

49
51
A

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-007814- -00002-0000
Fec 2006-05-12 08:01:56 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYS
Eje: 379 FASE NACIONAL II
APR 14 11 09 AM 2006

Re: Expediente No. 06-007.814

Solicitud de patente titulada: "VACUNAS VIRALES SEGURAS QUE CONTIENEN AL MENOS DOS VIRUS MUTANTES DE LA FAMILIA *FLAVIVIRIDAE* Y METODOS PARA SU PREPARACION".

Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC.

RESPUESTA AL OFICIO N°. 3359 NOTIFICADO
POR FIJACION EN LISTA No. 119, DE FECHA 24 DE MARZO DE 2006,
(EXAMEN DE FORMA)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 39 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. En respuesta a la primera observación del Examinador, me permito adjuntar al expediente la traducción completa de la solicitud internacional No. PCT/US2004/024011.
2. En respuesta a la segunda observación del Examinador, me permito informar al Despacho, que la presente solicitud entra en Fase Nacional Capitulo I y no Capítulo II como inicialmente se presentó. Para tal efecto adjunto copia del Reporte Preliminar Internacional de Patentabilidad con su correspondiente traducción.
3. En respuesta a la tercera observación del Examinador, me permito aportar junto al presente memorial, el documento de cesión debidamente legalizado, junto con su correspondiente traducción, según lo previsto en el Art. 26- k de la Decisión 486.

52

4. En respuesta a la cuarta observación del Examinador, me permito presentar un nuevo título: **"VACUNAS VIRALES SEGURAS QUE CONTIENEN AL MENOS DOS VIRUS MUTANTES DE LA FAMILIA *FLAVIVIRIDAE* Y METODOS PARA SU PREPARACION"**, el cual permite identificar claramente el objeto de la solicitud de patente según lo previsto en la Regla 4.3 PCT, Artículos 26 y 27 de la Decisión 486 y Circular Única de la SIC numeral 5.2.9.

Atentamente,


CARLOS R. OLARTE
C.C.No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexo: Traducción completa de la Solicitud Internacional
Reporte Preliminar Internacional de Patentabilidad junto con su traducción.
Documento de Cesión.

54
53**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 agua. 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.*

52
54

Med. Assoc. 152:763-768 (1988); Ross, et al., J. Am. Vet. Med. Assoc. 188:818-819 (1986)). Los terneros virémicos son Inmuntolerantes 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 existir 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
15 (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 genómica. La atenuación puede lograrse también haciendo alteraciones genéticas
20 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):8256-65 (2001). Donde se desea incluir dos virus mutantes atenua-
35

55
55

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

10 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 pueden recombinarse el uno con el otro para eliminar las mutaciones.

15 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.

20 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 Dibuja

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

Descripción Detallada de la Invención

30 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.

35 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-

ff
56
b

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.

5 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.

10 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.

20 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.

25 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).

30 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.

35 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

ST

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, 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 tropismo celular o de tejido, cuando está presente en un animal en que una versión patogénica de tipo salvaje del virus atenuado puede replicarse.

Un virus atenuado puede tener una o más mutaciones en un gen o genes que 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 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 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 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 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 NBLAST y XBLAST como se describen en Altschul, et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-

58

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-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.

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

59 JF
A

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 fetal 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

60
18
78

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 Rldpath 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 M98687 o De Moerlooze et al., *J. Gen. 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, o sus combinaciones.
20

- 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-

61 59
~~XXXX~~

nerar una alteración genómica definida que limite 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

6260
X

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 pollo, 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 burellis 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. n° 5.703.055, Patente de EE.UU. n° 5.580.859, Patente de EE.UU. n° 5.589.486, Publicación de Patente Internacional WO 98/35562, y por Ramsay et al., 1997, *Immunol. Cell Biol.* 75:360-363; Davis, 1997, *Cur. Opinlon 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; Lai y Bennett, 1998, *Critical Rev. Immunol.* 18:449-484; y Vogel y Sarver, 1995, *Clin. Microbiol. Rev.* 8(3):406-410, 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 hyopneumonia*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus anthracis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma Bovis*, *Mycoplasma galanaceum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycobacterium Bovis*, *Myco-*

63

- bacterium paratuberculosis*, *Clostridial 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.*, hongos patógenos tales como *Candida*, protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *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 vesicular porcina, virus de la fiebre de Tychen, 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 aislados 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 antigénicos, o bien en forma inactivada o viva modificada: virus-1 del herpes bovino,

64
52
[Handwritten signature]

virus sincitial respiratorio bovino, virus-3 de parainfluenza, *Campylobacter fetus*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira 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 1×10^4 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

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.

