ1 *Bos taurus* en la posición de nucleótido n° 4993 (numeración de la secuencia de NADL), que es el tercer nucleótido del codón que codifica el residuo de glicina en la posición de aminoácido 1536. El BVDV-2 cp atenuado contiene una inserción de una secuencia que codifica DnaJ1 *Bos taurus* en el mismo sitio genómico.

Según la presente invención, los aislados de BVDV cp empleados en la presente composición de vacuna se han atenuado y son por lo tanto no patogénicos. Se conocen métodos de atenuación por los expertos en la técnica y también se describen más tarde.

En otra realización, la composición de vacuna de la presente invención contiene un BVDV-1 atenuado y un BVDV-2 atenuado, en los que las mutaciones atenuantes en ambos virus están en el mismo sitio genómico, de manera que los dos virus mutantes no pueden recombinarse para eliminar las mutaciones atenuantes.

Un BVDV atenuado se genera por radicación UV, tratamiento químico o alto paso en serie de la versión patogénica de los virus *in vitro*. El análisis de la secuencia puede llevarse a cabo para determinar la naturaleza y la posición genómica de mutaciones generadas por estos métodos. La mutación puede estar en forma de eliminación, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos, o una de sus combinaciones. De forma alternativa, un BVDV atenuado se genera haciendo alteraciones definidas en el genoma del BVDV, por ejemplo, eliminando secuencias virales específicas, insertando secuencias en un sitio genómico viral específico o haciendo una o más sustituciones, o sus combinaciones.

Como se describe anteriormente, los virus mutantes vivos para usar en la composición de vacuna de la presente invención pueden ser de la misma familia, género o especie, donde los genomas virales tienen suficiente identidad de secuencia para permitir la recombinación de homólogos. Ejemplos adicionales de combinaciones de

~~38~~
34

virus apropiadas para usar en la composición de vacuna de la presente invención incluyen, aunque no están limitados a, combinaciones de diferentes tipos de virus de la polio, combinaciones de múltiples cepas mutantes vivas del virus de la bronquitis infecciosa, combinaciones de múltiples cepas mutantes vivas del virus de la enfermedad de Newcastle, combinaciones de adenovirus-1 canino y adenovirus-2 canino, combinaciones del virus-1 del herpes equino y del virus-4 del herpes equino, combinaciones de múltiples cepas mutantes vivas del virus de la gripe, combinaciones de múltiples cepas atenuadas vivas del calicivirus felino, combinaciones de múltiples serotipos de Rotavirus, combinaciones de múltiples serotipos de Rinovirus, combinaciones de múltiples serotipos del virus de la Fiebre aftosa, combinaciones de los genotipos Europeo y Norteamericano del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino, combinaciones de las cepas patrón y variante del virus de la bursitis infecciosa.

De acuerdo con la presente invención, aunque las partículas víricas son la forma preferida para usar en las vacunas, las moléculas de ácido nucleico que codifican virus mutantes de la misma familia, género o especie, pueden usarse directamente en vacunas también. La molécula de DNA o RNA puede estar presente en una forma "desnuda" o puede estar combinada con un agente que facilita la absorción celular (por ejemplo, liposomas o lípidos catiónicos). Las vacunas y los procedimientos de vacunación que utilizan ácidos nucleicos (DNA o mRNA) se han descrito bien en la técnica, por ejemplo, Patente de EE.UU. nº 5.703.055, Patente de EE.UU. nº 5.580.859, Patente de EE.UU. nº 5.589.466, Publicación de Patente Internacional WO 98/35582, y por Ramsay et al., 1997, *Immunol. Cell Biol.* 75:360-363; Davis, 1997, *Cur. Opinion Biotech.* 8:635-640; Manickan et al., 1997, *Critical Rev. Immunol.* 17:139-154; Robinson, 1997, *Vaccine* 15(8):785-787; Robinson et al., 1996, *AIDS Res. Hum. Retr.* 12(5):455-457; Lal y Bennett, 1998, *Critical Rev. Immunol.* 18:449-484; y Vogel y Sarver, 1995, *Clin. Microbiol. Rev.* 8(3):408-410, todos los cuales se incorporan en este documento por referencia.

Además de dos o más virus mutantes vivos de la misma familia, género o especie, las composiciones de vacuna pueden incluir otros componentes antigénicos. Otros componentes antigénicos apropiados para usar de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque no están limitados a, antígenos preparados a partir de bacterias patogénicas tales como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus anthracis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma Bovis*, *Mycoplasma galanaceum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycobacterium Bovis*, *Myco-*

33
35

- bacterium paratuberculosis*, *Clostridial spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Listeria monocytogenea*, *Rickettsia rickettsii*, *Borrelia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Chlamydia spp.*, *Brucella spp.*, *Vibrio spp.*, *Salmonella enterica* serovars, *Leptospira spp.*, hongos patógenos tales como *Candida*, protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora canium*, *Toxoplasma gondii*, *Elmeria spp.*, *Babesia spp.*, *Giardia spp.*, helmintos tal como *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Fasciola*; o bien en la forma de un preparado celular inactivado total o parcial, o en la forma de moléculas antigénicas obtenidas por técnicas de Ingeniería genética o síntesis química. Antígenos adicionales incluyen virus patógenos tales como virus de la enfermedad de Marek, virus de la bursitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la anemia del pollo, virus de la viruela de las aves de corral, virus de leucosis aviar, virus de laringotraqueitis infecciosa, virus reticuloendotelial, parvovirus canino, virus del moquillo canino, virus del herpes canino, coronavirus canino, parainfluenza-5 canina, virus de panleucopenia felina, virus del herpes felino, calicivirus felino, virus de inmunodeficiencia felina, virus de peritonitis infecciosa felina, virus del herpes equino, virus de arteritis equina, virus de anemia infecciosa equina, virus de encefalitis equina oriental, virus de encefalitis equina occidental, virus de encefalitis equina venezolana, virus del Nilo occidental, virus de gastroenteritis transmisible, coronavirus bovino, virus-1,3,6 del herpes bovino, virus de parainfluenza bovina, virus sincitial respiratorio bovino, virus de leucosis bovina, virus de la peste bovina, virus de la fiebre aftosa, virus de la rabia, virus de la fiebre del cerdo Africano, parvovirus porcino, virus PRRS, circovirus porcino, virus de la gripe, virus de la enfermedad vascular porcina, virus de la fiebre de Techén, virus de la pseudorabia, o bien en la forma de preparado vírico (atenuado) vivo modificado, un preparado de virus inactivado total o parcial, o en la forma de moléculas antigénicas obtenidas por técnicas de Ingeniería genética o síntesis química. Cuando se usan virus vivos atenuados adicionales, dichos virus adicionales serían preferiblemente de una familia diferente de aquella de los dos virus atenuados principales, como se describe anteriormente.
- En una realización preferida, la presente invención proporciona una composición de vacuna que contiene un BVDV-1 cp atenuado derivado de la cepa BVDV-1 NADL, un BVDV-2 cp atenuado derivado de la cepa BVDV-2 53637, donde cada uno de los dos alelos cp contienen una mutación asociada con el biotipo cp en el mismo sitio genómico, y al menos uno (es decir, uno o más) de los siguientes componentes antígenos, o bien en forma inactivada o viva modificada: virus-1 del herpes bovino,

34
36

virus sincitial respiratorio bovino, virus-3 de parainfluenza, *Campylobacter fetus*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Lectospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, o *Mannheimia haemolytica*.

Además, las composiciones de vacuna de la presente invención pueden incluir uno o más vehículos veterinariamente aceptables. Como se usa en este documento, "un vehículo veterinariamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina entre otros. Las composiciones de vacuna pueden incluir además uno o más agentes inmunomoduladores distintos tales como, por ejemplo, interleuquinas, interferonas y otras citoquinas.

Adyuvantes adecuados para usar en las composiciones de vacuna incluyen, aunque no están limitados a, el sistema adyuvante RIBI (Ribi inc.), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes completo e incompleto de Freund, co-polímero de bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adyuvante AMPHIGEN, saponina, Quil A, colesterol, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), u otras fracciones saponinas, lípido A monofosforilo, adyuvante lípido-amina Avridine, enterotoxina móvil al calor de *E. Coli* (recombinante o de otra forma), toxina del cólera o di péptido de muramilo, entre muchos otros.

Típicamente, un virus mutante vivo está presente en una vacuna en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 partículas de virus por dosis, con un vehículo veterinariamente aceptable, en un volumen de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5 ml. La cantidad precisa de un virus en una composición de vacuna eficaz para proporcionar un efecto protector puede determinarse por un veterinario experto. Donde se usa la molécula de DNA o RNA del virus en la vacuna, la cantidad de los ácidos nucleicos estarían generalmente entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 5,0 mg/ml.

Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden hacerse de diversas formas dependiendo de la ruta de administración. Por ejemplo, las composiciones de vacuna pueden hacerse en forma de disoluciones o dispersiones acuosas estériles adecuadas para uso inyectable, o hacerse en formas liofilizadas usando técnicas

38
37

de secado por congelación. Las composiciones liofilizadas se mantienen típicamente a aproximadamente 4°C, y pueden reconstituirse en una disolución de estabilización, por ejemplo, solución salina o/y HEPES, con o sin adyuvante.

5 Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden administrarse a un animal para tratar o prevenir una enfermedad provocada por las versiones patogénicas de los virus en las composiciones de vacuna. Por lo tanto, los métodos de vacunación de un animal frente a una enfermedad provocada por un virus también se proporcionan por la presente invención.

10 En la práctica de los métodos actuales, una composición de vacuna de la presente invención se administra a un animal preferiblemente por medio de rutas parenterales, aunque pueden usarse también otras rutas de administración, tal como por ejemplo, por administración oral, intranasal, intramuscular, dentro del nodo linfático, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, rectal o vaginal, o por una combinación de rutas. Pueden necesitarse regímenes de estimulación y el régimen de dosificación
15 puede ajustarse para proporcionar una vacunación óptima.

La presente invención se ilustra adicionalmente por, aunque de ningún modo limitado a, los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

Determinación De La Posición De La Inserción Celular En La Cepa BVDV2 53637

20 Se determinó una parte de la secuencia de la región NS2-3 de BVDV2-53637 para identificar y trazar un mapa de la posición de cualquier inserción celular en la región. Un producto RT-PCR de 670 bases se amplificó a partir del RNA viral, usando un iniciador directo 53637U1 (5'-CGTCCACAGATGGTTTGGT-3'; SEQ ID NO: 1) y un iniciador inverso 53637L (5'-GGCTATGTATTGGACGTAACCC-3'; SEQ ID NO: 2). El
25 producto RT-PCR se purificó y se sometió a análisis secuencial (SEQ ID NO: 3). Cuando se alineó con BVDV1-NADL (número de adquisición del Genbank M31182, SEQ ID NO: 4), se observaron similitudes llamativas (FIGURA 1). Ambos virus contenían una inserción en la estructura derivada del gen *DnaJ1 Bos taurus*. En el caso de NADL, la inserción era de 90 aminoácidos (270 nucleótidos) de longitud y estaba situada entre la glicina-1536 y la prolina-1627 en la poliproteína NADL. Estas coordena-
30 das correspondían a la glicina-1536 y la prolina-1537 en cepas BVDV1 no citopáticas tales como SD-1 (número de adquisición del Genbank AAA42880, SEQ ID NO: 6), indicando que la alteración del genoma en el NADL era una inserción sencilla sin eliminación concomitante o duplicación de las secuencias virales de flanco. Como
35 BVDV1-NADL, había una inserción de una parte del gen *DnaJ1 Bos taurus* en BVDV2-

estuvieran presentes a niveles detectables, se esperaba que dieran productos del primer recorrido de 292 bp (BVDV1-NADL) o 277 bp (BVDV2-53637). Los recombinantes intertípicos serían similares en tamaño a uno de los padres, o de longitud intermedia, dependiendo de la posición del sitio de recombinación. Los BVDV no citopáticos nunca se detectaron después del RT-PCR de primer recorrido.

Para aumentar la sensibilidad de detección de BVDV no citopático en presencia de un gran exceso de BVDV citopático, se incluyó una etapa de digestión de enzima de restricción antes del PCR encajado para destruir los mayores templados de NS2-3 derivados de los virus citopáticos. Una combinación de *MspI* y *DraI* se seleccionó en base a la observación de que cortaban dentro de la inserción *DnaJ1 Bos taurus* pero no cortaba las secuencias virales de flanco. En el PCR de segundo recorrido (hemi-encajado), se usaron iniciadores directos 53637U2 (5'-TGCACGATCTGTGAAGGGAAAGAA-3', SEQ ID NO: 9) o NADL4844 (5'-TGCACTGTATGTGAGGGCCGAGAG-3', SEQ ID NO: 10) en conjunto con los mismos dos iniciadores inversos 53637L o NADL5305.

Se usaron combinaciones apropiadas de iniciadores para intentar detectar recombinantes intertípicos además de BVDV1 y BVDV2. El tamaño esperado de producto RT-PCR era 462 bp para BVDV1-NADL citopático y 570 bp para BVDV2-53637 citopático (presente en bajos niveles debido a la digestión incompleta de los productos RT-PCR de BVDV citopático). Los virus no citopáticos, si estuvieran presentes a niveles detectables, se esperaba que dieran productos de segundo recorrido de 192 bp (BVDV1-NADL) o 177 bp (BVDV2-53637). Los recombinantes intertípicos serían similares en tamaño a uno de los padres, o de longitud intermedia, dependiendo de la posición del sitio de recombinación. Los BVDV no citopáticos nunca se detectaron después del PCR de segundo recorrido. En algunas reacciones individuales, se vieron bandas aberrantes de diversos tamaños. Todas las bandas entre 100 y 300 bp se consideraron que eran productos no citopáticos potenciales y se sometieron al análisis secuencial de DNA. En todos los casos la banda aberrante fue el resultado de falso inicio durante el PCR. No hubo evidencia de virus no citopáticos en ninguno de los estudios.