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.

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 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

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 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 coordenadas 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 BVDV1-NADL, había una inserción de una parte del gen *DnaJ1 Bos taurus* en BVDV2-

66 H. H.

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 quimérico 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, el

67 ~~2~~

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.

REIVINDICACIONES:

1. Una composición de vacuna que comprende al menos dos virus mutantes vivos de la misma familia, en donde cada virus contiene una mutación en el genoma viral, y las mutaciones en los virus se ubican en el mismo sitio genómico de tal manera que los virus mutantes no pueden recombinarse entre sí para eliminar las mutaciones.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicha familia es la familia *Flaviviridae*.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dichos dos virus mutantes vivos son ambos parte del género *Pestivirus*.
4. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde los dos virus mutantes vivos consisten en un BVDV- 1 mutante y un BVDV- 2 mutante.
5. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en donde los dos virus mutantes vivos consisten de un BVDV- 1 citopático (cp) y un BVDV- 2 cp, y ambos son atenuados.
6. La composición de vacuna de la reivindicación 5, en donde el BVDV- 1 cp y el BVDV- 2 cp ambos comprenden una mutación en la región NS2- 3 lo cual resulta en un biotipo citopático.
7. La composición de vacuna de la reivindicación 6, en donde el BVDV- 1 cp es BVDV- 1 NADL, y el BVDV- 2 cp es BVDV- 2 53637.
8. La composición de vacuna de la reivindicación 4, que además comprende por lo menos uno entre herpesvirus- 1 bovino, virus sincitial respiratorio bovino, parainfluenza virus- 3, *Campylobacter fetus*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, o *Mannheimia haemolytica*.
9. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que además comprende un vehículo veterinariamente aceptable.
10. Un método para la preparación de vacunas virales seguras el cual comprende seleccionar o construir dos virus mutantes vivos de la misma familia, en donde cada virus contiene una mutación y las mutaciones en los virus se ubican en el mismo sitio genómico de tal manera que los virus mutantes no puedan llevar a cabo recombinación homóloga para eliminar las mutaciones.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicha mutación es seleccionada a partir de una remoción, una inserción, una substitución, o una combinación de los mismos.
12. El método de la reivindicación 10, en donde dicha mutación confiere un fenotipo seleccionado a partir de la atenuación de la virulencia, alteración del tropismo o biotipo celular, alteración del tropismo de especies, expresión de un casete genético externo, o una combinación de los mismos.

69 ~~69~~

13. El método de la reivindicación 10, en donde dicha familia es la familia *Flaviviridae*.

14. El método de la reivindicación 10, en donde dichos dos virus mutantes vivos son ambos parte del género *Pestivirus*.

15. El método de la reivindicación 10, en donde los dos virus mutantes vivos consisten en un BVDV- 1 mutante y un BVDV- 2 mutante.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo I del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes)

(Regla PCT 44bis)

Referencia de presentación del solicitante o del agente 15771	PROCEDER	Ver ítem 4 de abajo
Solicitud Internacional N° PCT/US 2004/024011	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 28 de julio de 2004 (28.07.2004)	Fecha de prioridad (día/mes/año) 29 de julio de 2003 (29.07.2003)
Clasificación Internacional de la Patente (8ª Edición si no se indica otra edición) Ver información relevante en el formulario PCT/ISA/237		
Solicitante WELCH, Siao-Kun, Wan		

1.	Este Informe Preliminar Internacional sobre patentabilidad (Capítulo I) está confeccionado por la Oficina Internacional en nombre del Organismo de Búsqueda Internacional, según la regla 44bis.1(a).
2.	Este INFORME consiste en un total de 6 hojas, incluyendo esta carátula. En las hojas adjuntas, cualquier referencia en el informe escrito al Organismo de Búsqueda Internacional debe ser interpretada como una referencia al Informe Preliminar Internacional sobre Patentabilidad (Capítulo I).
3.	Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes ítem: ☒ Campo N° I Base del informe ☐ Campo N° II Prioridad ☐ Campo N° III No realización de dictamen alguno sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial ☐ Campo N° IV Falta de uniformidad de la invención ☒ Campo N° V Declaración fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución. ☒ Campo N° VI Documentos específicos expuestos ☐ Campo N° VII Falencias específicas de la solicitud internacional ☐ Campo N° VIII Observaciones específicas a la solicitud internacional
4.	La Oficina Internacional comunica este informe a las Oficinas designadas, en conformidad con las reglas 44bis.3(c) y 93bis.1, pero no antes de la expiración de 30 meses a partir de la fecha de prioridad (Regla 44bis.2), excepto cuando el solicitante realiza una petición expresa invocando el artículo 23(2).