53637. La inserción celular era mayor (131 aminoácidos, 393 nucleótidos), extendiéndose en ambas direcciones respecto a la inserción en BVDV1-NADL. La posición de la inserción celular dentro de la región NS2-3 era idéntica en ambos virus. A diferencia de BVDV1-NADL, la inserción de BVDV2-53637 estaba acompañada por una eliminación de 5 aminoácidos (15 nucleótidos) de secuencias virales de flanco. Tres residuos de aminoácido estaban ausentes flanqueando el extremo 5' de la inserción, mientras dos residuos de aminoácido estaban ausentes flanqueando el extremo 3' de la inserción. Porque las inserciones celulares estaban en la misma posición genómica en los dos virus de la vacuna, no podían sufrir recombinación de homólogos para eliminar la inserción para generar un virus químerico no citopático.

EJEMPLO II

Intentos Para Detectar Virus BVDV No Citopáticos En Cultivos BVDV1-NADL/BVDV2-53637 Co-Pasados

Para determinar si los dos virus de vacuna son capaces de recombinarse para generar niveles detectables de BVDV no citopáticos, los virus se co-cultivaron en células susceptibles y se usó un ensayo RT-PCR hemi-encajado sensible para detectar virus no citopáticos potenciales de entre un exceso de productos muy citopáticos que aún contenían la inserción celular. Para aumentar la probabilidad de recombinación intertípica *in vitro*, cada virus se inoculó simultáneamente en células BK-6 confluentes en placas de 6 pocillos en una multiplicidad de infección de 2-4 (12 replicados por experimento). Después de 2-3 días de co-cultivo, las células se congelaron y descongelaron dos veces, y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugado de baja velocidad. El fluido sobrenadante resultante se usó después como inoculador para el siguiente paso. Un total de siete pasos en serie se llevaron a cabo en varios estudios. Durante los pasos, BVDV1-NADL creció más rápidamente que BVDV2-53637, aunque el virus tipo II era aún detectable después de siete pasos usando RT-PCR encajado. Se empleó un ensayo RT-PCR hemi-encajado sensible en un intento de detectar cualquier virus no citopático.

En el RT-PCR del primer recorrido, se usaron iniciadores directos 53637U1 (SEQ ID NO: 1) o NADL4744 (5'-CGTGGCTTCTTGGTACGGG-3', SEQ ID NO: 7) en conjunto con iniciadores inversos 53637L (SEQ ID NO: 2) o NADL5305 (5'-AGCGGTATATTGTACAAAGCCA-3', SEQ ID NO: 8). Las cuatro combinaciones de iniciadores directos e inversos se usaron para detectar BVDV1, BVDV2 y recombinantes intertípicos. El tamaño esperado del producto RT-PCR era 562 bp para BVDV1-NADL citopático y 670 bp para BVDV2-53637 citopático. Los virus no citopáticos, si

~~38~~
40

SEQ ID NO	DESCRIPCIÓN
1	Iniciador directo 53637U1
2	Iniciador inverso 53637L
3	Producto RT-PCR de 670 bp de la región NS2-3 de la cepa BVDV2 53637
4	Secuencia genómica de BVDV1-NADL (número de adquisición del Genbank M31182)
5	Secuencia de poliproteína de BVDV1-NADL (número de adquisición del Genbank AAA42854)
6	Secuencia de poliproteína de la cepa de BVDV1 no citopático SD-1 (número de adquisición del Genbank AAA42860)
7	Iniciador directo NADL4744
8	Iniciador inverso NADL5305
9	Iniciador directo 53637U2
10	Iniciador directo NADL4844

5

10

15

20

39
41

SEQ NO: 1

cgccacagatgggttgggt

SEQ NO: 2

ggctatgtattggaagtaccc

SEQ NO: 3

cgccacagatgggttgggtgggggaaa tatatggggcaccacaggtgatcaccatcatataaagctagtac
cotaagtataaacaggcactgcataatctgcacagatctgtgaagggaagaaatggaaacggagccactgccc
aaagtgtgggaagacaaaggaaagccca taacatgttggatgcactcgcagactttgaggagaaacattacaa
aaagataatattataagagaaggacgccaagaagcaatgaatcagatgatgtgacgocpatgcccagggaaagca
taggaggtttgaacgggacgggaacctaagagtgacagatactgtgctgagtgtaataggctgcacactgc
tgagggaaggtgacttttggggaagagtcacagca tggttgggctcacaactacactcttgcgctgattggtgg
aaaggtgtatgtatcacagagtgggtcggatgccagcgtgtgggaatctccccagatccccacagagtcctc
ttgtcacatctcatttggttcacggatgcccgggacacagtgggcggcagagagotactccagatgccctcc
tgctgaccttcaggatttcttggagccggtatcttcaagtacccccaggccagatgtccagggaagagtataa
gggttacggtccatacatagcc

SEQ ID: 4

gtatacagaga	attagaaag	gcactcgtat	acgtattcggg	caattaaaa	taataattag
gactagggaa	caaatccctc	tcagcgaagg	ccgaaaagag	gctagccatg	cccttagtag
gactagcata	atgagggggg	tagcaacagt	ggtgagttcg	ttggatggct	taagccctga
gtacagggta	gtcgtcagtg	gttcgacgco	ttggatataa	ggtctcagga	tgccacgtgg
acyagggcat	gcccnaagca	catcttaacc	tgagcggggg	tcgccaggt	aaaagcagtt
ttacccgact	gttacgata	agccctgata	gggtgctgca	gagggccact	gtattgctao
taaaaatctc	tgctgtacat	ggcacatgga	gttgatcaca	aatgaacttt	tatacaaac
atacaaacaa	aaacccgtcg	gggtggagga	acctgtttat	gacagggcag	gtgatccctt
atttgggtgaa	aggggagcag	tcacccctcc	atcgacgcta	angctccccc	aaagagagag
ggaacggcat	gttccnaacc	acttggcctc	cttaccnaaa	agaggtgact	gcaggtcggg
taataagaga	ggaactgtga	gcgggataca	octgaagcca	gggacactat	tttaccagga
ctatanaaggt	cccgctctatc	acagggcccc	gctggagctc	tttgaggagg	gatacctgtg
tgaacgaot	aaacggatag	ggagagtaac	tggaagtga	ggaaagctgc	accacattta
tgctgtgtata	gatggatgta	taataataaa	aatgtccacg	agaaagtacc	aaaggtgttt
aaqgtgggtc	cataatagtc	ttgaactgoc	tcctatgggtc	aaacttgot	cagaaocgaa
agaagggggg	gcaacnaaaa	agaaacata	gaaccccgac	agactagaaa	gggggaaat
gaaaatagtg	ccnaagaaat	ctgaanaaga	cagcaaaact	aaactccgg	atgctacaa
agtgtgtgaa	ggagtcaaat	accaggtgag	gaagaaggga	aaacccaga	gtaaaacaa
tcagggacggc	ttgtaccata	acnaaaacaa	aoctcaggaa	tcacgcaaga	actgggaaa
agcaattgttg	gcgtgggcaa	taatagtctat	agttttgttt	aaagtacaa	tgggagaaa
cataacacag	tggaacctac	aaatataatg	gaaggaaggg	ataccacggg	caatgttcca
aaaggggtgtg	aatagaagtt	tacatggaa	ctggccagag	aaatctgtc	ctggcgtccc
ttcccatcta	gccacggata	tagaactaaa	aaacattcat	ggtatgatgg	atgcnaagtga
gaagaccac	tacacgtgtt	gcagacttca	acgcaatgag	tggaacaaag	atggttgggtg
caactggtag	aatattgaac	octggattct	agtcatgaat	agaacccaa	ccaatctcac
tgagggacaa	ccaccaaggg	agtggogaat	cacttgtagg	tatgataggg	ctagtgaactt
aaacgtggta	acnaagcta	gagatagccc	cacacccctta	acaggttgca	agaaaggaaa
gaacttctcc	tttgaaggca	tattgatgog	gggocccctg	aaacttgaaa	taactgcaag
tgatgtatta	ttcaagaac	atgaacgcat	taatatgttc	caggaatacca	ctctttaaact
tgttgacggg	ttgaacnaot	ccttagaag	tgccagacaa	ggaaacgcta	aaactgaac
ctggttaggc	aagcagctcg	ggtacttag	aaaaagttg	gnaaaacaga	gtaagcgtg
gttttgagaa	taogctgctt	cccttactg	tgatgtcgat	cgaannattg	gctacatattg
gtatacaaaa	aattgaaac	ctgocgtctt	accaaagaa	acaaanatty	tcggccctgg
gaactttggc	accaatgcag	aggacggcaa	gatattacat	gagatggggg	gtcacttctc
ggaggtacta	ctacttctt	tagtgggtct	gtccgacttc	gcacccgaaa	cagctagtgt