	Fecha de confección de este informe: 30 de Enero de 2006 (30.01.2006)
La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza	Funcionario autorizado: Athina Nickitas- Etienne
Facsímil N°: +41-22 740 14 35	Teléfono N° +41 22 338 89 85

Formulario PCT/IB/373 (octubre 2004)

TRATADO DE CO PERACIÓN INTERNACI NAL
EN MATERIA DE PATENTES

71  69

Del ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

PCT

A

ver formulario PCT/ISA/220

INFORME ESCRITO
DEL ORGANISMO DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(regla PCT N° 43bis.1)

Fecha de envío (día/mes/año)

ver formulario PCT/ISA/210 (hoja 2)

Referencia del Solicitante o Agente

PROCEDER

Ver abajo, punto 2

ver formulario PCT/ISA/220

Referencia Internacional

Fecha de Presentación Internacional
(día/mes/año)

Fecha de Prioridad
(día/mes/año)

PCT/US 2004/024011

26.07.2004

29.07.2003

Clasificación Internacional de Patentes (IPK) o clasificación nacional e IPK
A61K 39/12, A61K 39/295, C07K 14/18

Solicitante

WELCH, Siao-Kun Wan

1. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:

- ☒ Campo N° I Fundamento del informe
- ☐ Campo N° II Prioridad
- ☐ Campo N° III No realización de ningún dictamen sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial
- ☐ Campo N° IV Falta de uniformidad de la invención
- ☒ Campo N° V Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución.
- ☒ Campo N° VI Documentos específicos expuestos
- ☐ Campo N° VII Carencias específicas de la solicitud internacional
- ☐ Campo N° VIII Observaciones específicas a la solicitud internacional

2. PROCEDER

Cuando se solicita un Examen Preliminar Internacional, este informe es válido como informe escrito del organismo encargado de la búsqueda internacional ("IPEA"); esto no es así cuando, según la regla 88.1bis(b), el solicitante elige otro organismo distinto a este como IPEA y el IPEA elegido informó a la Oficina Internacional que los informes escritos de este organismo de búsqueda internacional no serán reconocidos.

Cuando este informe es válido como informe escrito de IPEA, tal como está previsto arriba, el solicitante es intimado a presentar ante IPEA una posición por escrito, y cuando corresponde, modificaciones, en el plazo de 3 meses a partir de la fecha en la que fue remitido el formulario PCT/ISA/220 o en el plazo de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que vence más tarde.

Para otras opciones, ver formulario PCT/ISA/220.

3. Para otros detalles, ver las instrucciones del formulario PCT/ISA/220.

Nombre y Dirección Postal del Organismo de Búsqueda Internacional
Oficina de Patentes Europeas
D - 80298 Munich
Tel.: +49 89 2399-0 Tx.: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4485

Funcionario Apoderado

Armandola, E.

Tel: +49 89 2399 - 7493

Formulario PCT/ISA/237 (carátula) (enero 2004)

**INFORME ESCRITO DEL
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Referencia Internacional
PCT/J82004/024011

72 70
[Handwritten signature]

Campo Nº 1 Fundamento del Informe

1. Con respecto al idioma, el informe fue confeccionado, basado sobre la solicitud internacional, en el idioma en que fue presentada, en tanto en este punto no se indique otra cosa.
☐ El informe está basado sobre una traducción del idioma original al siguiente idioma, el que se trata del idioma de la traducción presentada a los efectos de la búsqueda internacional (según las reglas 12.3 y 23.1 b)).
2. Con respecto a la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y requerida para la invención reivindicada, el informe fue confeccionado sobre la siguiente base:
 - a. Tipo de material
☒ protocolo de secuencias
☐ tablas del protocolo de secuencias
 - b. Forma del material
☒ en forma escrita
☒ en forma legible por computadora
 - c. Momento de la presentación
☐ comprendido en la presentación internacional presentada
☐ presentado, junto con la solicitud internacional, en forma legible por computadora
☒ presentado posteriormente ante el organismo a los efectos de la búsqueda
3. ☒ Habiendo presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posteriormente o adicionales coincide con la versión original de la solicitud o que no la supera.
4. Observaciones adicionales