aatgtaccta atccatcatt tttccatccc acaaatgcac gttgatgtaa tggattcgtga
taagaccacg ttgaacctca cagtggagct gacacacagct gaagtaatac cagggctcggg
ctggaatcta ggaatctatg tatgtataag accaatctgg tggccttatg agacaactgt
agtgtttggca tttgaagagg tgaagccagg gttyaagtta gtgttgaggg cactcagaga
tttaacacga atttggaaag ctgaacacaa tactgctttt ttagtatgac ttgttaagat
agtcaggggc cagatggtaa agggcattct gtggctaata ttgataacag ggttacaagg
gcacttggat tgcataacct aattctcgtg tgcataagca aaggacgaaa gaatttggcta
actgggggct gaaggcctta ccaccccttg gaaggaatac ccacctgga tgaagctgga
agacacactg gtcaattgct ggtgcgaag tgggaagtta atgtacctcc aagatgcac
ggagacaacc agatctctcg caatcttctg tacaagagcc ttgcgacca gtgtggtatt
caaaaaactc tttgatggg gaaagcaaga ggtatgagtc gaattgaag acactttga
atttgyactc tgcacatgt atgccaaccc catagttaag ggyaagtcca atacacgct
gotgaacgga ccggccttcc agatggtag cccatagga tggacaggya ctgttaagctg
tacgtcattc aatatggaca ccttagccac aactgtggtg cggacatata gaaggtctaa
accattccct cataggaag gctgtatcac ccataaagat ctgygggag atctccata
ctgtactctt ggggaattt ggaactgtgt gctgtgagac caactactat acnaagggg
tcttattgaa tcttgcaagt ggtgtggtta tcaattttaa gagagtgaag gactaccga
ctacccacti ggcaggtgt aattggaga cgagactggt tacaggctag tagacgtac
ctettgcaat agagaaggtg tggcctagt acccaaggg acattaaagt gcaagatag
aaaaaact gtacaggtca tagctatgga taccacactc ggaactatgc cttgagagcc
atatgaatc atatcaagt aggggcctgt agaaaagaca gctgtactt tcaactacac
taagacatta aaaaatnagt atttgaagc ongaacagc taotttgaag aatcatgct
aaaaggaag tatcactact ggtttgaact ggaagtgaact gacontacc gggattactt
cgttagctcc atattagtg tggtagtag cctcttgggt ggcagatag tactttgggt
actggttaca tacatggtat tatcagaaca gaaggtctta gggattcagt atggtatagg
ggaagtgtg atgatgggca aattgctaac ccataacat attggaagtg tgaactactt
cttgcctgtg tactctctgc tgaggagga caatcaatc tgaatttgg atcctactga tgaattggga
ccacatetta ggtgtacacc ggggcaaga tgggtttat catagctagg cgtgaocaa ctatagtgcc
aacagtagta ctatctgca taggtttat cactgagggt cactgaactg acccaccgc ctggagttga
actggttaac ataatggcag ggggtcatga ctataaccc actgatggtt agctatgtga cgtattctt
catgtatata aatggttao agtgcattct cagcctggtg tctgcggtgt tcttgataag
aagctataa taactaggtg gaactgagat ggcagaggtg acatcccaa actggagacc
actaacctta atactattat atttgaactc acaacacat gtacagaggt ggaaggtga
cgtggttggc ctattgttgc aatgtgtgct tatettattg ctggtcaaa ccttgtggg
cgaotkttta aocctaatc tgatctctgc tacotatga ttggttaant tatactatct
gaactctgtt aggaactgata cagaagagag ttggtcaggg ggtatagact atacaaggt
tgaactccto tgcagcgttg atgagagtgg agagggcgtg tatcttttcc catenagga
gaagcagag ggggaactt ctataactt ggcctttato aaagcaaac tgaaggttg
cgtcagcagt aatggcagc taatataat gagttactta acttggact ttatgtacta
catgcacagg aaggttatag aagagatctc aggaaggtacc aacataatat ccaggttagt
ggcagcactc atagagctga actggctcat ggaagagag gagagcaag gcttaagaa
gttttatcta ttgtctgga ggttgagaa cctantaata aancataag taaggatga
gacctggtc tcttggtag gggagggga agtctacggt atgccaaga tontgaotat
aatcaaggpc agtacactga gtaagagcag gcactgcata atatgaactg tatgtgaggg
cogagagtg aaggtggca cctgoccaa atgtggagc catgggaagc ogataacgtg
tggatgtcg ctagcagatt ttgaagaaag acactataaa agaatcttta taagggaag
caactttgag ggtatgtga ggcagtgcca ggyaaagcat aggaaggttg aantggaccg
ggaacctaa agtgcagat actgtgctga gtgtaatagg ctgaatcctg ctgaggaag
tgacttttg gcagagtcga gcatgttgg cctcaaatc acctacttg opctgagga
tggaaagtg tatgataca cagagtggc tggatgccag cgtgtggga totocccaga
taccacaga gtcccttct acatctcatt tggttcagg atgecttca ggcaggaata
caatggctt gtacaaata ccgctagggt gcaactatt ctgagaact tggcgtact
ggcaactaaa gtaaaatgc tcatggtag caaccttga gaagaaatt gtaetctga
acatcttgg tggatctaa gggggcctgc optgtgtaa aagatcaag agcagaaa
atgcacatt aatatactg ataaactaac cgcattttt gggatcatc caaggggac
tacacccaga gcccggtga ggttccctac gagttacta aaagtgaag ggggtctgga
gactgcctg gcttaacac accaagggg gataagttca gtogaocat taacgcagg

aaaagatcta ctggtctgtg acagcatggg adgaactaga gtggtttgoc aaagcaaca
caggttgacc gatgagacag agtatggcgt caagactgac teaggytgoc cagacgggtg
cagatgttat gtgttaaatc cagagggcgt taacatatca ygatccaaag gggcagtcgt
tcacctcaa aagacagggtg gagaatccag gtgtgtcacc gcatcagga caccgggttt
cttcgacctc aaaaacttga aaggttggtc aggttgccct atatttgaag catccagcgg
gaggttggtt ggcagagtc aagtagggaa gaatgaagag tctaaacctc caaaatat
gagtggaate cagaccgtct caaaaaacag agcagacctg accagagatgg tciaagagat
aaccagcatg aacaggggag acttcaagca gattactttg gcaacagggg caggcaaaac
cacaagaetc ccaaaagcag ttatagagga gataggaaga cacaagagag tattagtctt
tataccatta agggcagcgg cagagtcaat ctaccaglat atgagattga aacacccaag
catctctttt aacctaaagg taagggacat gaagaggggg gacatggcaa cgggataac
ctatgcatca taogggtaet tctgcnaat gctcnaacaa magctengag ctgctatggt
agaatactca tacatattot tagatgaata ccattgtgoc actcctgaac aactggcaat
tatcgggaag atccacagat tttcagagag tataaggtt gtccgcatga ctgccacgcc
agcaggttg gtgaccacaa caggtcnaaa gtaaccaata gaggaattca tagcccccga
ggtaattgaaa ggggaggtat ttggtagtc aatcttgat atagcaggggt taaaaatcc
agtgtatgag atgaagggca atatgttgyt ttttgtacca acgagaaaca tggcagtaga
ggtagcaag magctaaaag ctgaagggota taacttaca taacttaca gtgagagga
tcnaagcaat ctgagaggtt gacatcaca atccmctat gtaatcgtgg ctacaatgc
tattgaatca gtagtgacaa taccagattt ggacacgggt atagacacgg ggttgaantg
tgaaaagagg gtgaggggat catcaagat acccttcatc gtaacagggc ttaagaggat
ggcgtgact gtggtgagc agtgcgaag taggggcaga gtaggtagag tgaacccgg
gaggtattat aggagccagg aacagcaaa aggtcnaag gactacacat atgacotett
gcaggtacaa agatagggga ttgaggtgg taactctgga acgnaatcct ttagggagat
gaattacgat tggagcctat acgagggga cagcctacta ataacccagc tggnaatct
aataatcta etcatctcag aagacttgcc agcctgtgtt aagaacataa tggcaggac
tgatcaacca gagcaaatcc aacttgcta caacagctat gaagtccagg tcccggtcct
atcccaaaa ataaggaatg gagangtca agccctac atgactgaag cgtttctaaa
tgccagaaag ctaggggagg atgtgcctgt gtatatctac gctactgaag atgaggtat
ggcagttgac ctcttagggc tagactggcc tgactcctgg amccagcagg tagtgagac
tggtaaagca ctgaagcag tgacoggggt gtctcggct gaaatgccc tactagtgg
tttatttggg tatgtgggtt accaggtctc gtctaaaggg catgtccca tgataacaga
catatatacc atcagagacc agagactaga agacacacac cactctcagt atgacccca
cgccataaaa accgatggga cagagactga actgaagaa ctggcgtcgg gtgagttga
aaaatcctg ggagccattt cagattatgc agctggggga ctggaglttg taaatccca
agcagaaag ataaaaacag ctcttttgtt taaggaagcc gtagaagcc caaaaggt
tgtcaaaaa ttcattgact cattnattga aataaagaa gaataatca gatattggtt
gtggggaaca cacaagcac tatcaaaaag catagctgca agactggggc atgaacagc
gtttgccaca ctagtgttaa agtggctaga ttttggaggg gaatcaggt oagacccgt
caagcagggc gcagttgatt tagtggtcta ttatgtgat aataagcct cctccaggg
tgactccag acacagcaag aagggaggcg attcgtcga agcctgttca tctooqao
ggcaacotao acatacaaaa ctgggaatta coacatctc tctaaagtg tggacacagc
cctggcttac ctccctatg ctaccagcgo attaaaaatg ttcacccca cgggctgga
gagcgtggtg atactgagca cunogataa taanaatac ctctctataa ggaagggaa
gagtgatgga ttgttggtta egggataag tgaaagccat gaantcgtt caaaaaacc
agtatcggta ggtatatctg tgatgttgg ggtagggca atcgtcggc acacgctat
tgagtccagt gaacagaaa ggacccctct tctgaagtg tttgtaaga acttettgga
tcaggctgca acagatgagc tggtaaaaga aatccagaa aatattata tggccttatt
tgagcagtc cagacaattg gtanccctct gagactaata taacccctgt atgggttta
ctcaaaaggt tgggaggcca aggaactatc tgagaggaca gcaggcagaa acttattcac
attgataatg tttgaagcct tcgagttatt aggtatggac tcaagggga aataagga
cctgtcggga aattacattt tggatttga atacggcta cacaagcaaa toacagagg
gctgaagaaa atggtactgg ggtggcccc tgcaccttt agttgtgact ggaacccag
tgacagagag atcagattgc caacagacaa ctatttgagg gtagaaoca ggtgcccag
tggctatgag atgaagcct tcnaaatgt aggtggcaaa cttaacnaag tggaggagag
egggtcttcc ctatgtagaa acagacotgg taggggoca gtcaactaca gagtaccaa
gtattacgat gacacctca gagagataa accagtaga aagttggag gacaggtaga
gcactactac aaaggggtca cagcaaaat tgactacgt aaagaaaaa tgctcttggc