INFORME ESCRITO DEL
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/US 2004/024011

73 71
JP

Campo Nº V Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución

1. Resolución
- | | | | |
|--------------------------|----|-------------------|-------|
| Novedad | SI | Reivindicaciones: | 1 -15 |
| | No | Reivindicaciones: | |
| Actividad inventiva | SI | Reivindicaciones: | 1 – 5 |
| | No | Reivindicaciones: | |
| Aplicabilidad industrial | SI | Reivindicaciones: | 1 – 5 |
| | No | Reivindicaciones: | |
2. Documentos y aclaraciones:
ver hoja adjunta

Campo Nº VI Documentos definidos presentados

1. Documentos definidos presentados (reglas 43bis y 70,10)
y/o
2. Declaraciones no escritas (reglas 43bis . 1 y 70,8)
ver formulario 210

74 72

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL – HOJA ANEXA
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/024011

Ítem V

Declaración razonada con respecto a novedad, nivel inventivo, y aplicación industrial; citas y explicaciones soportando cada declaración.

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: ELLSWORTH M.A., CASSIUS M.T.: "Efficacy of Bovi-shield Gold5 vaccine against bovine viral diarrhoea virus type 2 respiratory challenge." PFIZER ANIMAL HEALTH TECHNICAL BULLETIN, noviembre 2003, páginas 1-8, XP002340137

D2: WO 2004/017990 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH) 4 de marzo de 2004

D3: WIDJOJOATMODJO M N ET AL: "Classical swine fever virus Erns deletion mutants: Trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 7, abril de 2000, páginas 2973-2980, XP002227585 ISSN: 0022-538X

D4: VENUGOPAL K ET AL: "TOWARDS A NEW GENERATION OF FLAVIVIRUS VACCINES" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC GUILDFORD, GB, vol. 12, no. 11, agosto 2004, páginas 966-975, XP002048225 ISSN: 0264-410X

Novedad y Nivel Inventivo (Artículos 33(2) y 33(3) del PCT)

Las reivindicaciones 1-15 pueden considerarse novedosas puesto que ninguna de las anterioridades divulgan composiciones de vacuna en donde por lo menos dos virus mutantes vivos de la misma familia que contengan mutaciones sobre el mismo sitio genómico estén presentes.

Las reivindicaciones también pueden considerarse inventivos por las siguientes razones:

D1, considerado la anterioridad más cercana, divulga una vacuna multivalente comercial la cual contiene, entre otros virus, BVDV-1 y BVDV-2 vivos modificados. No se presenta sin embargo ninguna información sobre el tipo de modificación presente en estos virus.

D2 también describe una vacuna multivalente para proteger reses de infecciones causadas por varios tipos de patógenos. La vacuna descrita en D2 también contiene tanto un BVDV-2 como un BVDV-1 citopático (ver por ejemplo la reivindicación 13). La cepa de BVDV-2 utilizada en D2 es la misma mencionada en la reivindicación 7 de la solicitud. Sin embargo, los BVDV usados en la vacuna de D2 han sido desactivados y no mutados (ver la página 11 de D2).

D3 describe mutantes de remoción Erns del virus de la peste porcina clásica (CSFV, *por su sigla en Inglés*) el cual pertenece al género Pestivirus. Este virus vivo modificado ha sido utilizado en la vacunación de cerdos pero no en combinación con otro virus de la misma familia también mutado en la región Erns. No se observa ninguna indicación en los antecedentes que podría haber guiado al experto a la materia de las reivindicaciones 1-15.

73
75

Ítem VI
Ciertos documentos citados

Documentos publicados

Solicitud No. Patente No.	Fecha de Publicación (día/mes/año)	Fecha de Presentación (día/mes/año)	Fecha de Prioridad (día/mes/año)
IB2004/001292	04.11.2004	13.04.2004	21.04.2003

El documento PCT/IB2004/001292 fue publicado y presentado después de la fecha de prioridad de la presente solicitud. Sin embargo, este documento reivindica una fecha de prioridad antes de aquella de la presente solicitud. Si esta prioridad es válida, los documentos serán de relevancia para la novedad de la materia de las presentes reivindicaciones durante la evaluación de la fase regional en la EPO.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference 16771	FOR FURTHER ACTION See item 4 below	
International application No. PCT/US2004/024011	International filing date (day/month/year) 28 July 2004 (28.07.2004)	Priority date (day/month/year) 28 July 2003 (28.07.2003)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant WELCH, Shao-Kun, Wan		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any references to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

- | | |
|--|---|
| ☒ Box No. I | Rules of the report |
| ☐ Box No. II | Priority |
| ☐ Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☐ Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ Box No. V | Reasoned statement under Article 35(3) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☒ Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☐ Box No. VIII | Certain observations on the international application |

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis.3).