cactgacaaq tgggaggttg aacatggtgt cattaaccagg ttagctanga gatatantgg
ggtgggggttc aatggtgcat acttaggtga ctagcccaat caccgtgcto tagtggagag
ggactgtgca actataacca aaacacaggt acagtttcta aaatgaaga aggggtgtgc
gttcacctat gacotgeoca tctccaatct gaccaggctc atogaaactag tacacaggaa
caatcttgaa gaggaggaaa taocaaocgc taeggtcacc acatggctag attacacatt
cgtgaatgaa gacgtaggga ctataaaacc agtactagga gagagagtaa tccccgacc
tgtagtgtgat atcaatttac aaccagaggt gcaagtggac acgtcagagg ttgggatcac
aataatttga agggaaacc tgatgacaa gggagtga cctgtcttgg aaaaagtga
gcctgaogco agogacaaco aaactcggg gaaatoggy ttggatgagg gtanttacco
agggcctgga atacagacac atacactaac agaaagaata caaacacagg atgcaggcc
cttcactcatg atcctgggct caaggaaatt catatcaaat agggcaaga ctgctagaaa
tatanaletg tacacaggaa atgacccag ggaatacga gacttgatgg ctgcagggcy
catgttagta gtagcactga gggatgtoga cctcgagctg tctgaactgg togtttcaa
ggggactttt ttagataagg aggccttggg ggtcttaagt ctoggggaac ctaaacogaa
gcaggttacc aaggaaagctg ttaggaaatt gatgaaacg aaaaagaty tggagatcoc
taactgttgc gcatcagatg acccagtatt tctggagtg gcttaaaaa atgataagta
ctacttagta gtagatgttg gagagataa agatcaagot aaagcactg gggcagcga
tcagacaaga attataaagg aggtaggcto aaggagctat gocatgaag tatctagctg
gttctccaaq gcatcaaaac aacagatgag tttaactcca ctgtttgagv anttgttgc
acggtgcccc cctgcaacta agagcaataa ggggcacatg gcatcagctt acceattggc
aaggggtaac tgggagccco tcytttggg ggtgcaccta ggtcaaatac ongcagaaq
ggtgaagata caccatatz aagottacot gaagttgaa gattrcatag aagaagaaga
gaagaaacot aggytlaagg atacagttaa aagagagcno aaanaattga tacttaaaa
aataaggttt caagyaacoc taacaccaa gaantgtc aaccagggg aactatctga
acagtgtgac agggaggggc gcaagaggaa catctacaa caccagattg gtactatant
gtcaagtgya ggcataaggc tggagaaatt gccaatagtg agggccaaa ccgacacaa
aacctttcat gaggcaataa gagataagat agacaaagt ccaaccggc aaaaaccga
attgcacaa ccaattgttg agattttcca cagatagcc caaccaccc tgaacaaao
ctacagtgag gtgacgtggg agcaactga ggcgggggta aatagaaggg ggcagcagg
cttctctggag aagaagaaca tgggagagt attggatcca gaanaagcaco tggtagaaca
attggtcagg gatctgaagg ccgggagaaa gataaetat tatgaacty caataccaa
aaatgagaag agagatgtca gtgatgactg gcaggcaggg gacctggty ttgagaagag
gccaaagatt atccatacc ctgaagcna gcaagggcta gocatcaata aggtcatgta
taactgggtg aaacagcagc ccgttgtgat tonaggatct gaaggaaaga ccccttgtt
caactcttt gataaagtga gaaggaaatg ggaactgttc aatgagocag tggcgtgaag
ctttgacaoc aaagcctggg acactcaagt gactagtaag gatotgcac gatctgaga
antocagaaa tattactata agaggagtg gacaaagtic attgaccca toaccagcca
catgacagaa gtaccagtta taacagcaga tgytgangta tatataaga atgggcagag
agggagcggc cagccagaca caagtgtctg caacagcatg ttaaatgtcc tgcaaatgat
gtacggcttc tgcnaagca caggytacc gtacaaagt ttcnaaggg tggcaaggat
ccacgtctgt ggggatgatg gttcttcaat aactgaanaa gpyttaggg tgaatttgc
taacaaaggg atgcagatto ttcattgaagc aggcacacot cagaagataa cggagggga
aaagatgaaa gttgectata gatttgagga tatagagtic tgytctcata ccocagtoce
tgtaggttg tccgacaaa ccagtayto catggccggg agagacacog ctgtgtact
atcaaaagatg gcaacagat tggattcaag tggagagagg ggtaccacag catatgaana
agcggtagcc ttougtttct tctgtatgta ttectggaa cgccttgta ggaggattg
ectgttggte ctttcgcac cctataaaga agaccatca aaacatgcca ctattatta
caaaggtgat caaataggg cctataaaga tgaataggt cggaaatcaa gtgaactga
gagaaaggc tttgagaaat tggcaactct aaactaagc ctgtccagyt tgggggtctg
gactaagc acnagcaaa gaataatca ggaactgtgt gcoattggg aagaagagg
caactggcta gttaaagccg acaggtgat atccagcaaa actggccact tatacatoc
tgataaaggc tttacattac aaggaaagca ttatgagca ctgcagctaa ggtccatag
aaacccggtc atgggggtg ggaactgag atacagtta ggtccatag gtcagcagct
gttgagaagv ttgaanattc tgcctatgac ggcogtggc ataatatag ttgggacgt
gtatatattg taanataatt aatccatgta catagtgtat ataatatag ttgggacgt
ccabctcaag aagacacac gccacacag cacagctaaa cagtagtoaa gattctctac
ctoagataa cactacattt aatgcacaca gcaactttag tgtatgagga tacgcccag
gtctatagtt ggaactaggaa agactctaa cag

45

SDQ ID: 5

malitnelly ktykqkpvgr aspvydgaqd plfgergavh pqtiklphk rgerdvtal
 aslpkrqdcz agnargpvag iylkqplfy qdykppvyhr aplalfeqs acettkrigr
 vtqadgklyh iyvaidqci iksatrsyqr vfrwvncld cpluvttced theagatkkk
 tqkpdrlorg kskivpkere kskttkppda tivvegkyq vrkkytkk ntdqglyhak
 nkpsaerkkl ekallawail aivlfqvtmg eaitqvalqd ngtagiqram fgrgvnrslh
 giwpakictg vpsklatdie lktihgmda saktntccr lqrhewkhg wcnwyniapw
 ilwamtqan lteggpprec avtcrydras dlnvvtqard aptpltgckk gknfsagil
 mrgpcnfeia asdvlfkhe rimafqdtl ylvdgltal egatqgtaki ttwlgkqlgi
 lqkklonkak twfgaynaap ycdvdkhgy lwytknctpa clpkntkivg pggkfgtaed
 ghilhemggg lsevililv vladfapeta svmylilhfe ipqshvdmd cdktdqnlv
 elttasvlg svwnlgkyvc irpawpyet tvvlafaevs quvklvral rdltrivana
 ttttaflvclv kivrqsavvg iilvilitgr qghldckpof syniakderi gqigaeqltt
 tvkayapmak ledtnviauc edgklylqr ctretcrylai lhtalptav vfkklfdgrk
 qedrvomnda fefglcpoda kplvsgknt tilingpofga vcpigvtgtv actsfmdtl
 attvrttyr skpfphrgg itqtnlqadl hacilggat cvpddqilyk ggsiesckvc
 gyqfhaeqgi phypigkoki enetgyrlvd staonregva ivpqtlikok igkttvqvla
 mdklqmpc rpyeliasag pvakactfn ytktknkyl eprdayfgy mltgoyqyf
 dleatdhhrd yfaeilvrv valqgryvl wllvtyvle eqkalgiqy agervmngnl
 lthnnaevrt yfllilyllc esavkhvvl lyhilvvhpi kvivililal gdevkadsgg
 qaylgkidlc fttvvlivg lifarcdpti vplvtimaal rvtelthqpy vdiavavti
 tilmvayvtd yfrykwlqg ilslvsavfl irsliylgri ampevtipaw spltilillyl
 isttivrak vdvagllqg vplllvttl vadftlilil lptyelvly yktrvtdte
 zwlqgidyt rvdliydva agqvyllps rqtagnafai ilplikatli svvashkqli
 ymsyltidfn ymhkrkvis leggtiier lvaslielnu smeeeshqi kkyllagri
 znlikbkr natvaswyga eovypgkha tiikastlak srhcictvc agrvkggtc
 pkogzhgkpi tcmeladfe arhykrifir egnafeguar eqgkhrfem drepksaryo
 aecnrilpae agdfvaesum lgikityfel mdgkydite wagoqrvgis pdhrvpchi
 efgerapfrq eynqfvqyta xqqlfirnl vlatkvkalm vgnlgeaig lehlgwilrg
 pavokkiah ekchinildk ltaffgimpr gttpraprfr ptallkvrz letawaythq
 gglaavdhvt aghdlvcds mgttrvoga nncitdetey gvktdsgcpd garyvinpe
 avniagkga vhlqktggs ftevtasgt affdlnkly waplifosa agrvgrvkr
 gmaenkpth inagiqtvsk nradltamk kitamrgdf hqitlatqag kitalphavi
 eqgrhkrvl vlipraaaa svyqvarikh psiefnlrig dmkogdats itynasygyfo
 qmpqkiras avoyayifid eyhcatpaql aigkikrfa enirvanta tpagavtttg
 qkhpcefia pavakgedlg sqfldiaglk ipcdmhgm lvfvptzma vavaklikak
 qynagyyag adpenlrvt agqpyvat nalsogrtip didtvidtgi kcahrvrvas
 kipflvtgik znavtvaga qrrgrgrvk pgryyraqat atgekdyhyd llqagrygie
 dglovtkufr amnydvsiye edslitqle ilnallised lpsavkima rtdhpspiql
 aynsayvqvp vlfpkiraga vtdtyanys larkligedv pvyiyatode dlavdlilgd
 wdpqgnqrv etgkalkqv glassaenall valfgyryq alarkhpmi tdiyttiedqr
 ledtthlqya pnaiktdgte talkeasag vakingaid yaagglefv aqakiktap
 lfkenaaak gyvqtfidol ienkeiiry glwghtaly kalarighe tafativikv
 lafggeevd hvkqavdlv vyyvankpaf pgsatqog rrfvaslfa alatytyktv
 nyhnlakvve palaylpyat aalkustpr laavvillet iyktylark gkadgllgtg
 isaameilaq npvavgiava lqvmaashn alaeagkrt lmkvfvkf lqmatdelv
 kenpekiina lfeavqtign pirliyhlyg vyykqwaake lextagral ftilmfoafe
 ligadaqgi mlagmyild liyglkqin rgiklavlgw apapfaodht paderilpt
 dnylrvetre pogyenakfk nvggkthve esgplernr pgrgpnvrv tkyyddnlra
 ihpraklqg vahyykgvta kidysghal latdtwevab gvitriakry tgvqfagayl
 qdopohralv erdcattikn tvqfkhakq castydlis nltrielvhn rmlenkeip
 tatvttwlay tfvnadvgti kplqarvip dpuvdinlq evqvdaavg itligratim
 ttgvtvlek vepdasdnqn svhigidegn yppgiqtht lteehnrda rpfimilger
 nsienrakta rninlytqnd prairdlmau gmalvvalrd vdpelsenvd fkgtdlrea
 lealslqppk pbqvtkeavr nileqkkdve ipawfasddp vflavalknd kyyvgdvge
 lkdqakalga tdqtriikev gartyemkls svfikasnkq mltpifeel llcoppatka
 nkghmaayq laqgnueplg qvhlgtipa rrvkihpyea ylkhdife eekprvkd

df

virehukwil kkirfqpnl tkmlnpgkl seqldrogrk rniyahqigt imsegirle
 klpivraqtd tktfheaird kidksenzqn palbnkllei fhtiaqptik htygevtwaq
 leagvnrkga agfleknig evldeekhlv eglvrdlkag rhikyvetal pkmekrdvad
 dwagadlvva krpvriqype aktrlaithv mynrvkqgqv vipgyegktp lfnldkvrk
 eudsfnepva vofdtkaudt qvtskdlqli geiqkyyykh ewhkfiddit dhatevrvit
 adgevyrng qrgagqpdts agnsalvlt asygfceatg vpyksarva rihvcgddgf
 litekglgik fankqagilh aagkpqkita gekmkvayrf edlefcahtp vprvrsdats
 ahmagrdtav ilpkmatrid aegergttay ekavafsil myemvplvr iclilvleqqp
 etdpkhaty yykqdpicay kdvigrnise lkrtgfekla nlnlaltig vwtktskri
 iqdcvaigke egulvhpdr lissktghly ipdhgftlqg khyeqlqlrt etnpvavgvt
 eryklgpiya ilirrikil mtavgvas