Date of issuance of this report 30 January 2008 (30.01.2008)	
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Athina Nicktas-Etienne
Facsimile No. +41 22 740 14 35	Telephone No. +41 22 338 89 95

Form PCT/IB/573 (January 2004)

27 4/8
[Signature]

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

REC'D 29 SEP 2005

WIPO

PCT

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

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

Date of mailing

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

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 belowInternational application No.
PCT/JB2004/024011International filing date (day/month/year)
26.07.2004Priority date (day/month/year)
29.07.2003International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K38/12, A61K38/26, C07K14/18

Applicant

WELCH, Siao-Kun Wan

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

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

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 68.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-50535 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Telex 923695 epoo d
Fax: +49 89 2369 - 4466

Authorized Officer

Armandola, E

Telephone No. +49 89 2369-7403



78 5-12-06
JG**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/US2004/024011**Box No. 1 Basis of the opinion**

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.8 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing.
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/US2004/024011**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited**1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)**

and/or

2. Non-written disclosure (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

80 7 16



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

International application No.

PCT/US2004/024011

Re Item V

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

Reference is made to the following documents:

- D1: ELLSWORTH M.A., CASSIUS M.T.: "Efficacy of Bovl-shield Gold5 vaccine against bovine viral diarrhea virus type 2 respiratory challenge." PFIZER ANIMAL HEALTH TECHNICAL BULLETIN, November 2003 (2003-11), pages 1-8, XP002340137
- D2: WO 2004/017990 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH) 4 March 2004 (2004-03-04)
- D3: WIDJOJOATMODJO M N ET AL: "Classical swine fever virus Erns deletion mutants: Trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 7, April 2000 (2000-04), pages 2973-2980, XP002227585 ISSN: 0022-538X
- D4: VENUGOPAL K ET AL: "TOWARDS A NEW GENERATION OF FLAVIVIRUS VACCINES" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 12, no. 11, August 1994 (1994-08), pages 966-975, XP002048225 ISSN: 0264-410X

Novelty and Inventive Step (Art. 33(2) and 33(3) PCT)

Claims 1-15 can be considered novel as none of the prior art documents discloses vaccine compositions in which at least two live mutant viruses of the same family containing mutations in the same genomic site are present.

The claims can also be considered inventive for the following reasons:

D1, considered as the closest prior art document, discloses a commercial multivalent vaccine containing, among other viruses, modified live BVDV-1 and BVDV-2. No information on the kind of modification present in these viruses is, however, given in D1.

D2 also describes a multivalent vaccine to protect cows from infections caused by various

81 8 A 79
5**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2004/024011

pathogens. The vaccine described in D2 also contains both a cytopathic BVDV-2 and BVDV-1 (see e.g. claim 13). The strain of BVDV-2 used in D2 is the same as mentioned in claim 7 of the application. However, the BVDV used in the vaccine of D2 have been inactivated and not mutated (see page 11 of D2).

D3 describes Erns deletion mutants of Classical Swine fever Virus (CSFV) belonging to the Pestivirus genus. This modified live virus has been used in vaccination of pigs but not in combination with another virus of the same family also mutated in the Erns region.

No hint is given in the prior art that might have lead the skilled person to the subject matter of claims 1-15.

Re Item VI**Certain documents cited****Certain published documents**

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
IB2004/001282	04.11.2004	13.04.2004	21.04.2003

Document PCT/IB2004/001282 was published and filed after the priority date of the present application. However, said document claims a priority date earlier than that of the present application. If this priority is valid, the documents will become of relevance for the novelty of the subject-matter of the present claims during regional phase examination at the EPO.

82

CESION

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por **PFIZER PRODUCTS INC.**, sociedad constituida en virtud de las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América. cuya dirección postal completa es Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América, por el presente vendemos y traspasamos a la citada **PFIZER PRODUCTS INC**, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en **VACUNAS SEGURAS PARA VIRUS MUTANTES** en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada **PFIZER PRODUCTS INC**, de conformidad con esta cesión.

En fe de lo cual, firmamos de nuestro puño y letra,

Kalamazoo, MI, 2 de febrero de 2006 (Fdo) Saio-Kun Wan WELCH.
Lugar, fecha y firma - Saio-Kun Wan WELCH

Kalamazoo, MI, 1 de febrero de 2006 (Fdo) Jay Gregory CALVERT.
Lugar, fecha y firma - Jay Gregory CALVERT

Kalamazoo, MI, 20 de enero de 2006 (Fdo) Michael K. O'HARA.
Lugar, fecha y firma - Michael K. O'HARA

Scitash, MA, 11 de enero de 2006 (Fdo) Xuemei CAO
Lugar, fecha y firma - Xuemei CAO

83 23/06

Por el presente certifico que este es el documento original.

(Fdo) Sami Swadek 23/Feb/06

Suscrito y jurado ante mí, el 23 de febrero de 2006.

(Fdo.) ALBERT L. THEMES, Notario Público de Washington Distrito Capital,
cuyo cargo vence el 14 de junio de 2009, según consta en su
correspondiente sello notarial.

(Sello Oficial)

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Distrito de Columbia
Estados Unidos de América
2. El presente documento público fue firmado por: Albert L. Themes
3. Que actuó en su calidad de Notario Público del Distrito de Columbia
4. Lleva el sello de Albert L. Themes Notario Público del Distrito de Columbia
Se certificó
5. En Washington D.C.
6. El 23 de febrero de 2006
7. Por parte del Secretario del Distrito de Columbia.
8. Bajo el Número 152675
9. Aparece el sello del Distrito de Columbia
10. Firmado por Patricia Elwood.



85 83
JP

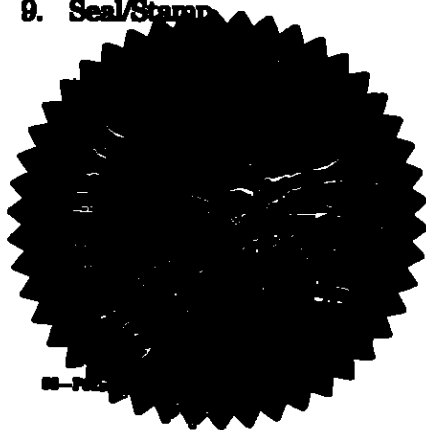
Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
United States of America
2. This public document has been signed ALBERT L. THEMES
3. acting in the capacity of ~~NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA~~
ALBERT L. THEMES, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE
4. bears the seal/stamp of ~~DISTRICT OF COLUMBIA~~

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
23 FEBRUARY 2006
6. the _____ day of _____
7. by Secretary of the District of Columbia
8. No. 152675
9. Seal/Stamp



10. Signature
PATRICIA ELWOOD

Patricia Elwood

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by PFIZER PRODUCTS INC. a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said PFIZER PRODUCTS INC., all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in SAFE MUTANT VIRAL VACCINES so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said PFIZER PRODUCTS INC. in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

Kalamazoo, MI 2/2/06 *Sanjiv K. Welch*
Place, date and signature - Sanjiv-Kun Wan WELCH

Kalamazoo MI 2/1/06 *Jay Gregory Calvert*
Place, date and signature - Jay Gregory CALVERT

Kalamazoo, MI 1/10/2006 *Michael K. O'Hara*
Place, date and signature - Michael K. O'HARA

Scituate, MA 02066 1/11/2006 *Xuemei CAO*
Place, date and signature - Xuemei CAO

2.23.06 SAMI SWADOK
I HEREBY CERTIFY THAT THIS
IS THE ORIGINAL DOCUMENT
Subscribed and sworn to before me this 23 day of FEB 2006, a Notary Public
In and for the District of Columbia
Albert L. Themes
Notary Public
My commission expires 6/14/2009

ALBERT L. THEMES
NOTARY PUBLIC DISTRICT OF COLUMBIA
My Commission Expires June 14, 2009

87

**REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Folio 05

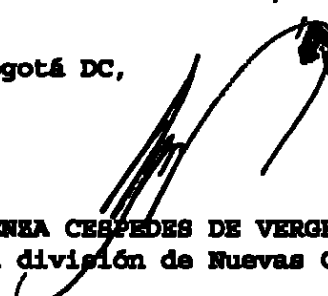
2020
Bogotá D.C.,

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

REFERENCIA	Radicación No.	06 7814
	Solicitud internacional	PCT/US2004/024011
	Fecha inicio fase nacional	28/02/06
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	2501
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,


ALIX CARMONA CEPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

projas