SEQ ID NO: 6

malitnally ktykqtpvqv eapvydqagn plfgergaih pqtikliphk rgarvptal
 aslpkrqdr egnakqpvag lykppplyf qdyhgvpyhr apiafsega mecttkrige
 vtgedqklyh iyicidqcit vkeatrehr virvharid eplvtsad tkeagtkkk
 qqkpdrlakg raklvptasa kdsatkppda tlwrdgvkyq vkhkqvkek ntqdglyhnh
 nkppasrkkl ekallavail avlievtag amitqvalqd nqtatigram fqrgrvzslh
 giupakiets vpehlatdve lktihganda sektnytoer lqrbewnhg wcnwyniapw
 ilimartgan ltsgqpprac avtrydrds dlnvvtqard sptpltgckh gknfafaqvl
 tregpcnfela asdvlfkaha ctgvfgdtah ylvdgvtasl esarqgtaki ttvlgkqigl
 lgkklankak twfgayasp ycdvdrkigy lwtfnctpa clpntklig pgkfdtnaed
 gkilhaagph laevllslv vledfapeta samyllhfe ipqshvdtid cdkkqlnlci
 elttadvipg svwnlgkyve irpchwpyet aavlafeewg qvkvivlral rdlcrlvnaa
 rttatlvcli kmvrgqvvg ilwllitgr qghidckpoy syaiakndrv epigaegitt
 vukdyshenk ledtavlaue kgqkftylar ctretvial lheralptav vfkklfegqk
 qedtvanddd fefglcpoda kpivrgknt tllagpafqa vopigwtgtv ecalanrdtl
 dtavvztyrr svpfpyrqgc ltqktigadi ydcalggawt cvtgdqaryt ggliesckwc
 gykfeksegl phypigkerl naetgyrlvd dtaedragva ivphglvkck igdttvqvia
 tdklqmpapc kphailseag piektaactfa ytrtlkakyf uprdeyfqay mikgdyqywf
 dlevtdhhrd yfaasilvv valiggrvyl wiletymls eqkasagayg agervmngnl
 lthdnwvvt yffllylllr esevkhvll lyhllvahpl ksvivillmi gdwvkadpqq
 qyylqgidvc fmvviliig liiarrdpti vplieivael rvtgltyasp vdnmaviti
 tlmvayvtd yfrykrvlq ilslvagvfl isclihlgri etpavtipaw rpltilfyl
 iettvrmwk idlaglilqg wplillitl wadfltlili lptyalvkiy yltikttdie
 kawlggidyk rvdsiydvds egugvylfpa rkaqkzmfam lpllvratli esevskqli
 ymaylswdca yyahrkvies ieggtamier ivaailslaw amaeasakql kkyllagrl
 rnlilkhkvr natvagwyga mavypmkim tiikastlnk nhclictvc egrkvqgtc
 pkcgrhgkpi tcmeladfe erhykrifir egnfegpfrq eyngficyta rqlflrolp
 ilatkvmkm vgnlgeevgd lahlgwllrg pavckkitah archinildk ltaffgiapr
 gttprapvrf ptallkvrre letgwaythq gglsevdhvt aghdlivode agtrrvvcqa
 nnkltdatoy gvktdsgtgd garcyvlnp avniagakga vvhlgktgga ftcvtaagtp
 affdiknlkg wglpifase egrrvgrkv gknoeskptk imagiqtvak ntaditamvk
 kitemnrgdf kqitlatqag kttalpkavi ealgrhkrvl vlipkxase svyqyarikh
 paisfnlrig cakagdasg ityasgyfc qmpqpklna avaysyifld eyheatpql
 aigkikrfe esirvanta tpagavtttg qkhpiaefia pavmagedlg sqfldiaqik
 ipvdankgm lvfvtrnaa wvakkikak gynygyyyag edpanlrvt sqpyvivat
 naiesgvtlp dldtvvdtql kcekrvrva kipfiwtgik mnavtgaqa qrrgrvgrvk
 pgryyrqet atgskdyhyd ilqagrygia dglavtkfz amnydwalye edllitqle
 llnnliseed lpaavknma rtdhpapiql aysayevqvp vlfpxirnge vtdtyenayf
 lnarklgedv pyiyatede dladlilgl wdpgnagqv etghalkqva glasaenall
 valfgyvgyg alakrhvpmi tdiytiedqr ledthliqya pnaiktqta telkalased
 vekimgaiad ymagldfvk sqakiktap lfbenvaar gyvqklidel ledkdvilry
 glwghtaly ksaarlqba tafatlvkh lafeggetvad hirqaevdlv vyyvnnkpsf
 pgdtatqqag rrfvaelfia elatytyktv nymmlakve palaylpyat malknftpr
 leavvilect iykrylsirk qkadgilgtg isannailaq npvavgiavm lgvgaiaahn

aiesseqkrt linkvfvknf ldqaatdelv kenpeklima lfaavqtign plrllyhlyg
 vyykgweake lsertagrnal ftliinfefo ilgmdseegi znlagnyild lihglhtqin
 rglikkivlgw apapfscdvt paderiript daylrvatke pcgyemkalk nvegkitkve
 eegpficrnz pgrgpnvyrz tkyyddalre lrpvaklegq vohyykgvta zidyekgtl
 latdkweveh gtltxltkry tgvgrgayl gdephrdlv ordcatitkn tvqfkmkkg
 caftydlitls nltrilalvh rnalnekeip tetvttwlay tfvnedvgti kpvlgervip
 dpvvdinlqp evqvdtsevg itliqkeavm ttqvtpweak vepdtannqs svkigldagn
 ypgpgvqtht lvaeihnkda xpfiavlgek esmsnrakte ralnlytgnd prairdlase
 grilvvalrd idpdlselvd fhgtfldran lealsigqpk phqvtkaair dillkearqve
 ipdwftsdde vfldiamkhd kyhliqdvve vhdqekalga tdqtrivkev gertytakls
 swflqaaukq maltplfeol lircppatke akghmasayq laqgnwepig egvhlgtvpa
 rrvkahpyea ylikldlvee eektpriard vrahnkvil kkhkfqqaln tkhmlpgkl
 seqldreqhk rniynaqlst vasaagirls kipivraqtd tkefheaird kidknanrqm
 pelbnkllei fhtiadpslk htygevtwaq leaginrkga agflekknig evldsekhlv
 eqlvrdikag rkiryystai pknekrdved dwqagdlvde kkpviqypa aktrlaithv
 aynwvkqppv wipgyegktz lfnifnkvrk ewdbfnepva vafdtkaude qvterdlhli
 geigkyyyrk ewhkfldtit dhavervpit adgavyirng qrgagqpdtz agnamlvlt
 niyafceatg vpykafnrva kihvcgddgf litetgiglk fankgmqilh eqvtpqkte
 gekukvaykf ediefoshtp vprvwdnts symagrdtav liskmatrid sageryttay
 ekavafell mysavplvr icllivlsqrp etepetqtty yykgdpigay kvdvgznlse
 lkrtefekla nlnlslstlg iutkhtskri iqdcvaigke egavlvnadr lisektghly
 ipdkqftlqg khyeqqlqga etapvavgt arykigpivn lllxrikvil meavqass

SEQ ID NO: 7
 cgtggctttcttggtagggg

SEQ ID NO: 8
 agcaggtatattgtacaaagcca

SEQ ID NO: 9
 tgcacgatctgtgaaggggaagaa

SEQ ID NO: 10
 tgcactgtatgtgagggccgagag

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION		
Indicacion de que se solicita la concesion de una patente	(x)	()
Datos de identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	(x)	()
Descripcion de la invencion	(x)	()
Dibujos de ser estos pertinentes	(x)	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	(x)	()
COMPLETA ()		
INCOMPLETA ()		
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
Indicacion de que se solicita el registro de Diseno Industrial	()	()
Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representacion grafica o fotografica del Diseno Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()		
INCOMPLETA ()		
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de Trazado	()	()
Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
Representacion grafica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()		
INCOMPLETA ()		

Firma Responsable

Fecha

49
47

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS INC

REFERENCIA	Radicación No.	06 7814
	Solicitud internacional	UB2004/024011
	Fecha inicio fase nacional	28/02/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	3359

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud nacional no contiene la traducción de la solicitud internacional tal como fue presentada, hace falta la traducción de las reivindicaciones y del ejemplo 2 (Numeral 5.2.5, capítulo quinto del título décimo de la Circular Única de la SIC).
2. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
4. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5.2.9)

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

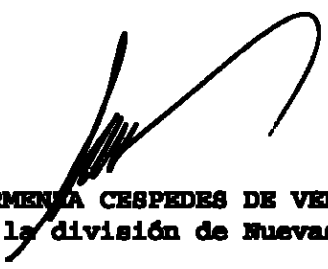
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

48
80

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Radicación No.: 6 7814



ALIX CARMENLA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 24 MAR. 2005
jramos